



**Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Bioquímica Médica- IBqM**

Renato Fernandes de Paulo

**Melanofilina, Prefoldina 4 e Miosina Va: parceria para o correto
enovelamento durante o transporte vesicular**

**Rio de Janeiro - RJ
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Renato Fernandes de Paulo

Melanofilina, Prefoldina 4 e Miosina Va: parceria para o correto enovelamento durante o transporte vesicular

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de doutor em Ciências (Química Biológica)

Orientadora: Martha Sorenson
Professora Adjunta –IBqM-UFRJ

Co-orientadora: Verônica Salerno Pinto
Professora Adjunta- EEFD-UFRJ

Rio de Janeiro
2009

Ficha Catalográfica

De Paulo, Renato Fernandes

"Melanofilina, Prefoldina 4 e Miosina Va: parceria para o correto enovelamento durante o transporte vesicular"

Tese (Doutorado em Química Biológica)
Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Bioquímica Médica, 2009.

Orientadora: Martha Meriwether Sorenson
Co-orientadora: Verônica Salerno Pinto

Número de folhas: 133 - CXXXIII

Dissertação: Doutorado em Química Biológica.

1- Miosina Va. 2- Melanofilina. 3- Prefoldina 4. 5- Proteínas intrinsecamente desestruturadas. 6 - Proteínas de múltiplos domínios. 7 - Chapenoras.

I – Sorenson, Martha Meriwether (Orient.) e Salerno Pinto, Verônica (co-orient.). II- Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Bioquímica Médica

De Paulo, Renato Fernandes

Melanofilina, Prefoldina 4 e Miosina Va: parceria para o correto envelhecimento durante o transporte vesicular

Rio de Janeiro,..... de..... de 2009.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de doutor em Ciências (Química Biológica).

Banca examinadora:

Dra. Martha Sorenson

Professora Adjunta do Instituto de Bioquímica Médica – Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). (Orientadora)

Dra. Verônica Salerno Pinto

Professora Adjunta do Departamento de Biociências da Atividade Física, CCS - Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). (Co-orientadora)

Dra. Claudia dos Santos Mermelstein

Professora associada do Instituto de Ciências Biológicas CCS/UFRJ. CCS - Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Dr. Hatisaburo Masuda

Professor Titular do Instituto de Bioquímica Médica, CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Dra. Enilza Maria Espreáfico

Professora Adjunta da Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos.

Dra. Andrea Cheble de Oliveira

Professora Adjunta – Instituto de Bioquímica Médica - Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). (Revisora)

Dr. Jean Christophe Houzel

Professor Adjunta do Instituto de Ciências Biológicas - CCS/UFRJ. (Suplente externo)

Esta tese foi realizada no Laboratório de Química Fisiológica da Contração Muscular, do Instituto de Bioquímica da Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, com estágio doutoral sanduíche no Membrane Traffic Lab, da Faculdade de Medicina do Imperial College London, Londres, Reino Unido, sob orientação do professor Miguel Seabra, com auxílios financeiros da bolsa PDEE (sanduíche) concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Welcome Trust.

“Ciência é a oficina do desassossego”

Dedico essa frase e tese ao Netto, Estér e Israel.

"os limites do meu conhecimento são os limites do meu mundo"

Ludwig Wittgenstein

Agradecimentos

Sempre muita gente para agradecer. Primeiramente a Deus, que me deu saúde e colocou muita gente no meu caminho durante estes quatro anos de PhD. Com todos aprendi. Quero agradecer aos meus pais, Otoni e Fátima, pela linda família que construíram e alicercam. Ao meu irmão Júnior, minha cunhada Silvana e aos meus sobrinhos. Obrigado pelas orações e tantos momentos de alegria.

Eu gostaria de agradecer minha orientadora, Prof^a. Martha Sorenson, pela orientação, pelas discussões, críticas e incentivo na utilização de diversas técnicas, além da dedicação ímpar ao meu crescimento científico. Obrigado pela paciência, entusiasmo e sensatez tão intrinsecamente ordenados.

Obrigado ao Prof. Miguel Seabra, por me acolher em seu grupo no Imperial College, London. Esta tese foi fruto de nossas discussões, broncas e afeto. Destaco o Dr. Alistair Hume, o agradeço por ser meu supervisor e por me apresentar ao fascinante mundo da biologia molecular e celular, pelo seu correto caráter científico, humor cítrico, pela ajuda nos momentos mais difíceis e pelo apoio intelectual e pessoal em Londres. Não posso esquecer do Dr. Abul Tarafeder, obrigado pelas dicas de como purificar e manter a Melanofilina estável; obrigado pelas pints e risadas. À Mimi, pela orientação e ajuda com duplo híbrido de levedura e Dr. Rudi Baron, por trazer boa culinária e humor ao laboratório. Obrigado a todos os amigos que ficaram no Imperial.

Obrigado Verônica, pela orientação, incentivo, discussões e longa amizade. Obrigado Bill Provance pelas “conversas” fundamentais para a elaboração desta tese e do manuscrito; além do meu moral. Gostaria de agradecer à família da miosina II: Débora, Luciana, Jamila, Carmen, Lidiane e aos “meninos da Martha”: Leonog, Zé Renato, Zé Henrique, Daniel, Cícero, Marcelo, Leandro, Pelica, Gustavo, Valentin, Dionizio e a todos os outros integrantes do laboratório. Obrigado pelo convívio e discussões científicas, futibolísticas e metafísicas. Ao Xandão pelas aulas de Bioquímica e à Dra. Carolina Braga, por sofrer comigo no HPLC e no fluorímetro. Obrigado Mariana, por me ajudar a analisar os dados de espectroscopia.

À Moniquinha e Dahabada, pela ajuda nos experimento de CD, à Yra e Maurício pelos cristais, colaboração e discussões.

Valeu Lucas, Zaza e Jean; complexo tripartido, fundamental e wild type. Obrigado Antonio, Phi e Mike, meus irmãos gregos e malakas. Ao Sebastian, el porteno e Henrique,

amigos notáveis. Obrigado a todos vizinhos camaradas da “babel” Willian Temple House. À Dra. Ana Figueiredo, pelo sorriso sincero e por sempre me falar a verdade.

À eterna dona Judithe e seu Alex. Conselheiros e amigos!

À Claudinha, Cris Zamariolli, Dahabada e Moisés pela amizade. Aos colegas do Laboratório do professor Sérgio Ferreira, em especial Jordano, Leozinho, Theresa, Marcelinho e Adriano.

A todos do laboratório LAPA. Pela acolhida, mesmo reclamando muito da minha inconveniência quase diária. Aos amigos e funcionários do IBqM. Em especial ao seu Márcio e dona Joana, por contribuírem com tanta dedicação e sorriso para o crescimento da ciência.

Ao Prof. Zé Roberto e seu laboratório bem humorado.

Ao Cameron e ao EMBO course crew. Myosin rules!

Às minhas alunas Ana e Luciana, pela dedicação e vontade de aprender; vocês me ensinaram muito.

À Luisa, por compartilhar comigo amor, sonho, medo, sabedoria, rinite e cafuné.

É um privilégio conviver com tanta gente fascinada pela vida e seus mistérios.

RESUMO

De Paulo, Renato Fernandes. **Melanofilina, Prefoldina 4 e Miosina Va: parceria para o correto enovelamento durante o transporte vesicular.** Rio de Janeiro, 2009. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de doutor em Ciências (Química Biológica).

Um aspecto inexplicado sobre o transporte de vesículas pigmentadas em melanócitos é o mecanismo que permite a formação do complexo tripartido entre Rab27a, melanofilina (Mlph) e miosina Va. A interação entre estas três proteínas é a chave para o transporte de melanossomos. Nesta tese, identificamos e mapeamos pela primeira vez a interação da prefoldina4 (Pfd4 ~14 kDa) com Mlph através do ensaio de duplo híbrido de levedura (*in vivo*) e ensaios bioquímicos (*in vitro*). Pfd4 é uma subunidade da prefoldina (PFD, ~87 kDa), uma chaperona que interage e direciona proteínas citosólicas para o correto enovelamento. Nossos resultados *in vivo* sugerem que o sítio de interação da Pfd4 na Mlph coincide em parte com o sítio de interação com a miosina Va. Esta interação foi confirmada utilizando ensaio de *pull-down* e medidas espectroscópicas. Pfd4 compete com a miosina Va pelo sítio de interação na Mlph e o C-terminal da Mlph (predito ser uma região em *coiled-coil*) é crucial para a ligação da Pfd4. Medidas de anisotropia de fluorescência *in vitro* mostram que a Mlph marcada com fluoresceína interage com mais afinidade com a cauda da miosina Va (Kd ~ 0,48 μ M) do que com a Pfd4 (Kd ~3,9 μ M). Os múltiplos domínios da Mlph trabalham juntos para recrutar a miosina Va e Pfd4, logo os domínios de Mlph isolados não se ligam à Pfd4. Mlph também não é capaz de se ligar à miosina II de músculo. O domínio que se liga à miosina Va e a porção C-terminal da Mlph são intrinsecamente desestruturados quando não estão unidos. O espectro de dicroísmo circular da Mlph pré-incubada com Pfd4 ou com miosina Va mostra que a interação com essas proteínas causa um aumento no conteúdo de α -hélice da Mlph. Nossos dados sugerem que a interação da Pfd4 ou miosina Va com a Mlph, estruturam o domínio intrinsecamente desestruturado da Mlph. Esta mudança de conformação pode em princípio interferir no processo de transporte de vesículas pigmentadas em melanócitos.

Palavras Chave: Miosina Va; Melanofilina; Prefoldina; Proteínas intrinsecamente desestruturadas; Proteínas de múltiplos domínios; Chaperonas.

ABSTRACT

De Paulo, Renato Fernandes. **Melanofilina, Prefoldina 4 e Miosina Va: parceria para o correto enovelamento durante o transporte vesicular.** Rio de Janeiro, 2009. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de doutor em Ciências (Química Biológica).

An unexplained aspect of melanosome transport is the mechanism that allows the formation of the essential tripartite complex between myosin Va (MyoVa), melanophilin (Mlph) and Rab27a. The interaction among these proteins is the key to melanosome transport. Here we identify prefoldin4 (Pfd4, ~14 kDa) as a new partner for Mlph and map its interaction with Mlph using the yeast 2-hybrid system (*in vivo*) and biochemical assays (*in vitro*). Pfd4 is a subunit of prefoldin (PFD, ~87 kDa), a chaperone that binds to unfolded proteins for correct folding. Our *in-vivo* results suggest that Pfd4 interacts with Mlph at a site that overlaps the MyoVa binding site of Mlph. This interaction is confirmed using pull-down assays and fluorescence spectroscopy; Pfd4 competes with MyoVa for the Mlph binding site and C-terminal residues (including a putative coiled-coil region) of Mlph are crucial for Pfd4 binding. *In-vitro* fluorescence anisotropy reveals a tighter interaction of fluorescein-labeled Mlph with MyoVa tail (Kd ~0.48 μ M) than with Pfd4 (Kd ~3.9 μ M) than with Pfd4. Mlph's multiple domains work in concert to recruit MyoVa and Pfd4; thus shorter constructs do not bind Mlph. Full-length Mlph does not bind muscle myosin II. The binding of MyoVa to Mlph needs the C-terminal domain of Mlph to be structured whereas Mlph alone seems to be intrinsically unstructured, indicating that multiple domains of Mlph work in concert. The circular dichroism spectra of Mlph pre-incubated with Pfd4 or MyoVa show that binding of the central part of Mlph with either Pfd4 or the MyoVa tail causes an increase in Mlph α -helix content. This conformational changes can some how regulate the melanosome transport in melanocytes.

Sumário

Capítulo 1 - Introdução	1
1.1 O melanócito o novo “black pride”	2
1.2 O melanossomo	6
1.3 Motores moleculares e seus adaptadores: estratégias para ir adiante	7
1.3.1 Transporte intracelular via microtúbulos: o papel das cinesinas	7
1.3.2.1 Adaptadores moleculares e o ancoramento dos motores aos seus cargos	10
1.3.3 Transporte via filamentos de actina: as miosinas	11
1.3.4 Adaptadores moleculares da miosina: seu papel na regulação do transporte intracelular	15
1.3.4.1 Função das proteínas Rab e seu papel no transporte de melanossomos	15
1.3.4.2 Mlph e sua família (Slp): proteínas chave na regulação e adaptação dos motores moleculares	18
1.3.4.3 Miosina VIIa e sua proteína ligadora a Rab 27 (MyRIP/Slac2-c)	20
1.3.4.4 Melanofilina (Mlph/Slac2-a)	21
1.4 Doenças relacionadas à falha no transporte intracelular	25
1.4.1 Síndrome de Griscelli	26
1.4.1.1 O papel da Mlph no transporte de melanossomos	29
1.5 Proteínas intrinsecamente desordenadas	30
1.5.1 As chaperonas moleculares: os mestres do origami	31
1.5.1.1 O papel da prefoldina	37
Capítulo 2 - Objetivo	40
2.1 Objetivos específicos	41
Capítulo 3 - Materiais e Métodos	42
3.1 Reagentes	43
3.1.2 Tampões e soluções de estoque	43
3.1.3 Meios de cultura para bactéria	44
3.1.4 Meios de cultura para levedura	45
3.2 Protocolos de biologia molecular	46
3.2.1 Reação em cadeia pela polimerase (PCR) de fragmentos de DNA	46
3.2.2 Digestão do DNA por endonucleases (enzimas) de restrição	47

3.2.3 Extração e purificação dos fragmentos de DNA do gel de agarose	47
3.2.4 Ligação dos fragmentos de DNA	48
3.2.5 Transformação de <i>E.coli</i> competente	49
3.2.6 Preparação do DNA em pequena escala	49
3.2.7 Mutação sítio dirigida dos construtos de melanofilina	50
3.3 Eletroforese (SDS-PAGE)	52
3.4 <i>Western Blotting</i>	53
3.4.1 Transferência de proteínas para membrana de difluorido de polivinilideno (PVDF)	53
3.4.2 Imunodeteção das proteínas	54
3.4.3 Detecção de proteínas por coloração em azul de Coomassie	55
3.4.4 Detecção de proteínas por coloração por prata	55
3.5 Produção e purificação de proteínas recombinantes	55
3.5.1 Purificação da proteína ligada a MBP, His ₆ e a glutationa S-transferase (GST)	56
3.5.2 Purificação de His ₆ por cromatografia líquida de alta resolução (FPLC)	57
3.5.3 Determinação da concentração de proteínas	58
3.6 Purificação do anticorpo policlonal por <i>AminoLink</i> gel	59
3.6.1 Produção de anticorpo policlonal anti-miosina Va por ligação da proteína a e <i>AminoLink</i>	59
3.6.2 Purificação por afinidade	60
3.6.3 Detecção da especificidade dos anticorpos purificado por afinidade	61
3.7 Experimento de duplo híbrido de levedura (Y2H) para determinar interação proteína-proteína	62
3.7.1 Construção dos plasmídeos	65
3.7.2 Transformação padrão de levedura L40 com plasmídeos fusionados que codificam a proteína isca (Mlph 367-500 a.a.) e a presa	65
3.7.3 Titulação da biblioteca de cDNA	66
3.7.4 Amplificação da biblioteca de cDNA	67
3.7.5 Transformação da biblioteca	67
3.7.6 Ensaios de atividade da β -galactosidase líquido para detecção de interação proteína-proteína em larga escala	68
3.7.7 Ensaio de atividade da β -galactosidase em filtro para detecção de	69

interação da proteína híbrido Mlph com proteína presa	
3.7.8 Análise das colônias de levedura por PCR	69
3.7.9 Determinação dos níveis de expressão da isca e presa em Levedura L40	70
3.8 Medidas espectroscópicas	70
3.8.1 Determinação da estrutura secundária por dicroísmo circular (CD)	70
3.8.2 Determinação da interação proteína-proteína por anisotropia de fluorescência	71
Capítulo 4 - Resultados	73
4.1 Duplo híbrido de levedura	74
4.1.1 Mlph se liga de maneira específica com Rab27a e Miosina Va via ensaio de duplo híbrido (Y2H)	74
4.2 Escolha do construto isca de Mlph para o ensaio de duplo híbrido de levedura contra a biblioteca de c-DNA de melanócitos	76
4.3 Identificação da Pfd4 como proteína que interage com Mlph em ensaio de duplo h de levedura contra biblioteca de cDNA de melanócitos	77
4.4 Mapeamento do sítio de interação da Pfd4 com Mlph	79
4.5. Produção de proteínas recombinantes para ensaio de interação proteína-proteína <i>in vitro</i>	82
4.6 Produção de proteínas fusionadas a MBP	85
4.7 Mlph e Pfd4 recombinante interagem <i>in vitro</i>	87
4.8 O domínio da Mlph que interage com a Pfd4 e com miosina Va é intrinsecamente desestruturado	97
4.9 Dicroísmo Circular – O C-terminal da Mlph é fundamental para manter a Mlph estruturada	98
4.10 O conteúdo de α -hélice da Mlph aumenta quando ligada à miosina Va ou à Pfd4	101
4.11 O C-terminal da Mlph é crucial para recrutar miosina Va e Pfd4 <i>in vitro</i>	106
Capítulo 5 - Discussão	109
5.1 Identificação da prefoldina 4 (Pfd4) como parceiro molecular da melanofilina (Mlph)	110
5.2 A interação entre Mlph e MSGTA ou entre Mlph e Pfd4 aumenta o conteúdo de α -hélice da Mlph	116
5.3 Perspectivas para a caracterização do papel da Pfd4 <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	121

Lista de figuras, tabelas e esquemas

Figura 1.1	Células pigmentadas de diversos tecidos, mostrando o perfil de migração de melanosomos em melanócitos	3
Figura 1.2	Domínios estruturais das proteínas motoras de microtúbulos envolvidas no transporte de pigmentos	9
Figura 1.3	A superfamília das miosinas	12
Figura 1.4	Diversidade funcional das miosinas (M)	14
Tabela 1.1	Cargas transportadas por miosinas e seus parceiros moleculares (adaptadores)	15
Tabela 1.2	Proteínas Rab-efetoras e suas respectivas localizações e funções celulares	17
Figura 1.5	Representação esquemática dos domínios estruturais dos possíveis efetores da Rab27	20
Figura 1.6	Representação esquemática da formação do complexo tripartido entre Rab27a, Mlph (aqui denominada Slac2-a) e miosina Va durante sua associação com actina	24
Figura 1.7	Características típicas da Síndrome de Griscelli	27
Figura 1.8	Recrutamento da miosina Va para ligação às membranas dos melanosomos em melanócitos selvagem (+/+), <i>ash</i> , <i>ln</i> e <i>dl</i>	28
Figura 1.9	Modelo do enovelamento de proteínas assistidas por chaperonas no citosol	36
Figura 1.10	Estrutura baseada no cristal da PFD de Archaea	38
Figura 3.1	Gel de agarose 1% com ampliações ilustrativas de um dos genes alvos	48
Tabela 3.1	Lista dos <i>primers</i> utilizados para produção dos construtos	51
Tabela 3.2	Concentração dos anticorpos usados para imunodeteção	54
Tabela 3.2	Proteínas purificadas para a elaboração desta tese	58
Figura 3.2	Imunodeteção por <i>dotblot</i>	62
Figura 3.2	Sistema de Y2H para detecção de interação proteína- proteína	64
Figura 4.1	Interação da Mlph com seus parceiros: Ensaio duplo híbrido de levedura revelado por β -galactosidase	76
Figura 4.2	Expressão dos níveis dos construtos Mlph de fusionados com LexA (~ 22.3 kDa) em levedura L40	77
Figura 4.3	Análise das colônias por PCR	79
Figura 4.4	Ensaio de duplo híbrido de levedura por β -galactosidase para determinar a habilidade da Mlph em interagir com Pfd4 e Miosina Va	80
Figura 4.5	Resumo das interações entre os diferentes domínios da Mlph com Pfd4 ou com MSGTA em ensaios de duplo híbrido de levedura baseado na Figura 4.4	82
Figura 4.6	Perfil de purificação das proteínas fusionadas a GST	84
Figura 4.7	Perfil de purificação das proteínas fusionadas a MBP	86
Figura 4.8	Ensaio de interação entre GST-Mlph com esferas de glutathiona Sefarose	88

Figura 4.9	Interação entre construtos de Mlph e Pfd4	90
Figura 4.10	Interação da Pfd4 com construtos de Mlph ou MyRip	91
Figura 4.11	Resumo das interações entre os construtos GST-Mlph e MBP-Pfd4 <i>in vitro</i>	92
Figura 4.12	Competição entre MSGTA e Pfd4 pelo domínio de interação na Mlph	94
Figura 4.13	Experimento de competição entre MSGTA e diferentes concentrações de Pfd4 pelo domínio de interação com a Mlph	96
Figura 4.14	Análise estrutural <i>in silico</i> e <i>in vitro</i> da Mlph	100
Figura 4.15	Os espectros de CD da Mlph (A,150-590; B,150-400) sugerem que a formação do complexo binário com MSGTA induz a aumento da quantidade de estrutura secundária da Mlph	103
Figura 4.16	O espectro de CD da Mlph (A 150-590 a.a.; B 150-400 a.a.) sugerem que a formação do complexo binário com Pfd4 induz a aumento da quantidade de estrutura secundária da Mlph.	105
Figura 4.17	O C-terminal da Mlph é crucial para recrutar MSGTA (A) e Pfd4 (B)	107
Figura 5.7	Diagrama esquemático da Mlph 1-590 a.a. e a disposição de aminoácidos na sua região central e no seu C-terminal (Mlph Δ RBD)	115
Figura 5.2	Papel da Pfd4 e do C-terminal da Mlph no transporte de melanossomos	119

Abreviaturas

α - MSH	Hormônio Estimador de Melanócito
a.a	Aminoácidos
ABD	Domínio de Ligação de Actina
ADP	Adenosina difosfato
Amp	Ampicilina
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ash	<i>ashen</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BME	Brometo de etídio
BSA	Albumina Sérica Bovina
CCT	<i>Chaperonina contendo polipeptídio 1 do complexo t</i>
CD	Dicroísmo circular
cDNA	DNA complementar
CHAPS	3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanossulfonato
CHM	Coróidemia
CLT	Linfócito T <i>citotóxico</i>
C-Kit	Receptores de Citocinas
C-terminal	carboxi-terminal
CREB	Proteínas de ligação do elemento responsivo a cAMP
<i>dl</i>	<i>dilute</i>
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desorribonucleotídeo trifosfatado
DO	Densidade Ótica
DTT	Ditiotreitol
E	Ácido Glutâmico
ELA	Esclerose lateral amiotrófica
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
ER	Retículo endoplasmático
ES	Síndrome de Elejalde

FITC	isotiocianato de fluoresceína
GTP	Guanosina Trifosfato
GS	Síndrome de Griscelli
GSH	Glutathiona reduzida
GSK3	Glicogênio Sintase Cinase-3
GST	Glutathiona S-Tranferase
GTBD	Domínio de Ligação da Porção Globular
HPS	Síndrome de Hermansky-Pudlak
HRP	Peroxidase <i>de</i> raiz forte
HSP	Proteínas de choque térmico
IPTG	Isopropil-Beta-D- tiogalactosídeo
MBD	Domínio de Ligação da Miosina
MBP	Proteína Ligadora de Maltose
Myo Va	Miosina Va
MHD	Domínio homólogo a Munc 13
Mlph	Melanofilina
LB	Meio cultura para bactéria (Luria-Bertani)
<i>Ln</i>	<i>Leaden</i>
<i>LRO</i>	Organélas relacionadas ao lisossomos
<i>YPAD</i>	Extrato de levedura, peptona e dextrose
<i>YC</i>	Suplementação para cultura de levedura
MyRIP	Proteína de ligação entre Miosina VII e Rab
N-terminal	amino-terminal
NADPH	Nicotinamida-adenina dinucleotídeo-fosfato em sua forma reduzida
PSA	Persulfato de amônia
pAD	Domínio de ativação do DNA
pBD	Domínio de ligação do DNA
PBS	Solução Salina de Fosfato
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
PEST	Prolina, Glutamato, Serina, Treonina
PFD	Prefoldina
Pfd	Subunidade proteica da PFD
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
Rab	GTPase monomérica de membrana
RE	Retículo endoplasmático
RBD	Domínio de ligação para Rab
RMN	Ressonância magnética nuclear
RPE	Epitélio pigmento da retina
Rpm	Rotações por minuto

RT-PCR	PCR em tempo real
TE	Tampão Tris-EDTA
TF	Chaperona <i>Trigger factor</i>
SAXS	Espalhamento de raios X a baixo ângulo
SDH	Domínio homólogo a Sinaptogamina
SDS	Detergente dodecil sulfato de sódio
Slp	Proteína como a sinaptotagmina
SNARE	Receptor solúvel de attachment NSF
TBE	Tris Borato EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametil-1,2-diaminometano
Tris	(hidroximetil)aminometano
U.A	Unidade arbitrária
UV	Ultra-violeta
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
WT	Tipo Selvagem
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronídeo

Capítulo 1 - Introdução

1 Introdução

1.1 O melanócito: o novo “black pride”

A cor dos olhos, dos cabelos e da pele fornece ao ser humano um fenótipo ímpar. As células responsáveis por produzir essa coloração através da produção de melanina dentro dos melanossomos, são os melanócitos (**Figura 1.1**). Todavia, isto só é possível devido a uma rede altamente organizada e complexa formada por trilhos protéicos e proteínas motoras que formam a base do transporte intracelular. Todo organismo eucarioto necessita do transporte intracelular para posicionar vesículas e organelas dentro da célula. Há 39 anos, fazendo experimentos em células pigmentadas de peixe e sapo, Potter e colaboradores mostraram que a movimentação de pigmento do centro da célula para a periferia celular é dependente da integridade dos microtúbulos. O mesmo padrão se repete em melanócitos de mamíferos (Potter & Hadley, 1970; Schliwa, 1984a; Schliwa, 1984b). Até então, acreditava-se que o transporte intracelular dependia apenas dos filamentos de actina. A partir daí, o estudo do transporte intracelular em células pigmentadas vem atraindo diversos pesquisadores. Foram estudos em células pigmentadas que permitiram a descoberta de novos componentes da maquinaria de transporte intracelular, incluindo os motores e seus efetores (Potter & Hadley, 1970; Schliwa, 1984a). Nos últimos 10 anos, diversas patologias foram correlacionadas a falhas identificadas em componentes relacionados ao transporte ou localização de vesículas e organelas dentro da célula. O sistema nervoso é um dos alvos mais sensíveis às falhas no transporte intracelular e o número de doenças genéticas relacionadas à deficiência nos trilhos celulares e seus motores moleculares cresceu significativamente, tornando as células pigmentadas uma ferramenta crucial no estudo dessas doenças. As Síndromes de Griscelli e Hermansky-Pudlak são dois exemplos de doenças genéticas relacionadas a falhas no sistema de transporte intracelular (Goding, 2007).

Os melanócitos sintetizam melanina e a armazenam em vesículas especializadas denominadas melanossomos. Os melanossomos produzidos na região perinuclear dos melanócitos chegam até a periferia da célula via motores moleculares, sendo em seguida transferidos para queratinócitos.

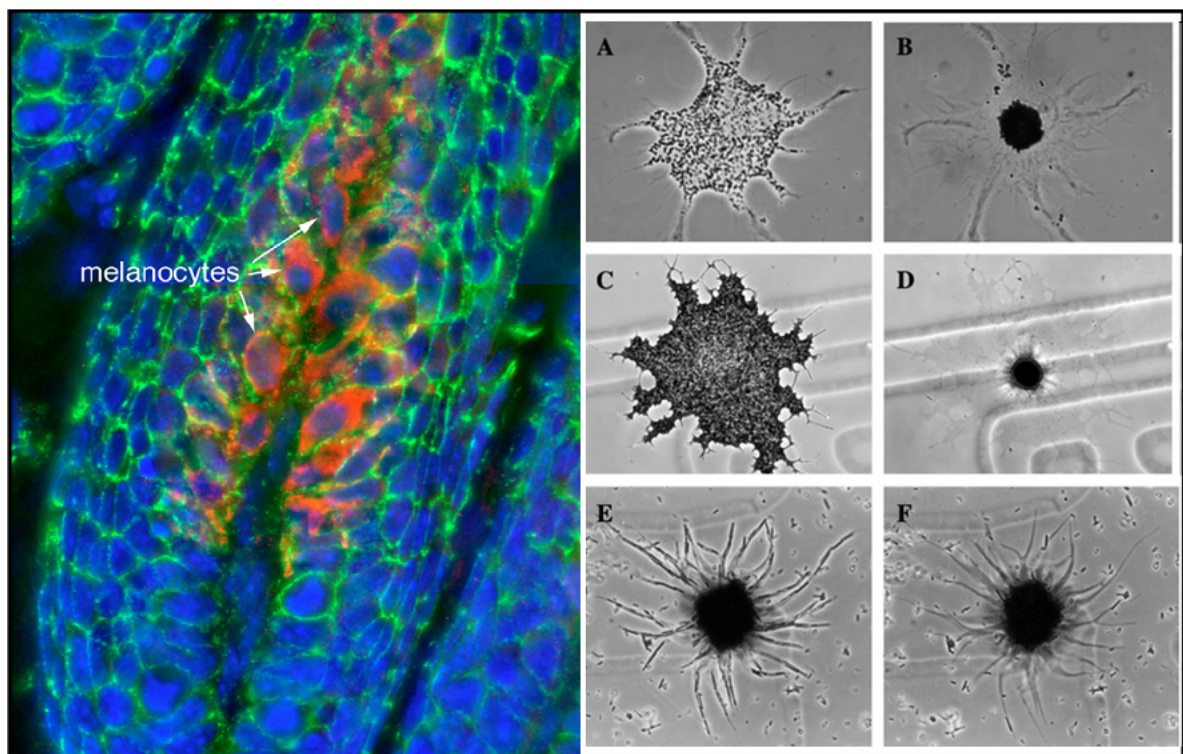


Figura 1.1. Células pigmentadas de diversos tecidos, mostrando o perfil de migração de melanossomos em melanócitos. Melanócitos do folículo capilar. Imunofluorescência (à esquerda) dos folículos capilares de camundongos DNA em azul, E-caderina em verde e em vermelho os melanócitos, marcados com anticorpo anti-Tyrp1. Células pigmentadas (à direita) usadas como modelo para o estudo de transporte de organelas. Campo claro ou imagem de contraste de fase de melanóforos de sapo (A,B), Melanóforos de peixe (C,D), e RPE de peixe (E,F). Os painéis à A,C,E mostram cada modelo de célula estimulada para dispersão. Os painéis à B,D,F mostram cada modelo de célula estimulada para agregação. (adaptado de (Goding, 2007) e de (Nascimento et al., 2003)).

Diversos grupos de pesquisa, incluindo o nosso, estão interessados em desvendar como motores moleculares e seus adaptadores contribuem para função celular, uma vez que eles são ubiquamente expressos e essenciais para a motilidade intracelular. Os motores moleculares são estudados em diversos modelos, pois participam de processos tão diversos quanto: divisão celular, transmissão sináptica e fixação de vesículas e organelas junto à membrana celular. Além disso, os motores são mecano-enzimas que transformam a energia química da hidrólise do ATP em movimento (Aspengren et al., 2009).

A liberação dos melanossomos dos melanócitos para os queratinócitos ou a exocitose e endocitose de neurotransmissores dependem de uma sequência precisa de eventos que são mediados por interações moleculares entre vesículas de membrana e citoplasmáticas e proteínas citosólicas. Um tema emergente é que efetores moleculares, como as chaperonas citoplasmáticas, possivelmente guiam esse recrutamento sequencial de proteínas e/ou solubilizam e refazem as conformações de proteínas desnaturadas. Chaperonas especializadas em poucos substratos são ideais para participar do processo regulatório que necessita de destreza para rearranjar conformacionalmente estruturas protéicas.

Por fim, é importante encontrarmos novos reguladores do transporte intracelular e desvendar suas características individuais e gerais. Compreender como os motores moleculares e seus efetores participam do transporte de vesículas e organelas *in vivo* e *in vitro* é um passo fundamental para conseguirmos manipular terapêuticamente o tráfego celular. Do mesmo modo, descobrir quais as interações protéicas que ocorrem durante o transporte intracelular pode ajudar a explicar porque as proteínas não se associam indiscriminadamente dentro da célula. Definitivamente a regulação do transporte intracelular é um dos capítulos mais interessantes no manual da vida e a interação e regulação de proteínas responsáveis pelo transporte intracelular é o tema que será discutido nesta tese.

A pele é o único órgão coberto por “células mortas”, conhecidas como *stratum corneum*, e é constantemente exposta a fatores ambientais estressantes, como radiação, temperatura e poluição. No humano adulto, a pele pesa cerca de 4 quilos e recobre todo o corpo, em uma área total de aproximadamente 2 metros quadrados. Tem espessura variada, a pálpebra é mais fina do que as costas, por exemplo (Takeda et al., 2007). Tem duas partes principais: uma camada superior, que constitui a superfície chamada de epiderme e outra inferior, a derme, que abriga capilares sanguíneos, glândulas, terminações nervosas e os melanócitos (Goding, 2007).

Existem dois tipos de células pigmentadas em mamíferos: os melanócitos diferenciados, originários da crista neural, e o epitélio pigmentado da retina (RPE), originado do cálice óptico do cérebro (Bharti et al., 2006). Os melanócitos originados na crista neural são formados a partir de células precursoras não pigmentadas denominadas de melanoblastos. Os melanoblastos já apresentam marcadores característicos dos melanócitos, como o receptor para tirosina cinase (c-Kit) e fator de transcrição associado à microfthalmia (Mitf), ambos essenciais para a sobrevivência dos melanoblastos durante seu desenvolvimento (Steingrimsson et al., 2004; Vance & Goding, 2004). Merece destaque o fato de neurônios também se originarem na crista neural. A proximidade quanto à origem dos neurônios e melanócitos fica mais evidente quando observamos os dendritos neuronais e os dendritos dos melanócitos ao microscópio durante o cultivo e, supondo-se o paralelismo, assim como os neurônios, os melanócitos comunicam-se entre si e com os queratinócitos adjacentes (Seiberg, 2001).

As pessoas apresentam o mesmo número de melanócitos, porém o número de melanossomos e sua distribuição próxima à superfície determinam a cor da pele. A unidade de pigmentação da pele é de um melanócito para cada 30 a 40 queratinócitos (Hearing, 2005). O número de melanócitos varia de um ponto a outro do revestimento cutâneo. Por isso é que podemos facilmente observar as diferentes variedades de tonalidade da cor da pele em qualquer

indivíduo independente da sua cor, por exemplo, branca, amarela ou negra. Bronzeamento, melasma, manchas da idade (*lentigo senilis*), embraquecimento capilar e melanoma são doenças bem conhecidas relacionadas a melanócitos.

1.2 O melanosomo

Melanosomo é um sítio celular onde ocorrem diversos processos biológicos, desde a pigmentação e fotoproteção da pele até a síntese, armazenamento e transporte de melanina. Em mamíferos, eles são sintetizados nos melanócitos da pele, nos melanócitos coroidais e epitélio pigmentado da retina (RPE). Melanosomos fazem parte de um grupo de organelas relacionadas a lisossomos (LRO). Neste grupo, se encontram também lisossomos secretores de linfócitos T, grânulos densos de plaquetas e corpos epiteliais do pulmão. Recentemente muitos trabalhos vêm elucidando os mecanismos moleculares relacionados ao transporte dessas organelas (Wasmeier et al., 2008).

Em vertebrados não mamíferos, como peixes e sapos, os melanosomos são sintetizados e estocados nos melanóforos. A dispersão e agregação dos melanosomos determinam a mudança de cor da pele desses animais (Wasmeier et al., 2008). Diversos trabalhos vêm mostrando similaridades entre o transporte de melanosomos em melanóforos e em melanócitos de mamíferos. Realmente, nos dois sistemas melanosomos se movem via microtúbulos e trilhos de actina e utilizam os mesmos motores moleculares, dineína, cinesina e miosina Va (Wu et al., 1998b; Hara et al., 2000).

Melanócitos de mamíferos funcionalmente transportam os melanosomos para os queratinócitos circunvizinhos, permitindo a pigmentação da pele e dos cabelos, enquanto os melanóforos têm a capacidade de agregar e dispersar seus pigmentos rapidamente para mudar a cor da pele de peixes e anfíbios. Os melanóforos não transferem pigmentos para células ao redor e não precisam acumular os melanosomos na periferia. Este processo parece ser restrito a melanócitos de mamíferos e envolve a participação de três proteínas: Rab27a, melanofilina

(Mlph) e miosina Va. A Rab 27a e a Mlph não foram identificadas em melanóforos (Wasmeier et al., 2008).

1.3 Motores moleculares e seus adaptadores: estratégias para ir adiante

1.3.1 Transporte intracelular via microtúbulos: o papel das cinesinas

Na maioria das células, os microtúbulos estão orientados com suas extremidades negativas direcionadas para o centro das células, e sua extremidade positiva direcionada à periferia (Euteneuer & McIntosh, 1981). Esta característica em melanócitos, por exemplo, faz com que agregação represente movimento dos melanossomos na direção negativa do microtúbulo, enquanto dispersão representa movimento em direção contrária. As cinesinas são motores protéicos que têm a capacidade de se locomover utilizando microtúbulos como trilhos. Elas foram identificadas pela primeira vez nos axônios gigantes de lulas, transportando organelas de membrana. A proteína dessa superfamília tem como único elemento unificador o domínio motor, que tem a capacidade de atrelar a hidrólise de ATP a modificações espaciais em sua estrutura (Malik & Vale, 1990).

Normalmente essas proteínas são compostas por duas cadeias pesadas, denominadas pelo domínio cabeça, onde se localiza a região motora, e duas cadeias leves por cabeça. Nas cadeias pesadas, a região motora está conectada através de uma sequência de aminoácidos a uma alfa hélice que forma uma espiral espiralada com a outra cadeia pesada, sendo, portanto, estas hélices responsáveis pela dimerização da cinesina (**Figura 1.2**). Na outra extremidade da hélice, ligam-se as cadeias leves da cinesina, responsáveis por auxiliar o processo de encaixe das estruturas que serão carregadas pelos microtúbulos. Na grande maioria das cinesinas, o motor está próximo do N-terminal das cadeias pesadas: essas proteínas geralmente caminham em direção à extremidade de crescimento rápido dos microtúbulos (positiva) (Marx et al., 2009).

Dentre as possíveis cargas das cinesinas estão mitocôndrias, vesículas contendo neurotransmissores e até outros microtúbulos. Além do funcionamento como carregadoras, as cinesinas também têm um importante papel na formação dos fusos meióticos e mitóticos (Morris & Hollenbeck, 1995).

Embora sua importância seja mais óbvia em melanócitos, melanóforos e neurônios, células nas quais as cargas devem percorrer longas distâncias, o transporte polarizado também é necessário em praticamente qualquer célula eucarionte, sendo responsável pela estruturação e alocação de organelas membranosas como o complexo de Golgi e o retículo endoplasmático (RE). É importante notar que as cinesinas só agem como ATPases quando ligadas ao microtúbulo, estando a atividade catalítica atrelada a um ciclo mecânico processivo. Foi determinado que a hidrólise de uma molécula de ATP acarreta num passo de 8 nm da cinesina (Yildiz et al., 2004). O ciclo mecânico inicia-se com a entrada de um ATP no sítio de ligação de nucleotídeos, que mobiliza uma pequena alça alguns décimos de angstrom. Essa mudança conformacional é amplificada e transmitida pela região de interface entre as cadeias pesadas, lançando o outro motor para frente, onde ele se liga ao microtúbulo. Ocorre então a hidrólise do ATP seguida da liberação de um fosfato e novas transformações espaciais que levam ao desacoplamento da cabeça de trás do microtúbulo. Retorna-se então ao estado inicial, com troca de posição das cabeças (Yildiz et al., 2008). O transporte realizado pelas cinesinas não é aleatório, elas são capazes de fazer entregas a diferentes subcompartimentos da célula. Por exemplo, nos neurônios os canais de sódio são entregues aos nódulos de Ranvier e as vesículas sinápticas são endereçadas aos terminais pré-sinápticos. Embora diferentes proteínas façam diferentes entregas, acredita-se que a fosforilação de cinesinas possa ter efeito regulatório. As cadeias leves são importantes para atracar as organelas carregadas, e elas se encontram fosforiladas dentro das células. Esses pontos fosforilados foram identificados como possíveis sítios de fosforilação pela GSK3, uma cinase altamente expressa em neurônios.

1.3.2 Transporte via microtúbulos: o papel das dineínas

Dentro da via endocítica, moléculas internalizadas também são eficientemente selecionadas: durante a reciclagem de receptores de membrana, moléculas que retornam da superfície celular e as que precisam ser degradadas são encaminhadas aos lisossomos e endossomos (Maxfield & McGraw, 2004). É nesta via retrógrada que a dineína tem um papel fundamental. As dineínas axonemais dizem respeito às que atuam em cílios e flagelos. Nesta tese, discutiremos apenas as dineínas citoplasmáticas. Dineínas citoplasmáticas são proteínas motoras formadas em geral por duas cadeias pesadas de 470-540 kDa, e várias outras cadeias pequenas e médias que somam mais de 1000 kDa. A cadeia pesada forma as cabeças onde estão os sítios catalíticos de ATP e a região que se liga a microtúbulos (**Figura 1.2**). As outras cadeias formam a cauda, que pode se ligar a estruturas que serão transportadas. Dineínas, ao contrário das cinesinas, se movem no sentido retrógrado de um microtúbulo (extremidade negativa). No citoplasma, elas atuam na movimentação e organização de vesículas, cromossomos e estruturas como o aparelho de Golgi. Por exemplo, podem puxar o aparelho de Golgi no sentido interior da célula ao longo dos microtúbulos. Quando células são tratadas com colchicina, os microtúbulos se desmembram, e no caso o aparelho de Golgi se fragmenta em pequenas vesículas. Porém, se a droga é removida e os microtúbulos se reformam, o aparelho de Golgi retorna à posição normal através do transporte pelas dineínas (Roghi & Allan, 1999).

1.3.2.1 Adaptadores moleculares e o ancoramento dos motores às suas cargas

Dinactina é um complexo multiprotéico (envolve p150_{glued}, dinamitina e ARP1) que possibilita a dineína interagir com a organela em células de eucariotos (Schroer, 2004). A subunidade da dinactina p150_{glued} co-localiza com dineína em lisados de melanóforos de peixe, sugerindo que a dinactina também regule o transporte de melanossomos (Nilsson et al., 2001). Todavia, pouco se sabe sobre a sua função. A dineína e a cinesina II imunoprecipitam com

dinactina e os dois motores moleculares se ligam na mesma região da p150^{glued}, sugerindo que dineína e cinesina competem pelo mesmo sítio de ligação na dinactina. Outra possibilidade é que dinactina esteja envolvida na organização dos motores moleculares quando eles já estão presentes na região perimembranar (Dell, 2003).

1.3.3 Transporte via filamentos de actina: as miosinas

A superfamília de miosinas é composta por mais de 20 classes de miosina que compartilham homologia em seu N-terminal, domínio conhecido como cabeça da miosina que tem propriedade motora. A classe II de miosina é denominada de miosina convencional, enquanto todas as outras são denominadas miosinas não convencionais (**Figura 1.3**). O domínio cabeça é conectado ao domínio cauda através de um domínio pescoço flexível. O domínio motor se liga à actina e gera força através da energia liberada pela hidrólise de ATP, enquanto o domínio cauda se distingue entre as diferentes isoformas de miosina, e pode interagir tanto com a carga quanto com outros parceiros moleculares (De La Cruz & Ostap, 2009).

A **Figura 1.4** mostra uma célula imaginária, onde diversas miosinas trabalhariam ao mesmo tempo. A miosina Va é composta por duas cadeias pesadas idênticas que se dimerizam para formar as duas cabeças da miosina. A dimerização é mediada pelo domínio cauda, que possivelmente forma um domínio *coiled-coil* (espiral espiralada) em α -hélice (**Figura 1.2**). A região do pescoço é descrita como α -hélice e contém repetidas sequências de aminoácidos denominados de motivos IQ (isoleucina-glutamina) e cada uma interage com cadeias leve. Estas cadeias leves foram identificadas como calmodulina, e sua função seria regular a hidrólise de ATP pela cabeça globular (Langford, 2002).

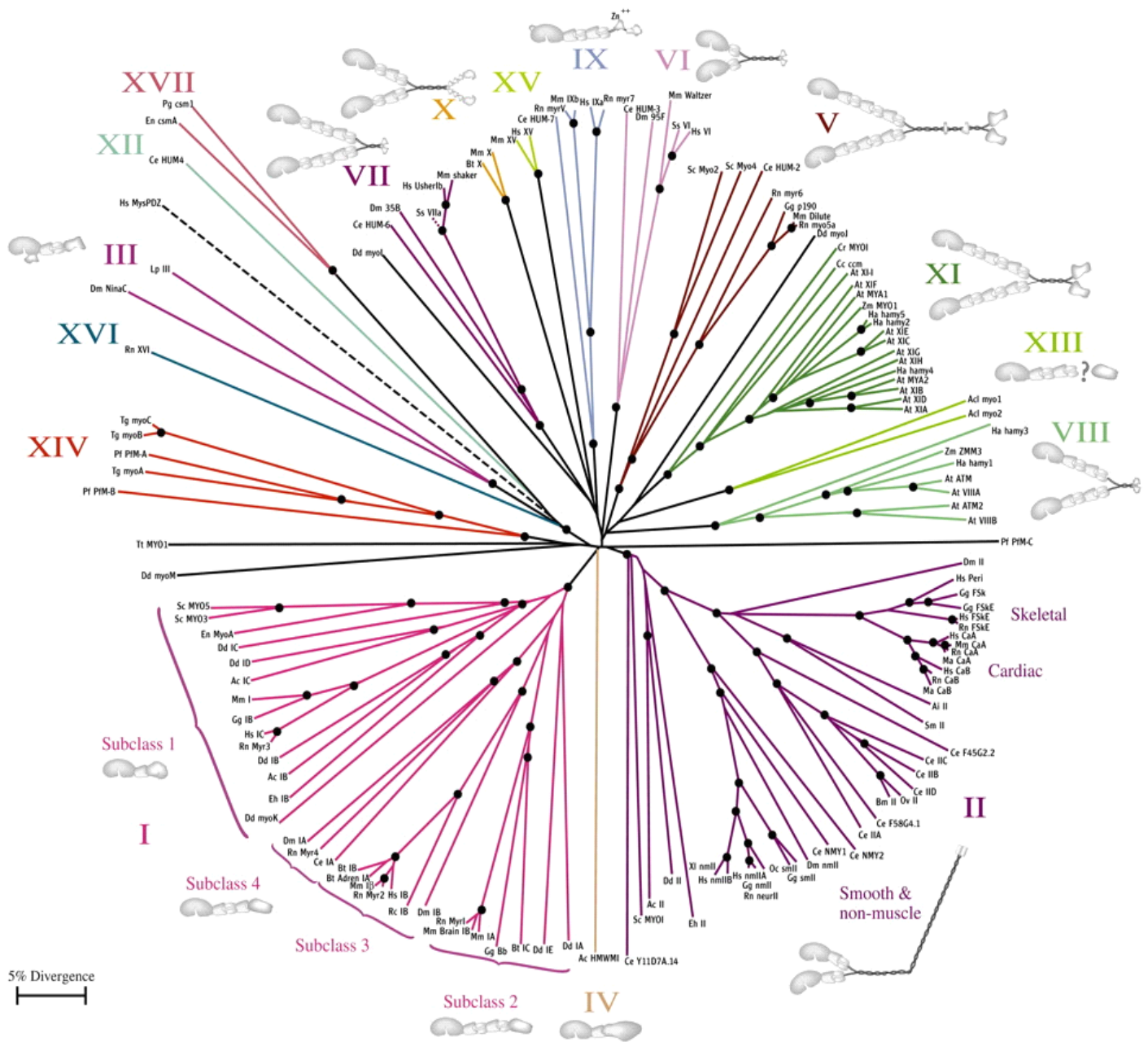


Figura 1.3. A superfamília das miosinas. As miosinas são mecano-enzimas que hidrolisam ATP para gerar força. Análises filogenéticas já identificaram mais de 20 diferentes classes de miosinas. A árvore é resultado do alinhamento de 150 seqüências de membros da superfamília. Os desenhos moleculares ao redor da árvore indicam a possível estrutura molecular de cada miosina. Note que a região da cabeça mostra muita homologia entre as miosinas, que podem ter uma ou duas cabeças [adaptado de (Hodge & Cope, 2000)].

A miosina V tem três isoformas: miosina Va, miosina Vb e miosina Vc. Todas estão relacionadas ao transporte de vesículas/organelas que usam as proteínas Rabs como moléculas adaptadoras. A miosina Va apresenta na cauda uma região que sofre *splicing* alternativo e forma diferentes exons: B, D e F (Menasche et al., 2003). A isoforma de miosina Va que contém exon B é expressa exclusivamente no cérebro, enquanto miosina Va que contém exons D e/ou F é encontrada na pele e em outros tecidos. O exon F é essencial para a interação com Mlph, mostrando que o uso alternativo dos exons pode influenciar na seleção das cargas pelas miosinas (Menasche et al., 2003; O'Sullivan et al., 2004). Miosina VIIa é expressa no epitélio pigmentado da retina (RPE) como descrito anteriormente, e também no interior das células foliculares sensoriais e tem a função de ancorar o melanossomo ao citoesqueleto de actina (Lopes et al., 2007).

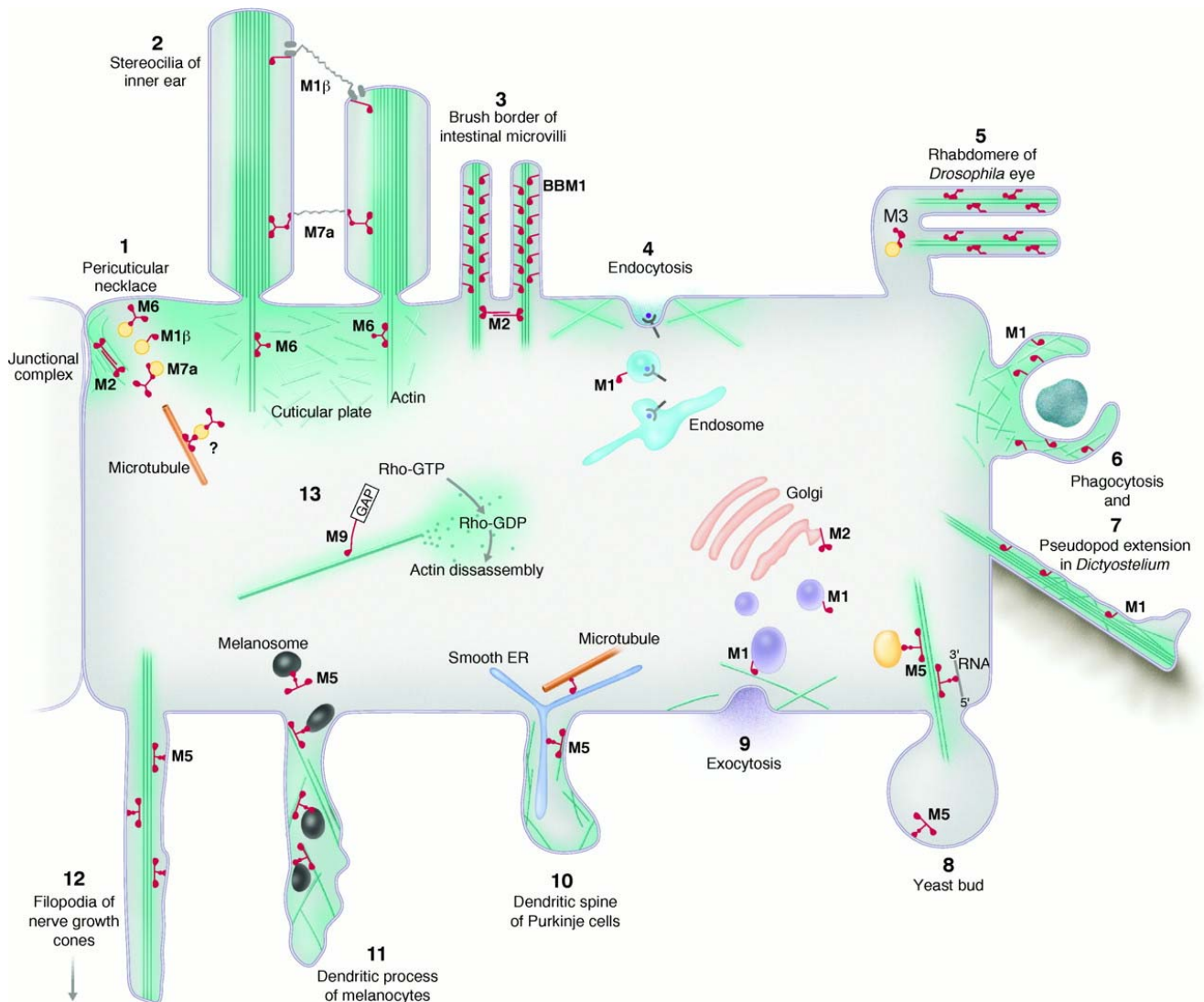


Figura 1.4. Diversidade funcional das miosinas (M). As possíveis funções para miosinas estão distribuídas nesta célula imaginária. M1 β , M6 e M7 se localizam na base dos estereocílios, junto ao citoesqueleto de actina (1). M1 β é mostrada como motor adaptador dos estereocílios capilares do ouvido interno (2), enquanto M6 e M7 ancoram ou estabilizam os estereocílios. M1 prende o centro das microvilosidades na membrana plasmática (3). M2 serve como *link* entre os filamentos de actina nas microvilosidades. M1 também auxilia na endocitose (4) em levedura, *Dictyostelium* e células de vertebrados. NinaC (M3) é necessária para a fototransdução nos olhos de *Drosófila* (5). M1 também tem papel na fagocitose (6) em *Dictyostelium* e macrófagos (7). Em leveduras, M5 participa do transporte de organelas e RNA (8). M2 assiste na formação de vesículas na rede de Golgi (9). M1 participa na secreção de levedura e exocitose em *Dictyostelium* (9). M5 participa do transporte do RE via espinhas dendríticas das células de Purkinje (10), assim como no transporte de melanossomos em melanócitos (11) e do processo de extensão dos filopódios em cones de crescimento dos nervos (12). M9b é uma RhoGAP que inativa Rho e possivelmente modula a organização de actina (13) (Adaptado de (Mermall et al., 1998)).

Tabela 1.1. Cargas transportadas por miosinas e seus parceiros moleculares (adaptadores).

Motor	Carga	Rab	Parceiro molecular
	Melanossomos da pele	Rab27a	Melanofilina
	Síndrome de Griscelli	Rab27a	MyRIP
Miosina Va	mRNPs neuronais Vesículas neuronais Estoques de Ca ²⁺ sensíveis a IP ₃ em espinhas dendríticas		Pura, TLS
Miosina Vb	Endossomos de reciclagem	Rab11a	FIP2
MiosinaVc	Endossomos	Rab8	
Miosina VIIa	Melanossomos RPE	Rab27a	MyRIP
Miosina I	Endossomos	?	Pmel17
Miosina VI	Vesículas de Golgi Vesículas envoltas por claritina	Rab8	Optineurina Dab2
Miosina4p	mRNA (ASH1) RE cortical	?	She3p, She2p, She3p
Miosina2p	Vesículas secretórias Vacúolos Microtúbulos (final positivo) Mitocôndria	Sec4p Yo11p	? Vac17p. Vac8p Bim1p/Kar9p

Adaptado de (Desnos et al., 2007).

1.3.4 Adaptadores moleculares da miosina: seu papel na regulação do transporte intracelular

1.3.4.1 Função das proteínas Rab e seu papel no transporte de melanossomos

A análise filogenética da família de proteínas Rab de diversas espécies revela uma filogenia funcional, já que diferentes Rabs tem funções ou localizações parecidas. Oito grupos funcionais já foram identificados, discutiremos nesta tese apenas três grupos. O Grupo II das proteínas Rab (Rab2, Rab4, Rab11 e Rab25) está localizado principalmente nos endossomos de reciclagem e seus membros estão envolvidos na distribuição/reciclagem da via endocítica, exceto a Rab2 que está localizada no RE/Golgi e está envolvida no transporte retrógrado do RE para o Golgi. O grupo III das proteínas Rab (Rab3, Rab26, Rab27 e Rab37) está todo localizado nos grânulos secretórios de diferentes tipos celulares. Estas estão envolvidas na regulação do processo de secreção. O grupo V das proteínas Rab (Rab5, Rab21 e Rab22) está localizado no endossomo (**Tabela 2**).

Muitas proteínas Rab são conhecidas por participarem do transporte de vesículas e organelas via interação direta ou indireta com motores moleculares. Rab6a, que faz parte do grupo VI, regula o transporte retrógrado do Golgi para RE e descobriu-se que ela interage com Rabcinesina-6, um motor molecular que se liga à extremidade positiva do microtúbulo, em experimentos de duplo híbrido de levedura (Echard et al., 1998). Isto sugere que Rab6 está envolvida na regulação da dinâmica do complexo de Golgi via movimentos de vesículas pelo microtúbulo (Echard et al., 1998).

As isoformas Rab27a e Rab27b estão envolvidas na regulação da secreção e transporte de organelas relacionadas a lisossomos (LRO) (Tabela 2). A Rab27 interage com muitas proteínas envolvidas no transporte intracelular, dentre elas a melanofilina (Mlph), MiosinaVII e a Proteína Ligadora a Rab (MyRIP) (Strom et al., 2002; Desnos et al., 2003e). Mutações do

gene Rab27a estão relacionadas com a Síndrome de Griscelli tipo II, caracterizada pela diminuição do transporte de grânulos secretórios da célula-T e consequente debilidade do sistema imune, além do incompetente transporte dos melanossomos na periferia dos melanócitos, caracterizado por albinismo parcial em camundongos e humanos (Menasche et al., 2000).

Tabela 1.2. Proteínas Rab-efetoras e suas respectivas localizações e funções celulares

Efector	Proteína Rab	Distribuição tecidual	Localização subcelular	Possível função
JFC1/Slp1	Rab27a/b	pulmão, rim, cérebro, estômago, pâncreas, timo, linfonodos, e próstata	Grânulos da fosfatase ácida prostática específica (PSAP) em células do epitélio secretor da próstata	Liga-se a PtdInsP ₃ e NADPH oxidase. Regula secreção de PSA e PSAP
Slp2/Exofilina4	Rab27a/b	pâncreas e pulmão	Desconhecida	Liga-se a fosfolípidos e regula em células PC12 a exocitose
Granulofilina/Slp4	Rab27a/b, Rab3a/b/c/d, Rab8a/b	glândula pituitária e células β-pancreáticas	Vesículas densas em células endócrinas (PC12, células β pancreáticas e AaT20), grânulos secretórios de células acinares	Regula a inibição de vesículas densas em células endócrinas. Interage com Munc18-1 e syntaxina1A. Possível papel no recrutamento de SNARE
Slp5	Rab27a/b	placenta e fígado	Grânulos contendo insulina em células pancreáticas	Liga-se a fosfolípidos e regula a exocitose em células PC12
Melonofilina/Slac2-a	Rab27a/b	rim, pulmão, pele, intestino delgado e estômago	Nos melanossomos dos melanócitos	Captura de melanossomos para o citoesqueleto de actina. Interage com miosina Va e possivelmente com actina e prefoldina
Slac2b	Rab27a/b	desconhecida	Desconhecida	Desconhecida
MyRip/Slac2-c	Rab27a/b	ubiquamente expressa, exceto pâncreas e fígado	Nos melanossomos da células RPE, grânulos contendo insulina em células β pancreáticas e células acinares da parótida	Captura de melanossomos RPE para o citoesqueleto de actina. Interage com miosina Va, miosina VIIa e actina
Rabfilina3A	Rab27a/b, Rab3a/b/c/d, Rab8a/b	cérebro	Vesículas sinápticas de neurônios, Vesículas densas em células endócrinas	Modula a exocitose de vesículas secretoras
Noc2	Rab27a/b, Rab3a/b/c/d, Rab8a/b	tecidos endócrinos	Vesículas densas em células endócrinas	Acumulação de grânulos secretórios em camundongos Noc2 knockout
Munc13-4	Rab27a/b	tecidos hematopoiéticos, pulmão	Grânulos líticos em CLTs, grânulos densos de plaquetas	Papel no ancoramento e fusão de grânulos

Adaptado de (Fukuda, 2005).

1.3.4.2 Mlph e sua família (Slp): proteínas chave na regulação e adaptação dos motores moleculares

Muitas possíveis proteínas efetoras vêm sendo identificadas recentemente, incluindo membros da família de proteínas semelhantes à sinaptotagmina (Slp) (**Figura 1.5**). Dentre elas, estão as proteínas semelhantes à sinaptotagmina sem domínio C2 (Slac2), proteínas efetoras de Rab3a (Rabfilina3a e Noc2; sem domínio C2) e Munc 13-4. A família Slp em mamíferos inclui cinco membros distintos designados JFC1/Slp1, Slp2, Slp3, granofilina (Gnph)/ Slp4 e Slp5 (Fukuda et al., 2002; Kuroda et al., 2003; Kuroda & Fukuda, 2004). A família Slp que contém o domínio *tandem* C2 no C-terminal (C2A e C2B) foi originalmente identificada devido à sequência homóloga com o domínio C2 de proteínas da família sinaptotagmina envolvidas na regulação do transporte de membrana (Fukuda et al., 2002). Todos os membros da família Slp compartilham um N-terminal conservado denominado de domínio homólogo à sinaptotagmina (SHD) ou domínio de ligação a Rab (RBD) (Fukuda et al., 2001). O SHD e o domínio *tandem* C2 em proteínas Slp são separados por uma região ligadora da proteína de diferentes tamanhos. Contudo, devido a eventos de processamento alternativo (*alternative splicing*), as proteínas Slp podem existir sem os domínios C2 ou SHD (Fukuda & Mikoshiba, 2001). O SHD também está localizado no N-Terminal de outra família de proteínas que não tem o domínio C2 no C-terminal, denominada família Slac2, que consiste de três membros: Mlph/Slac2a, Slac2b e MyRIP/Slac2c (**Figura 1.5**) (Matesic et al., 2001; Fukuda et al., 2002; Desnos et al., 2003e).

O SHD geralmente consiste de duas regiões conservadas com potencial para formar α -hélices denominadas de SHD1 e SHD2, separadas por dois motivos de Zn^{2+} formados por oito cisteínas (Fukuda et al., 2002). Contudo, o SHD1 da Slp1, Slp2-a e Slac2-b não apresenta os motivos de dedos de Zn^{2+} e o SHD1 e SHD2 são unidos diretamente. O SHD da Slp e da família da Slac2 regula a especificidade na interação com Rab27a e Rab27b e mostra uma

preferência para Rab27a no estado GTP ligado (Fukuda & Kuroda, 2002; Fukuda et al., 2002; Fukuda, 2003) (**Figura 1.5**).

Munc13-4 é um membro da família Munc13, que está relacionada com o transporte de vesículas exocíticas em diversos modelos celulares, principalmente vesículas sinápticas, são promotores para fatores relacionados à SNARE. Munc13-4 não tem domínio que apresente homologia com a região SHD das famílias Slp e Slac2, sugerindo que ela contenha uma nova, e não caracterizada, região de interação do N-terminal com a Rab27a (Dulubova et al., 2005). A função e localização das proteínas da família Slp que se ligam a proteínas Rab estão resumidas na **Tabela 2**.

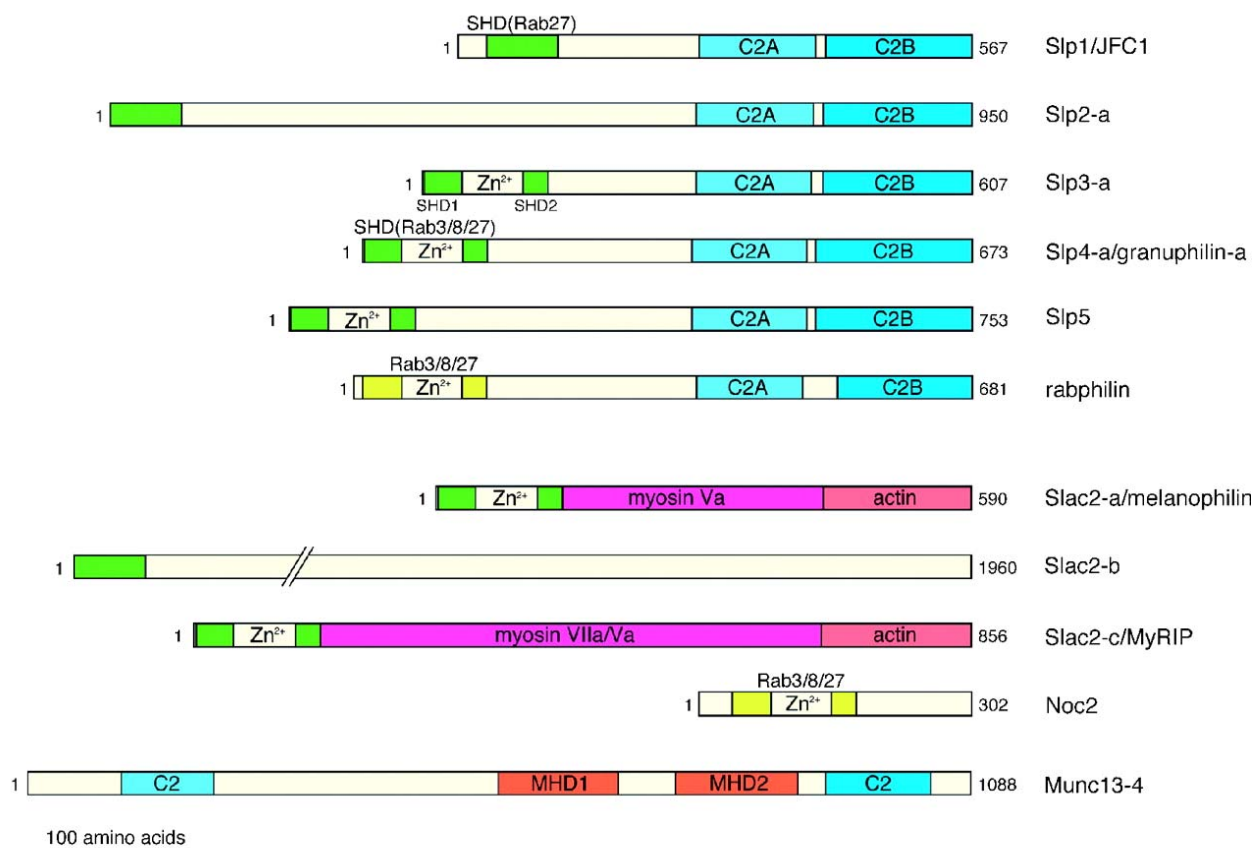


Figura 1.5. Representação esquemática dos domínios estruturais dos possíveis efetores da Rab27. Em verde, os domínios homólogos à sinaptotagmina (SHD), responsáveis pela interação com Rab27a. Em amarelo, os domínios de ligação à Rabfilina3A e Noc2. Em azul, os domínios C2, em magenta os domínios de ligação à miosina, em rosa os domínios de ligação à actina e em vermelho os domínios homólogos a Munc (MHD) [adaptado de (Fukuda, 2005)].

1.3.4.3 Miosina VIIa e sua proteína ligadora a Rab 27 (MyRIP/Slac2-c)

Por rastreamento de duplo híbrido em uma biblioteca de cDNA de retina, a proteína MyRIP (também chamada de Slac-2c) foi identificada como uma proteína de 96 kDa que interage com a cauda da miosina VIIa (Desnos et al., 2003d). Análises de RT-PCR sugerem que a MyRIP é amplamente expressa em diversos tecidos, embora não em baço ou fígado (Desnos et al., 2003c). MyRIP também foi detectada em grânulos de centro denso contendo insulina, nas células beta do pâncreas (Waselle et al., 2003). MyRIP tem um domínio SHD no

N-terminal, que interage especificamente com isoformas de Rab27, e um motivo em dedo de Zn^{2+} (**Figura 5**). A porção medial da MyRIP compartilha sequência homóloga a Mlph e interage com miosina VIIa (Fukuda, 2002; Desnos et al., 2003b; Lopes et al., 2007); e com miosina Va *in vitro* (Fukuda & Kuroda, 2002), embora interaja preferencialmente com miosina VIIa em condições fisiológicas (Desnos et al., 2003a; Futter et al., 2004).

Devido às similaridades entre a MyRIP e Mlph, é proposto que as duas proteínas desempenhem funções similares. MyRIP co-localiza com Rab27a e miosina VIIa em melanossomos nas microvilosidades das células do RPE que circundam as pontas dos fotoreceptores no exterior dos segmentos e pode formar um complexo tripartido imunoprecipitável (Fukuda et al., 2002; Desnos et al., 2003e). O camundongo *shaker-1*, que é deficiente em miosina VIIa, é um modelo para a síndrome de Usher tipo I em humanos, que mostra escassez de melanossomos no processo apical, semelhante ao que acontece com melanócitos de camundongos *dilute*. Dados recentes comprovam a hipótese que a miosina VIIa esteja envolvida com transporte de melanossomos dentro do epitélio pigmentado da retina para os locais ricos em actina (Ramalho et al., 2009).

1.3.4.4 Melanofilina (Mlph/Slac2-a)

A Mlph/Slac2-a humana é uma proteína de 590 aminoácidos, que contém um domínio SHD e um domínio de dedo de Zn^{2+} , e nesta tese será denominada apenas por Mlph. Vem sendo demonstrado *in vitro* que o domínio SHD da Mlph interage com as isoformas da Rab27a de maneira dependente do nucleotídeo ligado a elas (Fukuda & Kuroda, 2002; Nagashima et al., 2002; Strom et al., 2002; Kukimoto-Niino et al., 2008). O domínio C-terminal da Mlph não compartilha qualquer sequência homóloga com o C-terminal de outras proteínas da família Slp e nem mesmo contém o domínio *tandem* C2, comum a esta família de proteínas. Estas são algumas das características que faz da Mlph uma proteína única entre as Slc2. Entretanto, a parte central da Mlph apresenta um sítio de ligação para a miosina Va (MBD) (Nagashima et

al., 2002; Strom et al., 2002) e a porção mais distal do seu C-terminal vem sendo descrita como domínio de ligação de actina (ABD) (Kuroda et al., 2003). Análises de *Northern blot* sugerem que a Mlph é expressa em diferentes tecidos, com um maior nível de expressão em tecidos ricos em células epiteliais e secretoras, como rim, pulmão, intestino delgado, estômago e pele (Matesic et al., 2001; Wu et al., 2002).

A Mlph é o único membro das famílias Slp e Slac2 relacionada geneticamente como efetor da Rab27a. O gene que codifica Mlph é mutado em camundongos *leaden*, que apresentam uma coloração de pelo em cor de prata, devido à diluição da sua cor selvagem por falha no transporte de melanossomos (**Anexo 1**) (Matesic et al., 2001). Melanossomos são produzidos na região perinuclear dos melanócitos e, quando maduros, são transportados do centro para a periferia celular via movimentos rápidos, longos e bidirecionais sobre os microtúbulos. Os melanossomos são então capturados na periferia celular pelo citoesqueleto de actina. Vem sendo proposto que esta captura é devido à Rab27a, ancorada na membrana externa do melanossomo, que ao atingir a extremidade positiva do microtúbulo, recrutaria a Mlph, que por sua vez interage com miosina Va, permitindo a captura do melanossomo pelo citoesqueleto de actina (**Figura 1.6**) (Wu et al., 2001; Hume et al., 2007).

Mlph contém duas regiões putativas em *coiled-coil* na região medial da proteína, a.a, 345-381 (Coil 1) e 429-468 (Coil 2) (Nagashima et al., 2002). O *coil 1* interage com miosina Va e por isso é denominada como domínio de ligação à miosina (MBD) (Kuroda et al., 2003) e é requerida para interagir com miosina Va (**Figura 1.6**). Há um grande e entusiasmado debate entre diferentes grupos de pesquisa sobre a região mínima necessária para interação da Mlph com a miosina Va. Esta região na Mlph vem sendo proposta como sendo 367-400 a.a. em um estudo (Strom et al., 2002), entre 345-381 a.a. em outro trabalho (Nagashima et al., 2002) e 176–201 a.a. em outros (Geething & Spudich, 2007; Lewis, Jr. et al., 2009). A interação da miosina Va com a Mlph necessita da presença de exon F, um exon de processamento

alternativo encontrado em miosinas Va específicas de melanócitos, mas ausente em miosina Va de cérebro (Nagashima et al., 2002; Wu et al., 2002). Recentemente, a porção globular da cauda da miosina Va também vem sendo descrita como ligadora da Mlph (Fukuda & Kuroda, 2004; Geething & Spudich, 2007; Lewis, Jr. et al., 2009), embora não esteja claro se esta interação é necessária para ligação de alta afinidade entre miosina Va e Mlph, ou necessária para ativação da miosina Va.

O C-terminal da Mlph é descrito como sítio de interação com citoesqueleto de actina, independente da MBD (Figura 1.6-C). Esta região, 401-590 a.a. é denominada de domínio de ligação para actina (ABD). Superexpressão de Mlph sem o domínio ABD provoca acúmulo perinuclear de melanossomos em melanócitos, possivelmente por um efeito dominante negativo. Uma mutação no ABD, denominada da mutante KA, que consiste de uma substituição de 493KPRRK497 por APAAA, vem sendo mostrada incapaz de interagir com actina *in vitro*. A superexpressão do mutante KA em melanócitos causa um acúmulo de melanossomos na região perinuclear (Kuroda et al., 2003). Este dado sugere que o domínio ABD precisa estar intacto para manter o melanossomo atracado ao citoesqueleto de actina.

Superexpressão de Mlph em melanócitos causa um acúmulo desta proteína associada ao citoesqueleto de actina. Este acúmulo geralmente leva a uma inibição da captura periférica dos melanossomos, embora os mecanismos desta inibição ainda não estejam claros (Fukuda & Kuroda, 2004; Fukuda et al., 2004; Hume et al., 2007). Este achado sugere que o nível de Mlph em melanócitos é fundamental para transporte normal de melanossomos e que o aumento da concentração de Mlph tem efeito inibitório. A Mlph tem múltiplos domínios PEST (sítios propensos à degradação por proteases) em seu C-terminal que são potencialmente locais de sinalização para rápida degradação da proteína (Fukuda & Itoh, 2004). Merece destaque o fato que Mlph endógena é seletivamente degradada por calpaína dependente de Ca^{2+} e tripsina (Fukuda & Itoh, 2004). A remoção dos domínios PEST leva ao aumento da estabilidade da

Mlph *in vivo* e também a um acúmulo desta nos filamentos de actina, assim como a inibição da captura dos melanosomos na região cortical do melanócito. Estes dados sugerem que os domínios PEST são importantes na manutenção dos níveis endógenos de Mlph, permitindo uma captura eficaz dos melanosomos na periferia celular. Talvez meia vida do complexo Va/Mlph possa ser regulada por calpaína, já que ambas as proteínas apresentam o sítio PEST.

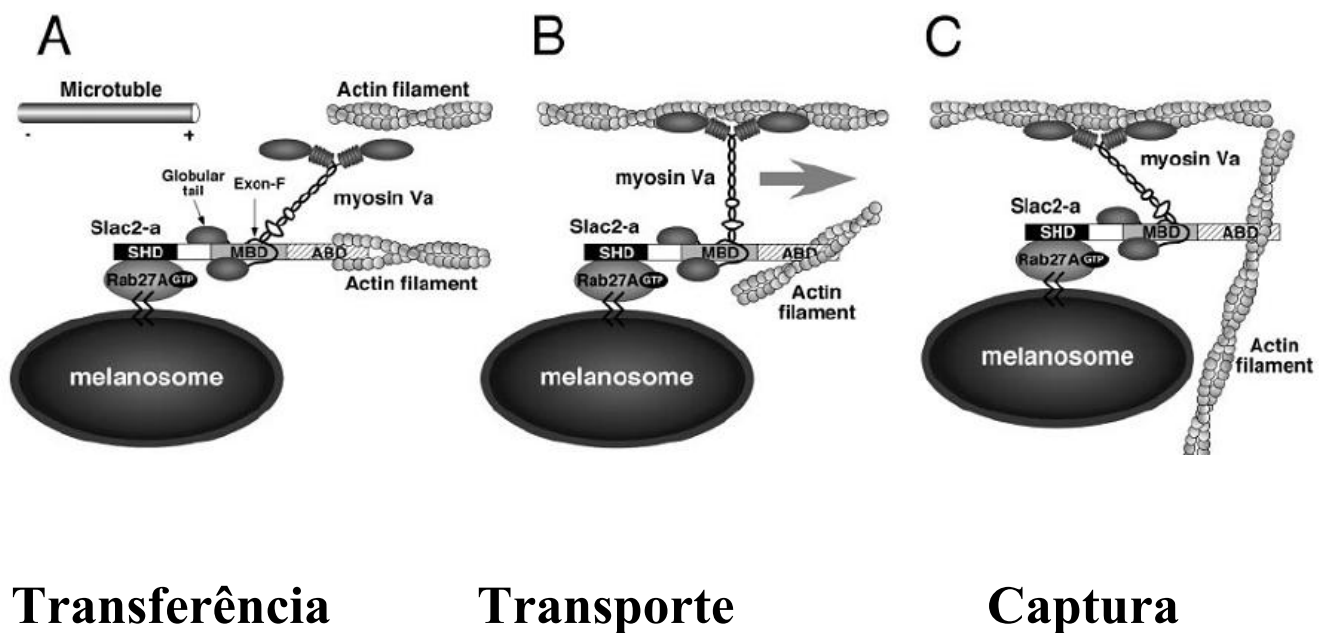


Figura 1.6. Representação esquemática da formação do complexo tripartido entre Rab27a, Mlph (aqui denominada Slac2-a) e miosina Va durante sua associação com actina. A ligação da Mlph à actina pode envolver três etapas: os melanosomos são transferidos dos microtúbulos para os filamentos de actina (A); os melanosomos são transportados ao longo dos filamentos de actina (B); e então os melanosomos são capturados pelos filamentos de actina na membrana plasmática (C). Note que o C-terminal da Mlph pode interagir diretamente com filamentos de actina [adaptado de (Kuroda et al., 2003)].

O N-terminal da Mlph foi recentemente cristalizado e sua estrutura resolvida por difração de raio-X (Kukimoto-Niino et al., 2008). Neste estudo, foi revelado o cristal da forma constitutivamente ativa da Rab27b complexado com GTP e o domínio Rab-efetor da Mlph. O complexo Rab27b/Mlph exibe diversas ligações intramoleculares de hidrogênio que não foram previamente observadas no complexo Rab3A/Rabfilina. Mutação na Rab27a que interrompe uma ligação de hidrogênio específica com a Mlph resulta em uma dramática redução na atividade de ligação da Mlph. Este estudo trouxe as bases estruturais para a associação exclusiva da Mlph com a subfamília da Rab27, enquanto a rabfilina se liga com diversas subfamílias, incluindo Rab3 e Rab27. O cristal da Mlph complexado com o mutante Rab27b (Q78L) revelou três áreas de contato na interface entre a Mlph e Rab27b. A primeira área de contato envolve a região *coiled-coil* no N-terminal da Mlph, a segunda é composta por duas regiões denominadas *switch* e *interswitch*, e a terceira pelo RabCDR da Rab27b (Tolmachova et al., 2004; Kukimoto-Niino et al., 2008). Estas regiões podem explicar a base estrutural de doenças humanas causadas por mutações na Rab27a e Mlph.

1.4 Doenças relacionadas à falha no transporte intracelular

Uma busca no PubMed e na base de dados de desordens Mendelianas (OMIM) mostra mais de 30 doenças ou desordens relacionadas a falhas na maquinaria transportadora. Estas desordens podem ser separadas em três categorias: defeitos na maquinaria responsável pela distribuição e transporte de vesículas em formação (**Anexo 1, categoria A**); desordens que atrapalham o movimento dos transportadores ao longo dos trilhos intracelulares (**Anexo 1, categoria B**) e defeitos na fixação e fusão de vesículas em regiões alvo na membrana celular (**Anexo 1, categoria C**).

Como descrito anteriormente, P150^{glued} é um componente central da dinactina. Mutações pontuais no gene DCTN1 que codifica esta proteína foram descritas em doenças neurodegenerativas, como em pacientes que sofrem de esclerose lateral amiotrófica (ELA) (Munch et al., 2004). Outra doença relacionada a uma falha no transporte intracelular é a doença de Charcot-Marie-Tooth tipo 2 (CMTA2A). CMTA2A é devido a uma mutação no domínio motor da KIF1B β , um motor molecular da família das cinesinas (Olikkonen & Ikonen, 2006). Estudos em camundongos heterozigotos Kif1B^{+/-} mostraram que mutação do gene que expressa Kif1B leva à disfunção do transporte anterógrado axonal nas células precursoras da vesícula sináptica, os camundongos são modelos para CMTA2A; diversos outros estudos reforçam a ideia que o distúrbio do transporte axonal é a maior causa da CMTA2A (Olikkonen & Ikonen, 2006). Um resumo das doenças correlacionadas com disfunção de proteínas envolvidas no transporte intracelular está na Tabela do Anexo 1.

1.4.1 Síndrome de Griscelli

A compreensão dos mecanismos moleculares relacionados à síndrome de Griscelli em humanos avançou com a utilização de modelos experimentais baseados em camundongos de mutação espontânea do gene para miosina Va, denominado de *dilute (dl)*; do gene para RAB27A, denominado de *ashen (ash)*; e do gene para melanofilina, denominado de *leaden (ln)*. Como dito anteriormente, estas mesmas mutações já foram encontradas em humanos, onde causam as síndromes de Griscelli do tipo I, II e III respectivamente (**Figuras 1.7 e 1.8**).

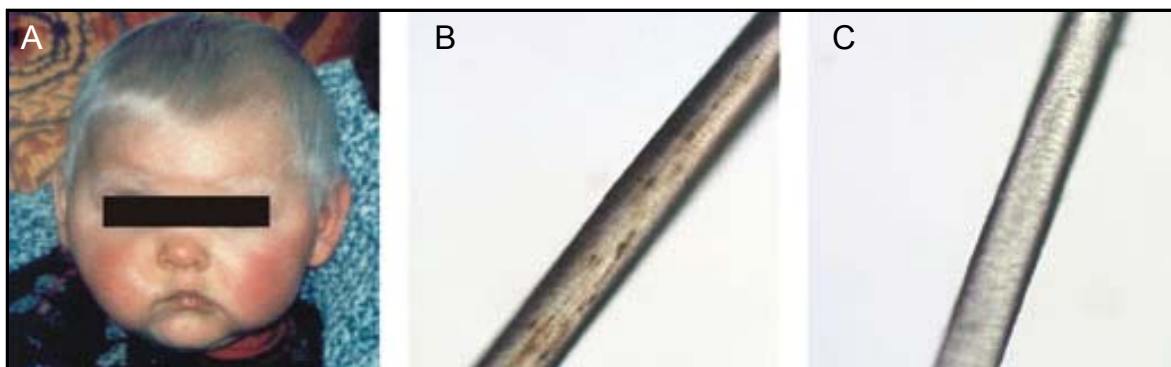


Figura 1.7. Características típicas da Síndrome de Griscelli. (A) Um paciente com Síndrome de Griscelli com sobrancelhas e cabelo com cor de prata; (B) Imagens de microscopia ótica mostrando grandes grumos de pigmento irregularmente distribuídos pelo fio do cabelo do paciente SG; e (C) um fio de cabelo humano normal [adaptado de (Van Gele et al., 2009)].

A síndrome de Griscelli do tipo I é caracterizada por uma baixa secreção e distribuição incompetente de melanossomos, por déficits neurológicos primários e por não apresentar transtornos relacionados ao sistema imune (Menasche et al., 2002; Bizario et al., 2004). A Griscelli do tipo I está diretamente relacionada com a mutação natural do gene da miosina Va em humanos (Provance, Jr. et al., 1996). A síndrome de Griscelli com comprometimento do sistema imune (tipo II), é causada por uma mutação no gene da Rab27A (Seabra et al., 2002; Bizario et al., 2004). A Griscelli do tipo III, caracterizada por uma hipopigmentação, sem comprometimento do sistema imune ou do sistema neurológico, é causada por uma mutação do gene da Mlph (Menasche et al., 2003) (**Figura 1.8**).

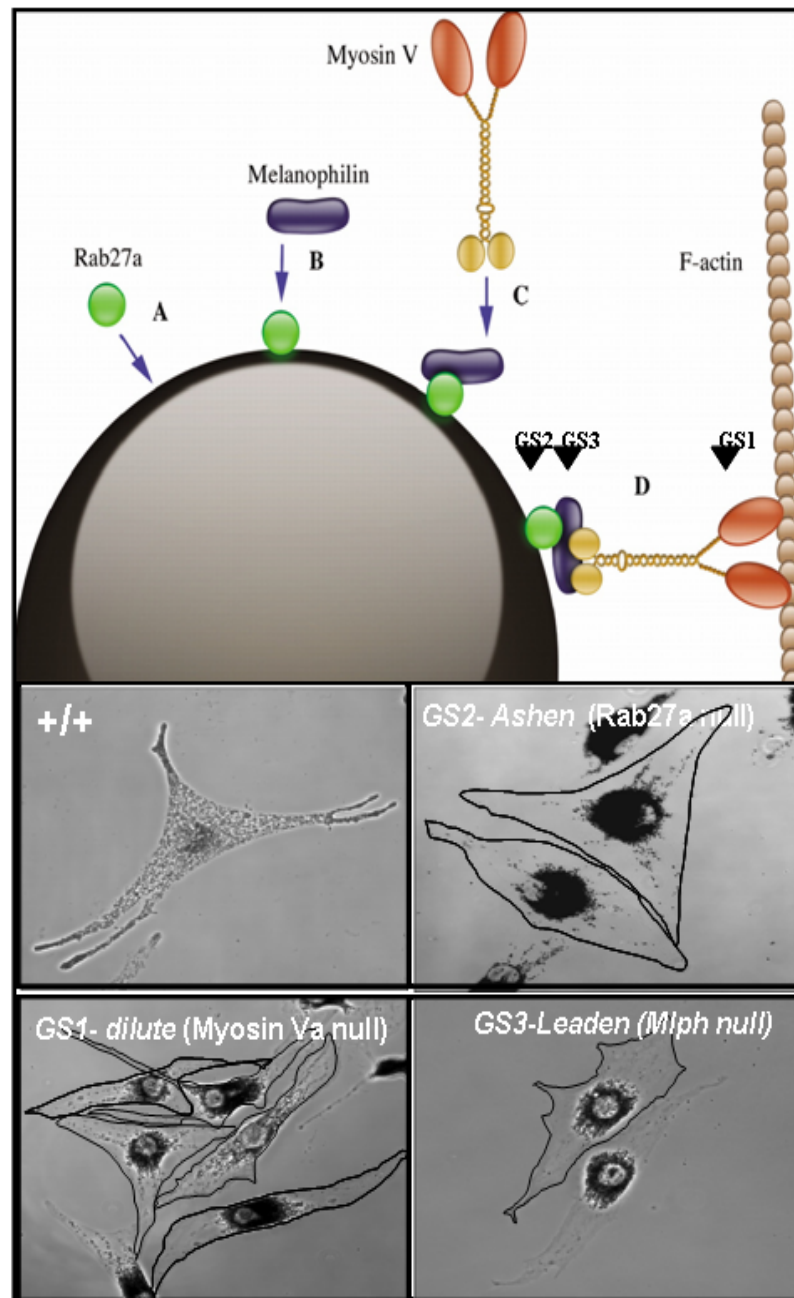


Figura 1.8. Recrutamento da miosina Va para ligação às membranas dos melanossomos em melanócitos selvagem (+/+), *ash*, *ln* e *dl*. Inicialmente, a Rab27a está presente na superfície do melanosomo (A), há então o recrutamento da Mlph (B), que por um mecanismo ainda não caracterizado, recruta miosina Va (C). Este recrutamento possibilita o acúmulo dos melanossomos nos prolongamentos dendríticos dos melanócitos através da associação do domínio motor da miosina Va com filamentos de actina no córtex celular (D). Um defeito em qualquer uma das proteínas causa diluição dos pigmentos como nas três formas de GS. O acúmulo de melanócitos na região perinuclear é o fenótipo em comum dos camundongos *ashen*, *leaden* e *dilute* (painel inferior). (painel superior (Nascimento et al., 2003)., e microscopia cedida por Dr. Hume))

Em 1998, Wu e cols, analisando melanócitos de camundongos *dilute*, descreveram um modelo de transporte denominado “cooperação de captura e entrega”, ou seja, após a síntese do melanossomo na região perinuclear do melanócito, ele é transportado anterógradamente via microtúbulo, em direção à periferia celular. Uma vez na periferia do melanócito, o melanossomo é entregue ao complexo actomiosina, que o captura e o posiciona para ser transferido para a membrana (Wu et al., 1998a).

Mais recentemente, um modelo de competição entre os motores moleculares foi sugerido, com a proposta de que o transporte de melanossomos ocorre em um sistema de “cabo-de-guerra” entre os motores da região do microtúbulo contra os da região perimembranar, pois na ausência do complexo actomiosina ocorre uma aglomeração de melanossomos na região negativa do microtúbulo, próxima ao núcleo, sugerindo que a dineína, a proteína responsável pelo transporte retrógrado do melanossomo, dominou o movimento (Wu et al., 1998b; Gross et al., 2002; Barral et al., 2002). O transporte da região positiva do microtúbulo para a membrana ocorre em três etapas: a Rab27a, ancorada ao melanossomo, recruta a Mlph, que na sua porção C-terminal interage com actina e na porção central interage com a miosina Va, dando início ao transporte do melanossomo (Barral et al., 2002). Todavia, os detalhes de como a Mlph recruta a miosina Va e a participação de outras proteínas no transporte de melanossomo ainda não estão claros.

1.4.1.1 O papel da Mlph no transporte de melanossomos

Somando-se ao *ashen* e ao *dilute*, um terceiro camundongo mutante, o *leaden*, também apresenta um defeito no transporte de melanossomos. O gene defeituoso no *leaden* é o que codifica a Mlph, uma proteína homóloga a outras proteínas previamente descritas como efetoras de Rab, a Rabphilin e a Rim (Matesic et al., 2001). A ausência de Mlph em melanócitos *leaden* resulta em uma alteração na atividade e motilidade da miosina Va, além de

uma conseqüente má distribuição de melanossomos na periferia do melanócito, embora a Rab27a continue ligada ao melanossomo (Hume et al., 2002). Entretanto, pouco sabemos sobre a estrutura e função da Mlph. Apenas a região N-terminal da Mlph é bem caracterizada. Pouca atenção vem sendo dada ao C-terminal da Mlph, principalmente aos processos de enovelamento, associação e dissociação desta região da proteína que liga à miosina Va e possivelmente a outras proteínas do citoesqueleto. A Figura 6 mostra a participação de todos os motores moleculares e seus efetores no transporte de melanossomos. Note que é necessário uma orquestrada entrega do melanossomo da extremidade positiva do microtúbulo para as proteínas do citoesqueleto de actina (Barral & Seabra, 2004).

1.5 Proteínas intrinsecamente desordenadas

Proteínas intrinsecamente desordenadas ou nativamente desenoveladas são proteínas ou regiões protéicas que não alcançam seu completo enovelamento, ou seja, não conseguem manter uma estrutura tridimensional (3D) em condições fisiológicas. Essas proteínas, também conhecidas como nativamente desnaturadas, têm regiões intrinsecamente desordenadas com importantes funções biológicas, mesmo não tendo uma estrutura 3D específica (Wright & Dyson, 1999; Romero et al., 2001; Sugase et al., 2007).

Dunker e colaboradores (2001) sugeriram que diversas funções celulares necessitam de proteínas com regiões desordenadas ou flexíveis que possibilitam mobilidade à proteína, ao invés de proteínas ordenadas e rígidas. Baseado nesses estudos, os modelos de tríade (Romero et al., 2001) ou quadra (Uversky, 2002) são novas alternativas para o clássico modelo: sequência primária-estrutura-função (Anfinsen, 1973).

Acreditava-se que a classificação estrutural de proteínas ordenadas variava entre estrutura secundária, representada por α -hélice e folhas β , e terciária, podendo ser toda α e toda

β , α/β ou $\alpha+\beta$. Entretanto, na última década diversos subtipos de estruturas intrinsecamente desordenadas distinguidos pela composição de seus aminoácidos e sua respectiva sequência foram documentados (Romero et al., 2001). Utilizando diferentes métodos, como difração de raios-X, RMN e dicroísmo circular, hoje sabemos que a estrutura de uma proteína pode ser constituída por um pequeno número de conformações com pequenas variações estruturais entre si que permitem que ela realize a sua função no organismo vivo. Um polipeptídeo só é capaz de enovelar-se quando a energia livre da estrutura nativa for menor que as energias livres de todos os estados desnaturados acessíveis.

Em 2008, o grupo do professor V.N. Uversky, da Universidade de Indiana, intitulou esta década “a década desenovelada” (*the unfoldomic decade*) (Dunker et al., 2008a), devido ao crescente número de descobertas relacionadas a proteínas intrinsecamente desordenadas. O novo paradigma sugere que proteínas nativas ou regiões funcionais podem existir em quatro formas: ordenadas, *molten globule* (desordenadamente colapsada), *pré-molten globule* (desordenamento estendido) e *random coil-like* (também desordenamento estendido). Acredita-se que as funções protéicas são oriundas dessas formas ou da transição entre elas (Uversky & Fink, 2002; Dunker et al., 2008b).

1.5.1 As chaperonas moleculares: os mestres do origami

Algumas proteínas recém sintetizadas têm de adquirir a sua estrutura tridimensional característica. Para a maioria das proteínas, apenas uma conformação é extremamente estável e possui as propriedades químicas exatas que permitem que a proteína desempenhe a sua função específica na célula. As proteínas são enoveladas de uma forma tão precisa que em alguns casos basta a mudança de um resíduo de aminoácido para perderem a função, como no caso da

Mlph. Quando uma alanina é trocada por prolina na posição 453. A Mlph a capacidade de enovelar-se na forma correta e de recrutar a miosina Va (Hume et al., 2006).

Entre vários modelos para o enovelamento de proteínas, um dos mais referendados é o modelo de nucleação. Acredita-se que resíduos vizinhos na sequência primária da cadeia polipeptídica formariam um núcleo de estrutura secundária, a partir do qual se propagariam as outras estruturas nativas (Fersht, 2000a). Em 1995, Ptitsyn sugeriu o modelo do colapso hidrofóbico. Este modelo pressupõe que inicialmente a proteína colapsaria em torno de suas cadeias laterais hidrofóbicas, rearranjando-se a partir do espaço conformacional ocupado pelo intermediário de enovelamento (Ptitsyn, 1995; Ptitsyn et al., 1999).

Embora esteja provado por experiências *in vitro* que toda a informação necessária ao correto enovelamento de uma proteína está contida na sua sequência polipeptídica (Anfinsen, 1973), hoje sabemos que o enovelamento nativo de proteínas dentro das células não é um processo espontâneo (Dobson & Karplus, 1999).

Ao longo dos últimos anos, as evidências são cada vez maiores de que muitas proteínas recém-sintetizadas necessitam de uma maquinaria celular complexa de chaperonas moleculares e energia metabólica para alcançarem os seus estados nativos eficientemente (Chen & Inouye, 2008). A questão que se coloca é a seguinte: se a informação para o enovelamento de uma proteína é inerente à sua sequência, então porque é que as chaperonas são necessárias? As chaperonas moleculares têm como função proteger as cadeias polipeptídicas nascentes, evitando o mau-enovelamento e agregação de proteínas. A agregação é um problema para as cadeias nascentes que ainda não adquiriram a sua estrutura nativa. Quando uma cadeia nascente é liberada do ribossomo, resíduos hidrofóbicos que normalmente estão protegidos no interior da proteína podem ficar expostos e a cadeia, em vez de se enovelar apropriadamente, pode se associar (agregar) a outras cadeias nascentes que possuam também resíduos hidrofóbicos expostos. Acredita-se que na célula as proteínas em estados não-nativos têm

grande tendência para agregar devido à elevada concentração local de proteínas nascentes nos poli-ribossomos. Como o citosol é um meio repleto de proteínas e outras macromoléculas, a propensão para a agregação de cadeias protéicas não-nativas encontra-se aumentada pela sua concentração efetiva. O “aglomeração macromolecular” (*molecular crowding*) fornece uma força não específica para a compactação e associação macromolecular que inclui o colapso de cadeias polipeptídicas durante o enovelamento.

A agregação remove proteínas irreversivelmente das suas vias produtivas de enovelamento e deve ser evitada *in vivo* pelas chaperonas moleculares (Hartl & Hayer-Hartl, 2002). O re-enovelamento espontâneo que ocorre *in vitro* após uma desnaturação branda é normalmente eficiente para proteínas pequenas com um único domínio. Os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos expostos são em milissegundos protegidos no seu interior, logo no início do enovelamento (Dobson & Karplus, 1999). Ao contrário, proteínas grandes, compostas por vários domínios, frequentemente enovelam-se de uma forma ineficaz, devido à formação de intermediários parcialmente enovelados, incluindo estados mal enovelados, que tendem a agregar (Dobson & Karplus, 1999). As células necessitam da atividade das chaperonas moleculares não só para prevenir a agregação de proteínas com conformação não-nativa, durante a aquisição da sua estrutura no momento da sua síntese, mas também para evitar e/ou reverter interações incorretas. As interações incorretas, por exemplo, podem ocorrer em condições de estresse, tais como temperaturas elevadas, que provocam o desenovelamento das proteínas, expondo superfícies que normalmente estão protegidas no interior.

A ligação a uma chaperona poderá não somente bloquear a agregação direta entre as moléculas através de proteção das superfícies interativas nos polipeptídeos não-nativos, incluindo as de subunidades não montadas, como também evitar ou reverter o mau enovelamento dentro da própria molécula. Além de protegerem áreas potencialmente reativas na sequência polipeptídica, as chaperonas funcionam também como catalisadores no processo

de enovelamento. Levando em conta que em uma bactéria, cujo tempo de duplicação pode estar abaixo de 30 minutos, são sintetizados mais de 30.000 polipeptídeos por minuto, a transposição das barreiras energéticas de estados de alta energia (polipeptídeos desenovelados) para estados de baixa energia (conformações nativas), induzida apenas por interações com o ambiente citosólico, não seria suficientemente rápida e eficaz para permitir a viabilidade celular, especialmente se considerados os polipeptídeos maiores que 30 kDa. Algumas chaperonas envolvem as cadeias, isolando-as total ou parcialmente do meio intracelular e criando o ambiente ideal para que a aquisição das conformações nativas (de alta para baixa energia) ocorra rapidamente e sem interferências (Dobson & Karplus, 1999; Hartl & Hayer-Hartl, 2002). Diversas chaperonas, embora sejam expressas constitutivamente, são sintetizadas em concentrações elevadas em condições de estresse e por isso são classificadas como proteínas de estresse ou de choque térmico (*heat-shock proteins* – Hsp). Porém existem chaperonas que não são proteínas de estresse, bem como existem proteínas de choque térmico que não são chaperonas. Existem chaperonas que são específicas para uma função, como por exemplo, o *trigger factor* (TF), e outros que são multivalentes e atuam em vários processos como as Hsp70. As chaperonas assistem uma vasta variedade de processos, como por exemplo: 1) enovelamento de proteínas nascentes e recém sintetizadas; 2) desagregação de proteínas; 3) transdução de sinais; 4) translocação de proteínas do citoplasma para organelas; 5) controle de qualidade das proteínas; 6) montagem de complexos protéicos (Hartl & Hayer-Hartl, 2002).

O ribossomo, organela responsável pela tradução das cadeias polipeptídicas, possui uma subunidade grande cujo comprimento do canal de saída do polipeptídeo é de 100 Å – o comprimento de uma cadeia distendida com cerca de 30 resíduos de aminoácidos ou uma hélice α com cerca de 65 resíduos (Nissen et al., 2000b). A largura do canal tem em média 15 Å, e em princípio, enovelamentos além de pequenas hélices não são espacialmente permitidos dentro do ribossomo (Nissen et al., 2000a). O TF, as Hsp70s e a prefoldina são chaperonas que

se ligam a cadeias polipeptídicas nascentes. Estas chaperonas são responsáveis pela estabilização das cadeias em elongação nos ribossomos, assegurando que se mantenham num estado não agregado. No citoplasma, o processo de enovelamento da cadeia polipeptídica prossegue com a liberação controlada dos fatores que se associam ao ribossomo ou através da transferência das proteínas recém-sintetizadas para outras chaperonas como, por exemplo, as chaperoninas.

Os membros típicos da família Hsp70 são chaperonas monoméricas que não ligam ao ribossomo e se encontram presentes tanto no citosol de células eucarióticas e bacterianas e de algumas arqueobactérias, como em organelas de eucariotos como mitocôndrias e retículo endoplasmático. As Hsp70 promovem o processo de enovelamento de segmentos peptídicos hidrofóbicos expostos pelas proteínas nos seus estados não nativos, através de ciclos de ligação/liberação do substrato regulados pela sua própria atividade ATPásica e por proteínas co-fatores. O ciclo de ligação/liberação do substrato é conduzido pela mudança entre o estado de baixa afinidade para o ATP e o estado de elevada afinidade para o ADP (Young et al., 2004). Este ciclo é controlado tanto por co-chaperonas da família das Hsp40 (DnaJ), que dirigem as Hsp70 para os seus substratos, como por fatores permutadores de nucleotídeos que determinam o tempo de vida do complexo Hsp70-substrato.

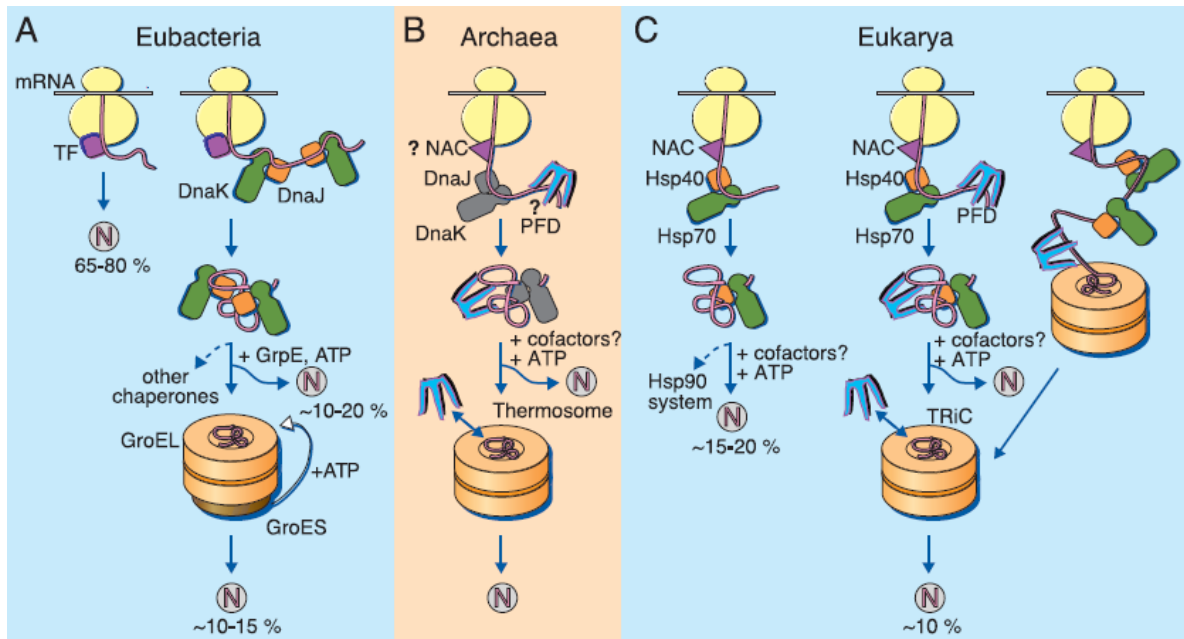


Figura 1.9. Modelo do enovelamento de proteínas assistidas por chaperonas no citosol. (A) Eubactéria. TF, Trigger Factor; N, proteína nativa. TF interage com a maioria das pequenas proteínas recém sintetizadas (~65 a 80%) para um rápido e direto enovelamento. Longas cadeias (~10 a 20%) necessitam da interação com DnaK e DnaJ (termo para Hsp70 em bactérias) que as enovelam via subsequentes ciclos ATPásicos. Cerca de 10 a 15% transitam pelo sistema chaperonina GroEL e GroES para enovelamento após se ligarem a DnaK e DnaJ. (B) Archaea. PFD, prefoldina; NAC, complexo associado à cadeia-nascente. Apenas algumas archaeas contêm o sistema DnaK e DnaJ e possivelmente há interação entre PFD e NAC nestes organismos. (C) Eucarioto –exemplo de uma célula de mamífero– Como os TF, os NAC provavelmente interagem com proteínas recém sintetizadas. Todavia, a maioria das proteínas alcança seu enovelamento sem assistência. Cerca de 15 a 20% alcançam seu enovelamento por interação com Hsp70 e Hsp40, e uma fração destas proteínas precisam ser transferidas para Hsp90 para o enovelamento. Cerca de 10% das cadeias necessitam da interação com a PFD para enovelar-se [adaptado de (Hartl & Hayer-Hartl, 2002)].

1.5.1.1 O papel da prefoldina

A prefoldina (PFD) parece agir especificamente em conjunto com CCT (*chaperonin containing TCP-1*), enquanto a Hsp 70 parece se ligar de forma inespecífica em diferentes classes de substratos, embora suas funções se sobreponham (Nelson et al., 1992). A PFD foi descrita e caracterizada também em arqueobactéria e também é conhecida por complexo GimC (Genes envolvidos na biogênese de microtúbulos). Assim como seu parceiro molecular CCT, PFD evoluiu de um simples oligômero em arqueobactéria para uma complexa união de proteínas em eucariotos e está presente no citosol de diferentes tipos celulares. Dados de cristalografia da PFD de *Methanobacterium thermoautotrophicum* associados a análise de microscopia eletrônica da PFD de eucariotos (bovino e humano), mostram que esta chaperona é um hexâmero de ~90 kDa, formado por duas subunidades α e quatro subunidades β , que se projetam de um duplo barril β (**Figura 1.10**). A arquitetura desta proteína lhe oferece a aparência de uma água viva. No caso da PFD de arqueobactéria, as subunidades α e β não são idênticas, mas são ortólogas (Siegert et al., 2000). Em eucariotos a PFD também consiste de seis subunidades de dois parólogos (Pfd 3 e Pfd 5) e quatro do tipo β (Pfd1, Pfd2, Pfd4 e Pfd6) (Martin-Benito et al., 2002) (**Figura 1.10**).

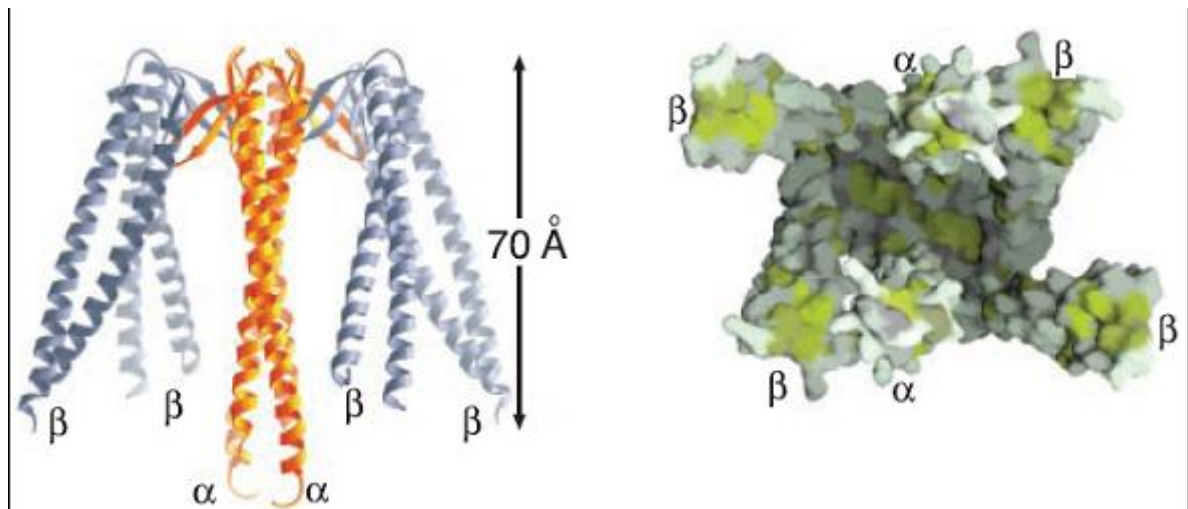


Figura 1.10. Estrutura baseada no cristal da PFD de Archaea. (Esquerda) Visão lateral e dimensões da PFD com duas subunidades α mostrada em dourado e quatro subunidades β em cinza. (Direita) Visão inferior do complexo PFD mostrando o espaço central formado pelos seis segmentos em *coil-coiled*. A representação de sua superfície mostra os resíduos hidrofílicos em verde claro e os resíduos hidrofóbicos em verde escuro [adaptado de (Siegert et al., 2000)].

Siegert e colaboradores (2000) mostraram por microscopia eletrônica, que quanto maior o peptídeo a ser enovelado, mais subunidades da PFD são recrutadas para atuar como chaperona (Siegert et al., 2000). Martín-Benito e colaboradores (2007), baseado em estrutura de alta-resolução do mesmo complexo e em simulações, localizaram a região de ligação do substrato na fenda hidrofóbica formada por protruções de subunidades β , como a Pfd4. Neste modelo, as subunidades α mudam de conformação dependendo do tamanho e natureza do substrato, e estes rearranjos poderiam modular a capacidade de ligação do complexo. Estas características poderiam explicar a grande variedade de substratos específicos enovelados pela PFD de arqueobactéria, diferentemente da pequena variedade de substratos para PFD de eucarioto (Martin-Benito et al., 2007).

Proteínas do citoesqueleto, como actina e α e β -tubulinas, passam por uma série de interações durante a maturação e após sua síntese. No caso da actina, sua cadeia nascente se liga com a PFD para a síntese dos seus primeiros 115 aminoácidos. Uma vez unido, o complexo actina PFD permanece unido até a actina estabelecer sua forma nativa. O mesmo processo ocorre com α e β -tubulina ligada a PDF (Hansen et al., 1999b). A interação da PFD com actina diminui em duas vezes em células de hepatocarcinoma, sugerindo que a interação da PFD com actina estabiliza a formação normal do citoesqueleto, garantido a homeostase celular (Chang et al., 2006).

A PFD interage com seus alvos moleculares em diversos pontos, seja no processo de tradução, na recuperação de proteínas desenoveladas pelo calor ou estresse ou regulando a estabilidade de proteínas no citosol. Aqui nós mapeamos o sítio de interação da Mlph com a Pfd4 e mostramos que a Mlph apresenta diversos domínios desestruturados; excelentes alvos para ação de chaperonas.

Capítulo 2 - Objetivos

2 Objetivo

Uma importante característica é a habilidade da melanofilina de recrutar diversos “parceiros” através dos seus múltiplos domínios, característica que a torna chave na regulação dos motores moleculares. O mecanismo pelo qual o complexo tripartido entre Rab27a, melanofilina e miosina Va é formado e se a melanofilina recruta outras proteínas do citoesqueleto até hoje não é claro. Desta forma o principal objetivo desta tese é caracterizar a participação do C-terminal da melanofilina no recrutamento da miosina Va e buscar novos parceiros moleculares que possam se ligar a e modular a ação da melanofilina.

2.1 Objetivos específicos:

- 1- Buscar em uma biblioteca de melanócitos proteínas candidatas a interagir com a Mlph;
- 2- Obter diferentes fragmentos de Mlph com e sem a porção C-terminal, para avaliarmos a relevância desses resíduos de aminoácidos na interação com a miosina Va e com proteínas candidatas a interagir com Mlph;
- 3- Avaliar a estrutura da porção central e C-terminal da Mlph.

Capítulo 3 - Materiais e Métodos

3 Materiais e Métodos

3.1 Reagentes

Todos os reagentes foram obtidos da Sigma-Aldrich, BDH, Fischer Scientific, Promega, Pharmacia ou Qiagen.

3.1.2 Tampões e soluções de estoque

10x PBS: 80 g NaCl, 2 g KCl, 2,4 g KH₂PO₄, 14,4 g Na₂HPO₄; completar para 1 litro com dH₂O. Diluir 10X antes de usar.

10x tampão TBE: 242g Tris base, 57 mL de ácido acético, 100 mL 0,5 M de EDTA pH 8, completar para 1 litro com dH₂O.

10x tampão de carregamento para gel de agarose: 0,25% bromofenol azul, 0,25% de Xileno cianol FF, 15% Ficoll (tipo 400 da Pharmacia) em dH₂O.

Ditiotreitol 1 M (DTT): Dissolver 3,09g DTT em 20 mL de 0,01 M acetato de sódio, pH 5,2 e filtrar.

IPTG 100 mM (isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo): 500 mg IPTG em 20 mL dH₂O e filtrar.

SDS-PAGE tampão de corrida: 3,03 g Tris base, 14,4 g glicina, 1 g SDS, completar para 1 litro com dH₂O.

6x tampão de carregamento para SDS-PAGE: 3,6 ml 100% glicerol, 3,5 ml, Tris 1 M pH 6,8, 1,2 g SDS, 2mL β -mercaptoetanol, 0,015 g azul de bromofenol e completar para 10 mL com dH₂O.

Tampão de transferência molhado: 5,8 g Tris base, 3g glicina, 200ml metanol e completar para 1 litro com dH₂O.

Tampão de transferência semi-seco: 2,905 g Tris base, 1,465g glicina, 0,1875 g SDS, 100 mL metanol e completar para 500 mL com dH₂O.

Solução de corar com Coomassie: 0,25 g de Coomassie azul brilhante R250 dissolvido em 90 mL de metanol: dH₂O (1:1 v/v) e 10 mL de ácido acético.

Solução de descorar: 50 mL ácido acético 100%, 150 mL de metanol e completar para 500 mL com dH₂O.

3.1.3 Meios de cultura para bactéria

Todas as bactérias cresceram a 37°C.

Meio LB: 10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 5 g de NaCl, pH 7,0 (com NaOH) e completar para 1L com dH₂O; autoclavar.

LB agar: 7,5 g de agar em 500 mL de meio LB. Autoclavar.

3.1.4 Meios de cultura para levedura

A levedura cepa L40 cresceu a 30°C

2x Meio de Extrato de Levedura-Peptona-Dextrose (YPAD): 20 g de extrato de levedura, 40 g de peptona dissolvido em 900 mL dH₂O. Autoclavar.

1x Meio YPD: 250 mL 2x YPD, 50 mL 20 % D-glicose, 250 mL dH₂O.

2x Meio de Levedura Completo (YC) –His-Trp-Leu: 2,4 g de base nitrogenada de levedura (sem aminoácidos e sulfato de amônia), 10 g de sulfato de amônia, 20 g de ácido succínico, 12 g de NaOH, 2,8 g de meio sintética de levedura, 900 mL dH₂O. Autoclavar.

1x Meio de Levedura Completo (YC) –His-Trp-Leu: 250 mL de 2x meio de levedura completo (YC) –His-Trp-Leu, 50 mL de D-glicose 20% e 250 ml dH₂O.

1x Meio Sólido Completo (YC) –His-Trp-Leu: 250 mL de 2x meio de levedura completo (YC) –His-Trp-Leu, 50 mL de D-glicose 20%, 250 mL de agar 3%.

1x Meio Sólido Completo (YC) -Trp-Leu: 250 mL de 1x meio de levedura completo (YC) –His-Trp-Leu, 250 mL de agar 3%, 1,5 mL mM de histidina.

3.2 Protocolos de biologia molecular

3.2.1 Reação em cadeia pela polimerase (PCR) de fragmentos de DNA

A reação de PCR característica contém os seguintes reagentes:

5 μ L de tampão Pfu turbo (Stratagene),

0.25 mmol de cada dNTP,

10 pmol de *primer* anterogrado

10 pmol de *primer* reverso

10-100 ng da amostra de DNA.

1 unidade de Pfu (Stratagene)

Completar para 50 μ L com dH₂O estéril

O programa de PCR característico utilizado foi:

5 min para desnaturação a 95°C,

1 min para desnaturação a 95°C (30 ciclos),

1 min para anelamento do *primer* a 53-57°C (30 ciclos),

1 min para extensão/500 pares de base a 68°C (30 ciclos),

Seguido de um passo final para extensão a 68°C por 10 min.

Todos as PCRs foram feitas em tubos eppendorf de 0.5 mL em um termociclador HybRaid Touchdown. Os produtos da reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose variando de 0,8-1,5% contendo 200 ng/mL de brometo de etídeo. Os géis de

eletroforese correram por 45 min a 100 mA e o DNA foi visualizado usando luz UV em um transiluminador (**Figura 3.1**).

3.2.2 Digestão do DNA por endonucleases (enzimas) de restrição

Um dos objetivos da clonagem de DNA é obter pequenas regiões do DNA que constituem um determinado gene do organismo/tecido em questão, que posteriormente serão clonadas nos vetores disponíveis. Para isso utilizamos endonucleases que reconhecem sítios específicos de clivagem definidos pela sequência de nucleotídeos, esta estratégia nos permite clivar um fragmento de DNA de um determinado gene para posteriormente cloná-lo em outro gene de interesse.

Nesta tese, a digestão por enzimas de restrição foi feita em um volume de 20 µL com volumes apropriados de 10x tampão de reação (Invitrogen), substrato de DNA (1 µg), água estéril e endonucleases de restrição (Invitrogen) para se ter pelo menos 1 unidade de enzima por µg de DNA. A digestão foi incubada a 37°C de 2 h a 12 h e o perfil da digestão foi determinado por eletroforese em gel de agarose (**Figura 3.1,C**).

3.2.3 Extração e purificação dos fragmentos de DNA do gel de agarose

A extração do DNA direto do gel de agarose nos permite obter o DNA isolado, proporcionando maior pureza e concentração deste produto. Para isso, os fragmentos de DNA foram cortados dos géis de agarose e o DNA eluído usando o *kit* de extração de gel QIAquick (Qiagen), seguindo o protocolo disponibilizado pelo fabricante.

3.2.4 Ligação dos fragmentos de DNA

Após obtermos os fragmentos de DNA puro (inserto), podemos ligá-lo no vetor de interesse através da reação enzimática da T4 DNA ligase. A reação de ligação do DNA foi feita em um volume de 20 μ L contendo 10 ng de vetor para DNA. Dois vetores foram utilizados com a razão molar de 1 vetor para 5 ou 10 de inserto. As reações consistiam de 4 μ L 5x tampão de ligação (Invitrogen), 1 μ L (1 unidade) de T4 DNA ligase (Gibco) e os volumes apropriados de inserto e vetor de DNA. Controles para a ligação foram feitos com vetor sozinho. A reação foi misturada, incubada por 4 a 12 h a 16°C.

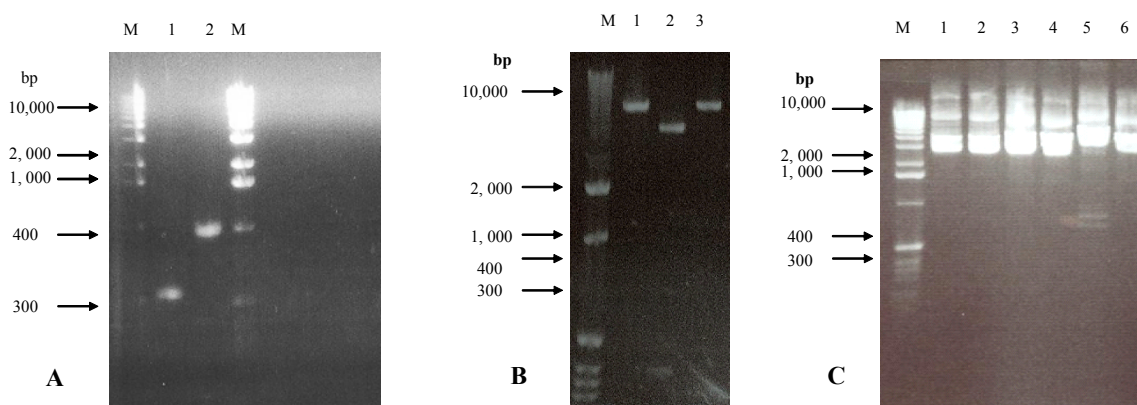


Figura 3.1 Gel de agarose 1% com ampliações ilustrativas de um dos genes alvos. (A) Inseto: Mlph150-483 (coluna 1), Mlph300-483 (coluna 2); (B) Vetor pGEX intacto (colunas 1 e 3) e, após digestão por EcoRI/XhoI (coluna 2) e (C) Após a ligação entre vetor e inserto, os produtos da digestão pGEX-Mlph foram analisados para confirmação dos possíveis clones recombinantes, o vetor pGEX e o inserto Mlph foram separados pelas enzimas de restrição EcoRI/XhoI (1-6). M, Marcadores de massa molecular 1 kb DNA (Invitrogen).

3.2.5 Transformação de *E.coli* competente

Células *E.coli* BL21 competentes (Novagen) (gentilmente cedidas pela Dr. Katarina Miamoto da UFRJ) foram descongeladas a 4°C. 20 µL foram incubadas com 1 µL (~1 µg) de DNA durante 30 min no gelo e depois submetidas a choque térmico (42°C) por 45 s e recolocadas no gelo por 2 min. Após a adição de 100 µL de meio LB, as células se recuperaram por 1 h a 37°C sob constante agitação a 300 rpm. As amostras foram plaqueadas em placas de Petri LB Agar contendo o antibiótico de interesse (50 µg/mL de ampicilina ou 33 µg/mL de kanamicina). As placas foram invertidos e assim incubados a 37°C por 12-16 h.

Células competentes XL-10 (Novagen) também foram utilizadas para expressar proteínas onde a única diferença no protocolo foi que antes da adição do DNA foi adicionado 1 µL de β-mercaptoetanol.

3.2.6 Preparação do DNA em pequena escala

Após a transformação do DNA de interesse em bactéria, o passo seguinte é purifica-lo para então o produto de DNA puro ser aliquotado e guardado a -20°C para experimentos posteriores. Para isso 5 mL de meio LB contendo 50 µg/mL de ampicilina ou 33 µg/mL de kanamicina, foram incubados com uma única colônia de bactéria retirada das placas de Petri de LB Agar. As bactérias transformadas cresceram a 37°C por 12-16 h sob constante agitação a 300 rpm e foram colhidas após centrifugação a 16.200 x g por 10 min. O precipitado de bactéria foi lisado em tampão alcalino e o DNA purificado com *kit* miniprep da Quiagen, seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante.

3.2.7 Mutação sítio dirigida dos construtos de melanofilina

A mutação sítio dirigida foi utilizada como estratégia para inserimos uma prolina no lugar de uma alanina em diferentes porções do C-terminal da Mlph. Esta mutação teoricamente desestabiliza a estrutura nativa desta região, e nos permitirá avaliar a importância do C-terminal da melanofilina no recrutamento dos seus parceiros moleculares.

Os construtos mutados de Mlph foram gerados usando um *kit* de *Stratagene Quickchange site-directed mutagenesis*. Oligonucleotídeos foram desenhados para conter os apropriados *mismatches* para introduzir a mutação; flanqueados por pelo menos 12 pares de base de sequência complementar. A mistura de PCR continha:

- 1-10 ng do plasmídeo de interesse
- 5 μ L de tampão Pfu turbo
- 0,25 mMoles de cada dNTP,
- 10 pMoles de primer anterógrado
- 10 pMoles de primer reverso
- 10-100 ng da amostra de DNA.
- 1 unidade de Pfu turbo
- completados para 50 μ L de dH₂O estéril.

O programa de PCR característico utilizado foi:

- 5 min para desnaturação a 95°C,
- 1 min para desnaturação a 95°C (13-15 ciclos),

1 min para anelamento do *primer* a 53-57°C (13-15 ciclos),

1 min para extensão/500 pares de base a 68°C (13-15 ciclos),

Seguido de um passo final para extensão a 68°C por 15 min.

A amostra de DNA selvagem metilada que restou no tubo de PCR foi removida com 1 µL de DpnI endonucleases de restrição (Invitrogen) por 12 h a 37°C. 1 µL da reação de PCR que foi tratada com DpnI e então transformada em células ouro XL-10 e o DNA foi extraído como descrito anteriormente (§ 3.2.3).

A sequência do construto foi confirmada pelo centro ABC de sequenciamento (Imperial College London).

Tabela 3.1 Lista dos *primers* utilizados para produção dos construtos

Nome do construto produzido	Amostra e origem	Sequência do Primer	Sítios de restrição do vetor	Sítios de restrição
pGEX Mlph 150-590 a.a.	Mlph 150-590 Laboratório Miguel Seabra	Mlph antisense 590 5_ - CGGAATTCCTCGAGTTAGGGCTGCTGGGCCATCAC- 3_;	pGEX EcoR1/Xho1	EcoR1/X ho1
pMAL-c2XMyoVa MSGTA (1260-1853 a.a.)	pMAL-c2X MSGTA (New England Biolabs, Beverly, MA)	Gentilmente cedido pelo Dr. Alistair Hume.	pMAL EcoRI/SalI	EcoRI/S all
pMAL Pfd4 (1-134 a.a.)	pMAL-c2X MSGTA (New England Biolabs, Beverly, MA)	Pfd4 antisense 5_ - GGCCGAATTCGCTTTCATCATCTGCCTCGAGGT3_;	pMAL BamH/ EcoR1	BamH/ EcoR1

3.3 Eletroforese (SDS-PAGE)

Os géis de eletroforese foram produzidos usando *kits* de eletroforese da Hoefer ou da BioRad. A receita a seguir é suficiente para produzir dois géis (10 x 8 cm).

Os géis de corrida foram feitos com 12% de poliacrilamida.

4 mL acrilamida 40%

2,5 mL 1,5 M Tris (pH 8.8)

100 μ L de SDS 10%

3,3 mL H₂O

10 μ L de persulfato de amônia (PSA) adicionado logo antes da montagem e

4 μ L de TEMED.

O gel empacotamento foi feito com poliacrilamida 5%.

840 μ L de acrilamida 40%

625 μ L 1 M Tris (pH 6.8)

50 μ L de SDS 10%

3,37 mL dH₂O

50 μ L de PSA 10% adicionado logo antes da montagem e

4 μ L de TEMED

As amostras de proteínas foram misturadas a tampão de carregamento SDS 6x concentrado, e fervidas por 5 min antes de carregadas no gel. Os géis de eletroforese correram a 35 mA por gel em 1x tampão de corrida por aproximadamente 1 h.

3.4 *Western Blotting*

3.4.1 Transferência de proteínas para membrana de difluorido de polivinilideno (PVDF)

As membranas de PVDF foram umedecidas em metanol por 2 min antes de serem equilibradas no tampão de transferência úmido por 30 min. Três pedaços de 10 x 8 cm de papel de filtro Whatman (3 mm de espessura) foram umedecidos no tampão de transferência e colocados no cassete de transferência seguidos pela membrana de PVDF, o gel de poliacrilamida e finalmente os últimos 3 pedaços de papel de filtro, para então fecharmos o cassette. Todas as bolhas de ar foram removidas e o cassete foi colocado na câmara de transferência da Hoefer ou Biorad com a membrana de PVDF direcionada ao anodo, e transferido a 500 mA por 2 h.

3.4.2 Imunodeteccção das proteínas

As membranas foram bloqueadas em 5% leite em pó/PBS/0,2% Tween por 1 h e lavadas com PBS/0,2% Tween antes da incubação com anticorpo primário diluído em 10 ml PBS/0,2% Tween em temperatura ambiente por 3 h a 12 h. As membranas foram lavadas pelo menos 6 vezes em PBS/0,2% Tween em intervalos de 5 min antes de serem incubadas com 1 μ L de anticorpo secundário conjugado com peroxidase de raiz forte (HRP) diluído em 10 mL PBS/0,2% Tween também em temperatura ambiente por 1 h. As membranas foram lavadas antes de reagir com substrato SuperSignal West Pico quimioluminescente (Pierce) por 10 min e os sinais foram detectados usando hiperfilme ECL (Amersham Biosciences) processado em uma câmara escura e revelado em uma reveladora automática Xograph compact X4 ou com soluções de fixar e revelar apropriadas. A Tabela 3.2 lista todos os anticorpos utilizados.

Tabela 3.2 Concentração dos anticorpos usados para imunodeteccção

Nome	Espécie	Fonte	Diluição
α -his ₆ clone HIS1	Rato	Laboratório M.Seabra	1 em 5000
8D1 (α -GST)	camundongo	Laboratório M.Seabra	1 em 5000
α -miosina Va (A3A4)	coelho	Laboratório M.Seabra	1 em 1000
α -His ₆ CLONE HIS1	camundongo	Sigma	1 em 1000
α -MBP	coelho	BioLabs	1 em 1000
α -LexA	camundongo	Sigma	1 em 1000

Os anticorpos secundários conjugados com HRP (*goat anti-mouse e goat anti-rabbit*) para Western blotting foram comprados junto a DAKO, USA.

3.4.3 Detecção de proteínas por coloração em azul de Coomassie

Os géis foram submersos em pelo menos duas vezes seu volume em solução de Coomassie (v.§ 3.12) e incubados por 30 min em temperatura ambiente sob leve agitação. A solução de Coomassie foi substituída pela solução de descorar, que foi trocada até que todo o excesso de Coomassie fosse removido.

3.4.4 Detecção de proteínas por coloração por prata

Para detectarmos concentrações de proteínas na ordem de pmoles, coramos os géis com prata, que é mais sensível que coloração por azul de comassie.

Os géis foram submersos em 50% metanol (15 min), seguido de 5% metanol (15 min) e por último em DTT (8 µL de 1 M de DTT para 250 de dH₂O) (15 min). Então o gel foi lavado com dH₂O e submerso em 0,1% (w/v) AgNO₃ (15 min), lavado e revelado.

Solução de revelar:

7,5 g Na₂CO₃

125 µL formaldeído

250 mL H₂O

O gel ficou na solução de revelar até as bandas ficarem escuras o suficiente, e a reação foi parada adicionando sobre o gel ácido cítrico em pó.

3.5 Produção e purificação de proteínas recombinantes

Como estratégia para detectarmos interação entre proteínas recombinante *in vitro*, clonamos e expressamos diferentes proteínas em diferentes *tags*, o que nos possibilita identificarmos a interação entre proteínas utilizando anticorpo contra a proteína ou contra o *tag* de interesse.

Primeiramente, para a expressão das proteínas recombinantes de interesse, os plasmídeos foram transformados em células competentes *E. coli* BL21 (DE3) e em meio resistente a ampicilina (Amp). Os plasmídeos utilizados foram o pGEX (que expressa GST, glutationa S-transferase), o pMAL (MBP, proteína de alta afinidade pela maltose) e o pET14b (cauda contendo 6 histidinas).

Uma colônia de bactéria resistente a Amp foi inoculada em 50 mL de meio LB líquido com 50 µg/mL de Amp. O pré-inóculo foi incubado *overnight* em agitação constante de 300 rpm a 30°C. O pré-inóculo foi adicionado a 2 litros de meio LB 50µg/ml de Amp e incubado sob agitação (300 rpm), a 37°C por aproximadamente 3 h, o tempo médio para alcançar uma densidade ótica em 600 nm ($D.O_{600}$) entre 0,6 e 0,8. A expressão da proteína foi então induzida com 0,5 mM (ou 0,1 mM para Mlph) de IPTG a 37°C (ou 30°C para Mlph) sob agitação de 300 rpm por mais 2 h.

Depois de induzidas, as células da cultura foram centrifugadas a 10.000 g por 15 min e o precipitado (células) foi lavado com PBS. A preparação tanto pode ser utilizada para purificação imediata ou pode ser congelada em nitrogênio líquido e guardada a – 80°C.

3.5.1 Purificação da proteína ligada a MBP, His₆ e a glutationa S-transferase (GST).

De agora em diante, todas as etapas ocorrem no gelo. O precipitado é ressuspenso em tampão fosfato (137 mM de NaCl, 10 mM de fosfato, 2,7 mM de KCl, pH 7,4), para as proteínas fusionadas a MBP e GST, ou tampão para ligação de níquel (imidazol 20 mM, HCl 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7,9) para as proteínas fusionadas a His₆ (v. § 3.5.2). Acrescentou-se um coquetel de inibidores de proteases (10 µg/mL de aprotina, leupeptina e pepstatina). As bactérias foram lisadas por sonicação durante 30 s com *duty cycle* de 50% e 22 mA de amplitude. Este processo foi repetido por 3 vezes com 1 min de intervalo entre cada sonicação. O material foi então transferido para tubos de 30 mL e centrifugado a 100.000x g a 4°C por 1 h.

A partir dessa fase, os processos para preparação das proteínas fusionadas se diferem. O S100 (sobrenadante após centrifugação a 100.000x g) é coletado e incubado com suas respectivas resinas por tempos que variam de 1 a 3 horas. A purificação é feita por cromatografia de afinidade em colunas de níquel (Amersham Pharmacia), amilose (New England BioLabs) e glutationa Sefarose (Amersham Pharmacia), para as proteínas fusionadas a His₆, MBP e GST, respectivamente. O S100 das proteínas fusionadas com GST é incubado com esferas de glutationa-sefarose (GSH), as fusionadas com MBP são incubadas com esferas de amilose, as proteínas fusionadas com His₆ são incubadas com esferas de níquel (1ml de níquel por Litro de LB) por (Ni-NTA). As esferas são transferidas para uma coluna *polyprep* (Bio-Rad), o primeiro volume de eluição (*Flow Through*) é preservado. A coluna é lavada com tampão de lise (sem inibidor de protease) para que sejam desfeitas todas as ligações inespecíficas e para que a proteína fusionada fique pura. As lavagens são testadas por coloração com Bradford, para detectar proteínas contaminantes até que não haja mais reação.

Após a lavagem, é feita a eluição, que consiste em desfazer a ligação dos *tags* com suas resinas para recolher a proteína de interesse pura. A ligação do tag GST com as esferas de glutationa é desfeita por tampão contendo 10 mM de glutationa reduzida. A ligação do

MBP com amilose, é desfeita por tampão contendo 10 mM maltose e a ligação da His com o níquel é desfeita com tampão de maior força iônica (aumentando a concentração de imidazol para 250 mM). Após a purificação as proteínas são dialisadas contra 1 litro de seus respectivos tampões (sem inibidor de protease) por 2 dias; trocando o tampão após as primeiras 24 h.

São recolhidas amostras de todas as fases da expressão e purificação para serem analisadas em gel SDS PAGE com 12% de poliacrilamida (Figura 3.3) e as amostras são concentradas utilizando o concentrador de proteínas Centricon (Amicon).

3.5.2 Purificação de His₆ por cromatografia líquida de alta resolução (FPLC)

O precipitado induzido para produção de proteínas fusionadas His₆ foi ressuspenso em 40 ml de tampão de lise (Tris 20 mM pH 7,5, NaCl 500 mM, MgCl₂ 5 mM, β-mercaptoetanol (BME) 1 mM) e um coquetel de inibidores de proteases completo (Roche).

As células foram lisadas por sonicação e o resíduo celular precipitado por centrifugação como descrito anteriormente (v. § 3.5.1). As proteínas fusionadas His₆ foram purificadas do sobrenadante através de uma coluna de Ni²⁺ sefarose, baseada na afinidade de interação entre o Ni²⁺ e os seis resíduos de histidina (*tag* His₆) fusionados à Mlph, usando o protocolo descrito abaixo:

A coluna de Ni²⁺-FPLC (Pharmacia) foi lavada com tampão A (pela bomba peristáltica A) (Tris 20 mM pH 7,5, NaCl 500 mM, MgCl₂ 5 mM, 1 BME mM) e equilibrada com tampão B (Tampão A, imidazol 0,5, pH 8,0) (pela bomba peristáltica B). O sobrenadante, produto da lise celular foi carregado no *superloop* via bomba peristáltica com um fluxo de 5 mL/min. A amostra foi então injetada na coluna de Ni²⁺ com um fluxo de 1 mL/min e em seguida a coluna foi lavada com tampão A com um fluxo de 2mL/min por 30

min. As proteínas fusionadas His₆ foram eluídas da coluna de Ni²⁺ pelo aumento da concentração de imidazol, que compete com os sítios de ligação de Ni²⁺. No passo seguinte a concentração do tampão B (com 0,5 M de imidazol) foi aumentada (0-25% de imidazol) de 5 em 5% por 30 minutos em um fluxo de 1 mL/min. Por a proporção do tampão B foi aumentada para 50% e 100% no mesmo tempo e fluxo. Frações de 3 mL foram coletadas e foi feito um pool com frações que continham proteína. As frações protéicas foram dialisadas 2 x 12hrs em tampão A a 4°C. Quando necessário, as amostras foram concentradas com concentrador de proteínas centricon (30.000, Millipore). A pureza das proteínas foi estimada em gel de eletroforese de poliacrilamida corado por azul de Coomassie.

3.5.3 Determinação da concentração de proteínas

A concentração de cada proteína foi determinada pelo microespectrofotômetro nanodrop (Thermo Scientific), usando como referência o peso molecular e coeficiente de extinção molar da proteína (Tabela 3.2), ou pelo método BCA (método que utiliza ácido bicinconínico) para detecção colorimétrica e quantificação do total de proteína, seguindo a recomendação do fabricante.

Tabela 3.2 Proteínas purificadas para a elaboração desta tese

Proteína recombinante	Coefficiente de Extinção Molar ($\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$)	M_w (Dalton)
GST	43110	27898
GST-Mlph 150-500	46340	65689
GST-Mlph 150-400	46340	53361
GST-Mlph 150-590	46280	75656
GST-Mlph 300-500	44600	49729
GST-Mlph 400-590	47580	49768
GST-Mlph 300-590	50560	60894
GST-Mlph GTBD (150-266)	40495	42320
GST-Mlph 400-500	46680	48468
GST-Mlph 150-483	46340	63995
GST-Mlph 483-590	46068	42367
GST-Mlph 150-500 AP	46340	65689
GST-Mlph 150-590 AP	46280	75656
GST-Mlph 150-590 IP	46280	75656
GST-Mlph 150-500 EA	46340	65689
GST-Mlph 300-433	42552	44600
MBP-MSGTA	114000	110000
MBP-MSGTA (Gel filtered)	114000	110000
MBP-EB1 FL	89395	73368
MBP-MS	83770	64248
MBP	66350	43387
GST-MyRIP 414-652	57340	53785
GST-MyRIP 721-780	43235	34474
GST-MyRIP 644-856	53205	51179
GST-MyRIP 414-856	67434	76098
GST-MyRIP insert 2 (600-720)	51715	40938
GST-MyRIP insert 1	58580	48492
GST-MyRIP 190-414	64080	52749
GST-MyRIP 644-780	51715	42664

3.6 Purificação do anticorpo policlonal por *AminoLink* gel

O anticorpo policlonal específico para os epítomos (A3A4) da miosina Va foi produzido para experimentos de imunodeteção. O anti-soro foi produzido em coelhos, empregando-se miosina Va (A3A4) purificada. O título e a especificidade foram determinados através do ensaio imunoenzimático.

3.6.1 Produção de anticorpo policlonal anti-miosina Va por ligação da proteína a esferas *AminoLink*

Resina de ligação *AminoLink* consiste de uma resina em forma de contas (beaded) crosslinked 4% e ativada com grupos aldeído. As proteínas com aminas primárias se ligam covalentemente (são imobilizadas) às esferas de *AminoLink*, caracterizando uma cromatografia ideal para purificação por afinidade. O grupo aldeído forma uma ligação estável amino secundária com as aminas primárias presentes em diversas proteínas, inclusive em nossa proteína de interesse, miosina Va. O método de purificação consiste na imobilização da miosina Va na *AminoLink* e a seguida ligação do anticorpo contra miosina Va do soro de coelho (imunizado com miosina Va) à proteína imobilizada na *AminoLink*. Os métodos de ligação, purificação e especificidade estão descritos a seguir:

A solução contendo a proteína foi dialisada contra tampão fosfato de sódio a 0,1 M pH 7,0. Para purificação por afinidade, foram utilizado 1-2 mg proteína por ml de esferas *Amino-link* (solução coloidal). A concentração de proteína foi determinada e dialisada (para cada mL de proteína foi utilizado 1 litro de tampão de diálise). Em seguida a solução coloidal em gel *AminoLink* foi ressuspensa diversas vezes e 2 mL de seu conteúdo foi transferido para um tubo Falcon de 15 mL. As esferas foram lavadas (10x o volume de esferas) com tampão fosfato de sódio a 0,1 M, pH 7,0, e foram então precipitada gentilmente (200 rpm por 2 min); este passo foi repetido 3 vezes. Foram adicionados a 1 mL de esferas lavadas 2 mg de miosina Va, levando o volume total da solução coloidal para 2 mL com tampão de fosfato de sódio, pH 7,0. Dentro da câmara de fluxo, foram adicionado 100 μ L de 1,0 M NaCNBH₃ fresco a solução coloidal e a mistura agitada suavemente por 6 h em temperatura ambiente. Logo após as esferas foram precipitadas e o sobrenadante removido; a eficiência da ligação da proteína às esferas foi acompanhada por solução de Coomassie. No passo seguinte, as esferas foram

lavadas 2 vezes com 10 mL de Tris-HCl 1,0 M, pH 7,4. Foi adicionado 1 mL de Tris-HCl e 50 μ L de NaCNBH₃ às esferas, a solução foi então misturada em tubo Falcon por 30 min sob leve agitação, e em seguida foi adicionado NaCl 1,0 M, 10x o volume de esferas, que foram lavadas com 0,05% de azida sódica (10x o volume de esferas). As esferas foram resfriadas em 0,05% de azida sódica e guardadas a 4°C.

3.6.2 Purificação por afinidade

1 mL de proteína ligada às esferas de *AminoLink* foram transferidos para uma coluna de 15 mL da Bio-Rad. A coluna com a miosina Va imobilizada a *AminoLink* foi lavada 3x com tampão fosfato de sódio, pH 7,0. Logo em seguida, 10 mL de soro do coelho foram diluídos (1:1) com tampão fosfato de sódio, pH 7,0.

O soro diluído foi aplicado na coluna e o primeiro volume do efluxo (*Flow Trough*) (F/T1) guardado. O F/T1 foi depositado na coluna novamente e o F/T2 foi guardado. A coluna foi lavada com Tris 10 mM, pH 7,5 (3x 5mL) e depois com Tris 10 mM, pH 7,5/0,5 M NaCl (3x 5mL). Em seguida o anticorpo foi eluído com 1 ml de glicina 0,1M, pH 3,0.

As amostras foram eluídas em tubos Eppendorf com Tris (sem aferir pH) para neutralizar o pH. As eluições foram testadas por Comassie para evidenciar a presença do anticorpo. As amostras com anticorpo foram dialisadas por 12 h em PBS.

3.6.3 Detecção da especificidade dos anticorpos purificado por afinidade

Foram preparados *dot blots* com miosina Va recombinante (MBP-MSGTA) marcada com o anticorpo purificado. Os dots foram aplicados em papel de nitrocelulose (Hybond C) com 1 ng, 5 ng, 50 ng e 100 ng de proteína. GST-Mlph foi utilizada como controle negativo. Em seguida, a eficiência do anticorpo purificado foi imunodetectada por *Western blot*.

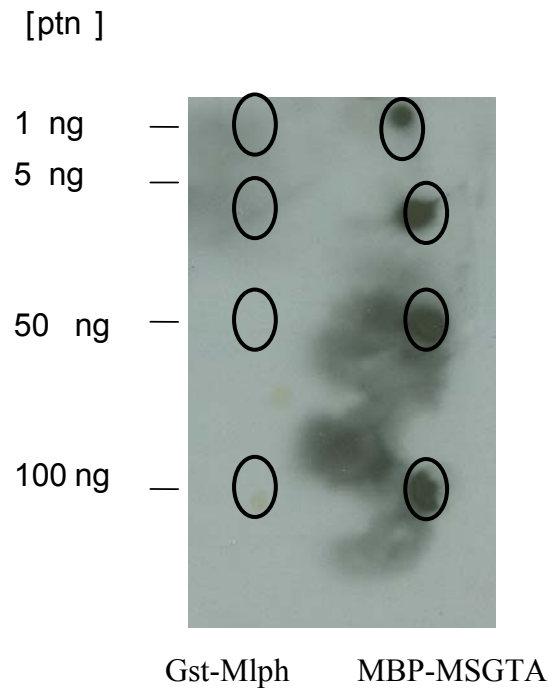


Figura 3.2. Imunodeteção por *dotblot*. O anticorpo purificado anti-miosina Va (A3A4) mostrou especificidade pela miosina Va. GST-Mlph foi utilizado como controle negativo. A diluição ideal do anticorpo é de 1/1000.

3.7 Experimento de duplo híbrido de levedura (Y2H) para determinar interação proteína-proteína.

O sistema de duplo-híbrido é um ensaio genético criado em levedura para detectar interações proteína-proteína. Este sistema pode ser usado para identificar proteínas que se ligam a uma proteína de interesse ou para delinear domínios ou resíduos críticos para uma

interação. Para a identificação de proteínas que se ligam a uma proteína de interesse (híbrido1- “isca”), o híbrido2 (“presa”) é codificado por um conjunto de plasmídeos contendo cDNAs (biblioteca) ligados ao domínio de ativação. Interações não covalentes entre os híbridos 1 (contendo o domínio de ligação ao DNA fusionado com proteína X) e 2 (contendo o domínio de ativação fusionado à proteína Y) são detectadas através da ligação da proteína híbrida *upstream* à sequência de ativação (UAS) de genes repórteres. Desta forma, um único híbrido não é capaz de transativar os genes repórteres.

Neste trabalho utilizamos dois genes repórteres: o gene *LacZ* de *E.coli*, que está integrado ao genoma da levedura no lugar do *LacZ* endógeno e o gene *HIS3*, um gene heterólogo inserido no genoma de uma cepa de levedura que apresenta o seu gene endógeno *HIS3* não funcional. Ambos os genes repórteres são controlados pelo promotor *GAL4*, regulador da transcrição. O gene repórter *HIS* é detectado através do uso de meio auxotrófico, em ausência de histidina, e o gene repórter *LacZ* é detectado pelo ensaio de atividade da enzima β -galactosidase. Esses genes repórteres são precedidos por uma região contendo o *TATA Box* e uma sequência característica, que liga proteína *GAL4* acionando a transcrição. Esta sequência de ativação específica é denominada UAS (*upstream activation sequence*) (van & Beyaert, 1999). O cDNA da proteína “isca” foi clonado ao lado do gene referente ao domínio de ligação ao DNA em um vetor pBD (binding domain), enquanto os genes da biblioteca com potencial para interagir com a “isca” foram clonados com o gene do domínio de ativação em vetores pAD (activation domain).

Ambos os vetores, pBD e pAD foram co-transfectados em L40 (levedura) que contém o gene repórter com a sequência UAS, sob controle do fator de transcrição *GAL4*, que está fragmentado em dois domínios independentes. O gene repórter será ativado quando o domínio de ativação (AD) interagir com o domínio de ligação ao DNA (BD) na sequência UAS (**Figura. 3.2**). Em nosso estudo, a proteína “isca” foi a *Mlph* a.a. 367-500, cujo cDNA foi

clonado ao lado do gene referente ao domínio de ligação do DNA no vetor pBD. A biblioteca escolhida foi a de cDNA de melanócito de camundongo, cujos cDNAs encontram-se clonados ao lado do domínio de ativação em vetores pAD. Este importante construto de Mlph tem parte do domínio de ligação da miosina Va e é essencial para função da Mlph (Hume et al., 2006). Talvez interaja com outras proteínas de sinalização ou estabilização, que possam regular o transporte de melanossomos. Os métodos utilizados estão descritos a seguir.

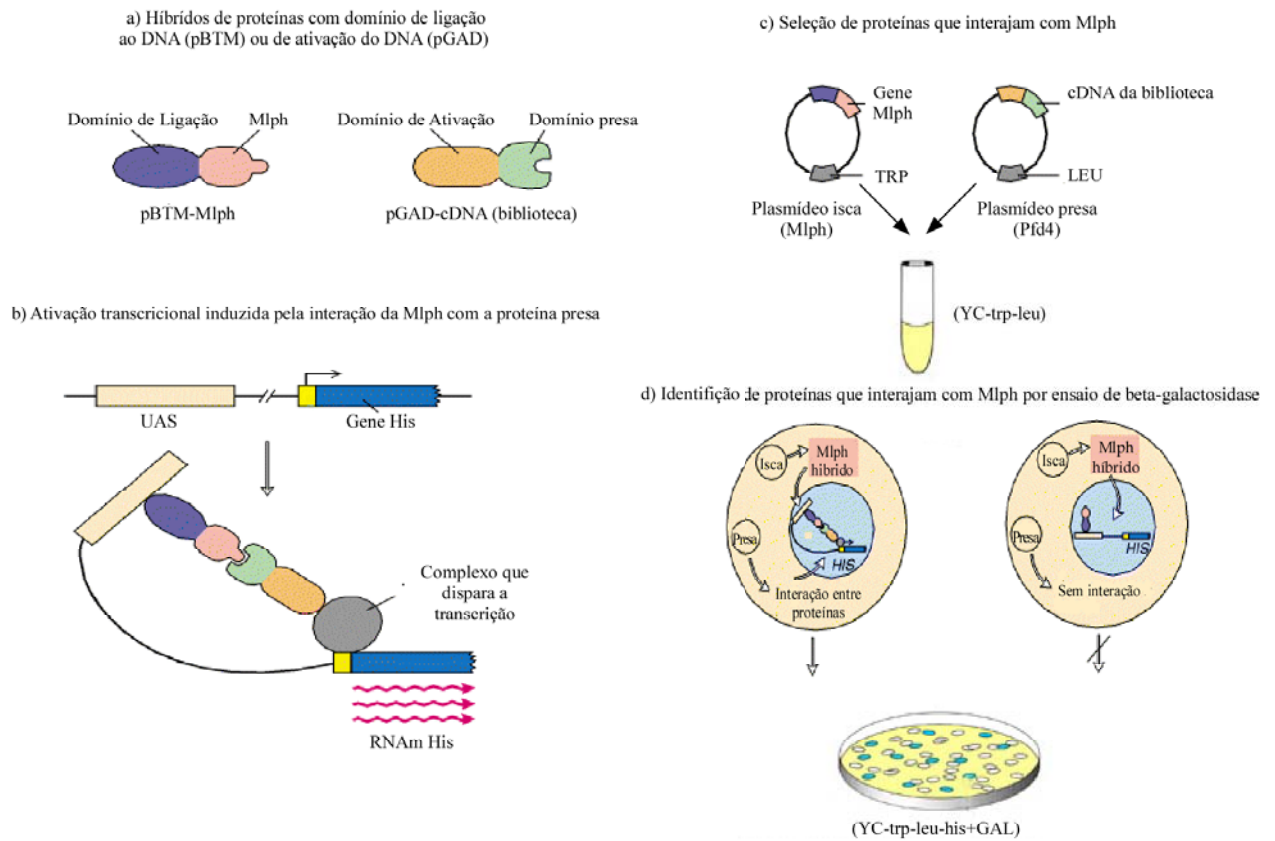


Figura 3.3 Sistema de Y2H para detecção de interação proteína- proteína (a) A técnica de DNA recombinante pode ser usada para preparar genes que codifiquem as proteínas híbridas (quimeras) que contenham o domínio de ligação do DNA (BD) (roxo) ou domínio de ativação do DNA (AD) (laranja) do fator de transcrição fusionado a uma das duas proteínas de interação, denominada de domínio isca (rosa) e domínio presa (verde). (b) Ambos os plasmídeos são transformados em levedura L40 que apresenta mutações para biosíntese de triptofano, leucina e histidina (células *-trp1*, *-leu2*, *-his3*), e cresce em meio YC na ausência de triptofano e leucina. Apenas as células que contenham o plasmídeo da Mlph ligado aos plasmídeos presa poderão sobreviver neste meio selecionador. (c) Nesta tese, foram utilizados dois plasmídeos: o plasmídeo isca que inclui a sequência que codifica o BD do fator de transcrição (roxo) conectado à sequência que codifica Mlph150-500 (rosa); e o plasmídeo presa, que contém amostras de cDNAs individuais (verde) oriundos de uma biblioteca conectados à sequência que codifica o AD (laranja). Cada tipo de plasmídeo contém um gene de seleção natural (TRP1 ou LEU2). (d) Uma nova seleção é feita plaqueando as células em meio na ausência de histidina, onde apenas células que continham interação entre a Mlph e proteína presa promovem a expressão de histidina para sobreviver. Por fim, identificamos que a Pfd4 como plasmídeo ligado a Mlph [adaptado de (Fields & Song, 1989)].

3.7.1 Construção dos plasmídeos

PBMT-Mlph367-500 foi construído via amplificação de PCR do DNA que codifica Mlph 367-500 a.a. utilizando os *primers* de oligonucleotídeos

5'-CGCGAATTCCCCCAGTGCTGACACAGAG-3'

5'-GGCCCTCGAGGATGCCTGACTTTCTCCGAGG-3'

e o IMAGE clone 4862487 serviu de amostra controle. O resultado do PCR foi digerido usando as enzimas de restrição EcoR1 e Xho1 e os fragmentos foram ligados ao vetor pBTM116 (contendo o domínio de ligação do DNA, preparado usando as mesmas enzimas) utilizando T4 DNA ligase. Os clones recombinantes transformados em DH5 α foram identificados por digestão restritiva e a sequência confirmada por sequenciamento do DNA.

3.7.2 Transformação padrão de levedura L40 com plasmídeos fusionados que codificam a proteína isca (Mlph 367-500 a.a.) e a presa

Todos os meios utilizados para levedura foram descritos em nesta seção (v. § 3.1.4). Todos os experimentos foram feitos usando levedura L40. As leveduras foram transformadas por acetato de lítio (LiAc) como descrito a seguir: uma colônia de levedura L40 foi inoculada em 10 mL de meio YPAD e incubada por 12 h em 30°C com agitação a 230 rpm. Para cada transformação, 500 μ L da cultura que cresceu por 12 h foram centrifugados a 16.200x g por 5 s e a levedura foi ressuspensa em LiAc 0,1 M e incubada a 30°C por 5 min. A levedura foi então colhida por centrifugação e ao precipitado foi adicionado (nesta ordem):

1. 240 μ L de PEG 3500 (50% w/w),
2. 36 μ L de LiAc (0.1 M)
3. 5 μ L de esperma de salmon (fervido) ssDNA (10mg/mL)
4. 1 μ L de plasmídeo contendo a proteína presa fusionada (pBTM116)

5. 1 μL de plasmídeo contendo a proteína isca fusionada (pGAD)
6. 20 μL de dH_2O estéril

A mistura da transformação foi agitada em agitador do tipo vortéx por 2 min e então incubada a 42 °C por 20 min. A levedura foi centrifugada a 16.200x g por 15 s e o sobrenadante removido. A levedura foi ressuspensa em 100 μL de água, plaqueada em placas YC-Trp-Leu (+His), e incubada a 30°C para seleção de transformações que continham os dois plasmídeos. O período de incubação foi de 2-3 dias. Colônias individuais transformadas foram plaqueadas em placas petri contendo LB de agar, um YC-Trp-Leu (+His) e outro YC-Trp-Leu (-His), incubados por 2-3 dias a 30°C e confirmados pelo experimento de atividade da β -galactosidase e nas leveduras que cresceram na ausência de histidina.

3.7.3 Titulação da biblioteca de cDNA

Para uma eficiente interação entre a proteína isca e possíveis parceiros moleculares em uma biblioteca de cDNA é fundamental que a concentração da biblioteca seja 10 vezes mais do que o número de proteínas recombinantes utilizadas como isca. Para isso a biblioteca de plasmídeos (GATC Biotech, Konstanz, Alemanha) foi titulada da seguinte maneira: 10 μL da biblioteca foi descongelada no gelo, foram adicionados 99 μL de meio LB em tubo falcon de 15 mL. Após a adição de 99 μL de LB (diluição de 10^{-2}), e uma diluição serial foi realizada para obter diluições de 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} . De cada tubo foi retirado 10 μL , misturados com LB (100 μL) e a mistura plaqueada em prato LB-agar com Amp. As placas petri contendo LB agar foram incubados de cabeça para baixo por 12 h a 37°C. O número de colônias formadas na biblioteca original, foi quantificado para obter o número de colônias por mL (cfu/mL) através da seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Número de colônias} \times \text{diluição} \times 10^3}{10 \text{ (}\mu\text{L da biblioteca)}} = \text{Unidade/mL de colônia formada}$$

3.7.4 Amplificação da biblioteca de cDNA

Após titulação da biblioteca, a biblioteca com o maior número de colônias (10^6) foi escolhida para ser amplificada 6-10 vezes. Após a diluição da colônia em 30 mL, foi plaqueada em 500 μL da diluição/placa, e espalhando as colônias sobre o agar com auxílio de esferas de vidro estéril. Foram utilizados 60 pratos de LB Agar+Amp (140 mm de diâmetro), que cresceram a 37°C por 12 h. Foi adicionado 5 ml de LB sobre os pratos contendo as colônias positivas, que foram então raspadas e aliqüotadas em tubos falcon de 50 mL; 20 a 40 mL da suspensão celular foram congelados e do restante foi feito uma *Maxi-prep* do DNA. O DNA produto da *Maxi-prep* foi utilizado como presa em nosso experimento de duplo híbrido de levedura.

3.7.5 Transformação da biblioteca

Levedura L40 previamente transformada com pBTM-Mlph 367-500aa foi inoculada em 5 mL de YC –trp onde cresceu por 12 h a 30°C sob constante agitação (280 rpm). 100 mL de YC –trp foram inoculados com os 5 mL de YC –trp contendo o plasmídeo para a cultura alcançar um crescimento exponencial de 2 a 3 vezes à $D.O_{600}$. A cultura original foi em seguida incubada por 12 h sob constante agitação (280 rpm) e utilizada para inocular 1 litro de YPAD. Após ~ 3 horas nas mesmas condições, tempo médio para atingir uma $D.O_{600}$ de 0,3, as células foram então centrifugadas $0,8 \times g$ por 10 min em temperatura ambiente. O

precipitado foi lavado com 500 mL de tampão TE (Tris 10 mM, pH 7,5/ EDTA 1 mM) e ressuspenso em 20 mL de 1x LiAc/0,5xTE e transferido para frasco estéril de 1 litro. Imediatamente após, foi feita a transformação da isca (pBTM-Mlph367-500) com a 500 µg da biblioteca de cDNA de melanócito. Para isso foi misturado de 5 mL ssDNA (fervido) a 2mg/mL, 500 µg de suspensão celular da biblioteca e 140 mL de 1x LiAc/40%PEG 3500/1xTE. Esta amostra foi misturada no *vortex* e incubada a 30°C por 30 min. Então foi acrescentado 17,6 mL de DMSO e as células foram submetidas a choque térmico (42°C) por 6 min, com rotações ocasionais para facilitar a transferência. Logo a seguir, a mistura foi diluída em 400 mL de YPAD e rapidamente resfriada para temperatura ambiente em banho-maria. As células foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 min e ressuspensa com 500 mL de YPAD, para em seguida centrifugar novamente a 5000 rpm por 10 min. Logo após foi ressuspensa com 1 litro de YPAD, e incubada a 30°C por 1 h sob constante agitação. O sedimento foi ressuspenso em 10 mL de YC –His–Trp–Leu, e as transformações foram plaqueadas em 50 placas Petri de 140 mm cada, contendo YC –His–Trp–Leu. As leveduras com interação positiva cresceram em placas sem aminoácidos e expressaram o gene repórter His⁺; a interação proteína-proteína foi confirmada por ensaio de β-galactosidase líquida e por filtro como descrito a seguir.

3.7.6 Ensaio de atividade da β-galactosidase líquido para detecção de interação proteína-proteína em larga escala

A mistura para detecção (Na₂HPO₄ 0,25 M, pH 7,5, 0,5% agar, 0,1% SDS, 7% DMF, 0,04% gal-X) foi espalhada cuidadosamente sobre o agar das placas contendo colônias positivas para histidina e logo em seguida as placas foram incubadas de cabeça para baixo a 30°C. Leveduras que expressavam Mlph (1-590 aa) e miosina Va foram utilizadas como

controles positivos. As colônias com forte interação tornaram-se azuis (positivas) após 30 min. O surgimento de colônias azuis foi acompanhado após 1 h, 2 h, 4 h e 6 h de incubação.

3.7.7 Ensaio de atividade da β -galactosidase em filtro para detecção de interação da proteína híbrido Mlph com proteína presa

Colônias de levedura foram recobertas por uma membrana de nitrocelulose (Hybond-C) e transferidas para membrana. As leveduras agora na membrana foram lisadas por imersão completa da membrana em nitrogênio líquido por 30 s. Para detecção da produção de β -galactosidase pelas leveduras, a membrana foi colocada em cima de um pedaço de papel de filtro 8 x 75 de 3mm (Whatman), que foi encharcado em 2 mL de tampão Z (60 mM Na_2HPO_4 , 40 mM NaH_2PO_4 10 mM KCL, 1 mM de $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7,0) contendo 40 μL de 50 mg/mL de gal-X, e incubado a 30°C de 10 min a 24 h.

3.7.8 Análise das colônias de levedura por PCR

Para identificação do plasmídeo da proteína que interagiu com Mlph, o plasmídeo foi extraído da levedura e amplificado por PCR. Uma colônia positiva foi extraída da placa com a ponta de um palito de dente estéril, e ressuspensa com 10 μL de NaOH 0,02 N em tubo Eppendorf (girando o palito por alguns segundos na solução de NaOH). As células foram incubadas por 5 min a 100°C e imediatamente colocadas no gelo.

Foi utilizado um programa de PCR padrão, com desnaturação inicial de 3 min a 95°C, seguido de 25 ciclos de anelamento a 55°C e extensão de 3 min a 72°C (para garantir a extensão até dos insertos mais longos), seguido de um passo final de extensão a 72°C por 10 min, para certificar que todos os plasmídeos foram polimerizados. As reações continham

tampão de PCR sem MgCl₂ (1x), MgCl₂ 1.5 mM, 0,25 mmol de cada NTP, 10 pmol de *primer* reverso (52), 10 pmol de *primer* anterógrado, 1 U Taq polimerase, em um volume final de 50 µL (dH₂O estéril).

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%. Os plasmídeos que continham um único padrão de restrição foram purificados usando *kit* de extração QiAquick gel (Qiagen) e enviados para serem sequenciados.

3.7.9 Determinação dos níveis de expressão da isca e presa em Levedura L40

Uma colônia individual da placa contendo Agar YC-Trp-Leu (+His) foi inoculada em 5 mL de meio YC-Trp-Leu e incubada por 12 h sob agitação de 230 rpm. A levedura foi então centrifugada a 2500 rpm em temperatura ambiente. O meio foi descartado e a levedura incubada a - 80°C por 10 minutos, descongelada em 100 µL de tampão *cracking* (uréia 8 M, 5% SDS, Tris-HCL 40 mM, pH 6.8, EDTA 0.1 mM, 1% BME, 0,4 mg/mL de azul de bromofenol) em banho-maria pré-aquecido (60°C), ressuspensa com uma pipeta. Para romper a levedura, foram adicionados 100 µL de esferas de vidro (Sigma), e a suspensão foi incubada a 70°C por 10 min e agitada no *vortex* por 1 min. A mistura foi centrifugada a 16,200 g por 5 min à temperatura ambiente e a proteína contida no sobrenadante transferida para um tubo limpo. Tampão de amostra SDS-PAGE foi então adicionado e a amostra fervida por 5 min. A amostra foi separada por SDS-PAGE, transferida para membrana PVDF e imunodetectada por *Western blot* como descrito anteriormente (v. § 3.4).

3.8 Medidas espectroscópicas

3.8.1 Determinação da estrutura secundária por dicroísmo circular (CD)

As medidas de CD foram realizadas em um espectropolarímetro modelo Jasco J-715 acoplado a um peltier para controle da temperatura (Jasco Corporation, Tokyo, Japan), usando

uma célula de quartzo de 0,10 mm de caminho ótico. Para a obtenção dos espectros, as amostras de proteínas foram diluídas para 10 μ M cada. Para aferição da interação proteína-proteína, as proteínas foram misturadas, pré-incubadas por 12 h no gelo (10 μ M de cada proteína), em tampão fosfato 20 mM, pH 7,5.

Os dados coletados são a média de quatro espectros obtidos a uma velocidade de 100 nm/min, coletados em passos de 0,5 nm durante aproximadamente 2 s. Os espectros foram obtidos utilizando comprimento de onda de 260 a 190 nm. De cada espectro bruto foi subtraído o espectro bruto do seu respectivo tampão. A partir dos espectros obtidos, a elipticidade molar foi calculada utilizando o programa Dichroweb (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>), através da seguinte equação:

$$[\theta] = \theta/c.l$$

onde $[\theta]$ representa a elipticidade molar, θ representa a elipticidade bruta, c representa a concentração da proteína em molaridade e l representa o caminho ótico (cm).

3.8.2 Determinação da interação proteína-proteína por anisotropia de fluorescência

Os construtos de GST-Mlph150-590, 400-590 e A453P foram marcados com isotiocianato de fluoresceína amino-reativa (FITC) para experimentos de anisotropia de fluorescência. Para a reação de marcação, Mlph foi solubilizada em tampão 0,1 M de bicarbonato de sódio, pH 8,0 para concentração final de 5–10 mg/mL e incubado com FITC (concentração final, 0,5–1,0 mg/mL) por 1 h em temperatura ambiente. Após incubação, o complexo conjugado (FITC-Mlph) foi separado da fluoresceína não conjugada por gel filtração usando uma coluna de dessalização PD-10 (Amersham Biosciences) que foi

equilibrada com tampão Tris (50 mM, pH 7,4) contendo 100 mM NaCl. Após a eluição, a concentração da Mlph marcada e a eficiência de marcação foram determinadas baseadas no coeficiente de extinção molar da GST-Mlph 150-590 ($46,280 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ a 280 nm), GST-Mlph 400-590 ($47,580 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ a 280 nm), GST-Mlph A457P ($46,280 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ a 280 nm), e FITC ($68,000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ a 494 nm). FITC-GST-Mlph foi guardada a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ protegida da luz em tubo Eppendorf ambar. Para os experimentos de anisotropia, as amostras foram excitadas a 494 nm, e a emissão foi observada através de um filtro 3-69.

Capítulo 4 - Resultados

4 Resultado

Mlph está presente em melanócitos e tem sido caracterizada como fundamental para o transporte intracelular, atuando na transferência de melanosomos dos microtúbulos para o citoesqueleto de actina (Hume et al., 2002). Mlph é uma proteína de múltiplos domínios funcionais, característica crucial para a formação do complexo tripartido que permite o transporte de melanosomos. Vem sendo sugerido que a Mlph é a ponte estrutural entre Rab27a e a miosina Va, ainda que os mecanismos para esta interação sejam desconhecidos. Proteínas da família Slp (que inclui Mlph) caracteristicamente se ligam a diversos parceiros moleculares, e o mesmo ocorre com a Mlph. Seus múltiplos domínios, além de recrutar Rab27a e miosina Va, interagem com a actina permitindo ancoramento e posterior fusão da vesícula na membrana celular. Todavia, permanece obscuro a função e estrutura desses diferentes domínios de Mlph e seu papel no recrutamento da miosina Va, bem como a possibilidade de interação com outras proteínas do citoesqueleto, que poderiam ter a função de estabilizar estruturalmente a Mlph e de alguma forma regular o transporte vesicular.

Para identificar interações que possam regular a participação da Mlph no transporte de melanosomos, investigamos se outras proteínas do citoesqueleto de melanócitos poderiam se ligar a Mlph via ensaio de duplo híbrido em levedura.

4.1 Duplo híbrido de levedura

4.1.1 Mlph se liga de maneira específica com Rab27a e Miosina Va via ensaio de duplo híbrido (Y2H)

Utilizando o ensaio de duplo híbrido, verificamos que o construto Mlph selvagem (1-590 a.a.) se liga à cauda da miosina Va de melanócitos (MSGTA- cauda da miosina com exon D e F) e a Rab27a. Pode ser observado na Figura 4.1 que a Mlph interage com MSGTA e com

Rab27a (colônias azuis). Construtos menores de Mlph, sem a porção N-terminal, mas com o domínio central e o C-terminal (367-500 a.a., 367-483 a.a. e 367-520 a.a.) também são capazes de recrutar MSGTA *in vivo*. Esses dados estão de acordo com estudos prévios realizados pelo nosso grupo e por outros pesquisadores, o que nos assegura a funcionalidade dos nossos construtos (Hume et al., 2006); (Provance et al., 2002). O fragmento de Mlph 400-500 a.a, que não tem o domínio de interação com MSGTA, e o fragmento 367-590 a.a., que não tem o domínio de interação com Rab27a, não foram capazes de se ligar a MSGTA e Rab27a, respectivamente (**Figura 4.1**).

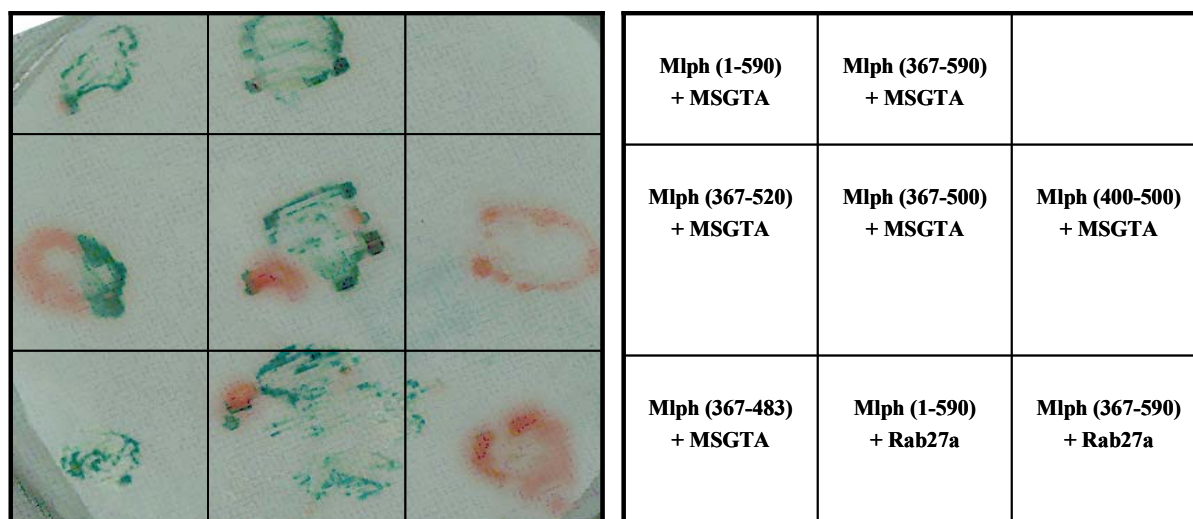


Figura 4.1. Interação da Mlph com seus parceiros: Ensaio duplo híbrido de levedura revelado por β -galactosidase. Leveduras L40 foram transformadas, como descrito em Materiais e Métodos, com plasmídeos que codificam as proteínas indicadas nos painéis à direita. As leveduras transformadas foram cultivadas por 2-3 dias em placas -His+Leu+Trp e transferidas para membrana de nitrocelulose. As leveduras foram rompidas por incubação com nitrogênio líquido e submetidas ao ensaio de β -galactosidase. Após 30 min, as colônias azuis indicam interações positivas entre as proteínas expressas e as colônias vermelhas indicam que não há interação.

4.2 Escolha do construto isca de Mlph para o ensaio de duplo híbrido de levedura contra a biblioteca de c-DNA de melanócitos

Com o objetivo de verificar a eficiência na expressão dos diferentes construtos de Mlph em L40 para os ensaios de duplo-híbrido contra a biblioteca de c-DNA de melanócitos, a levedura foi transformada com o construto LexA-Mlph e depois lisada. O total de proteínas foi separado em gel SDS-PAGE. As proteínas foram então transferidas para membrana de PVDF e detectadas com anticorpo anti-LexA. A Figura 4.2 mostra os níveis de expressão dos construtos de Mlph em levedura L40; Mlph 367-520 a.a., 367-483 a.a. e 367-500 a.a. como os construtos com melhor expressão em L40. A Mlph selvagem e o construto Mlph 367-590 a.a. foram expressos em níveis menores e não foram detectados no Western blot, embora tenham sido expressas o suficiente para permitir a interação com MSGTA em levedura (**Figura 4.1**).

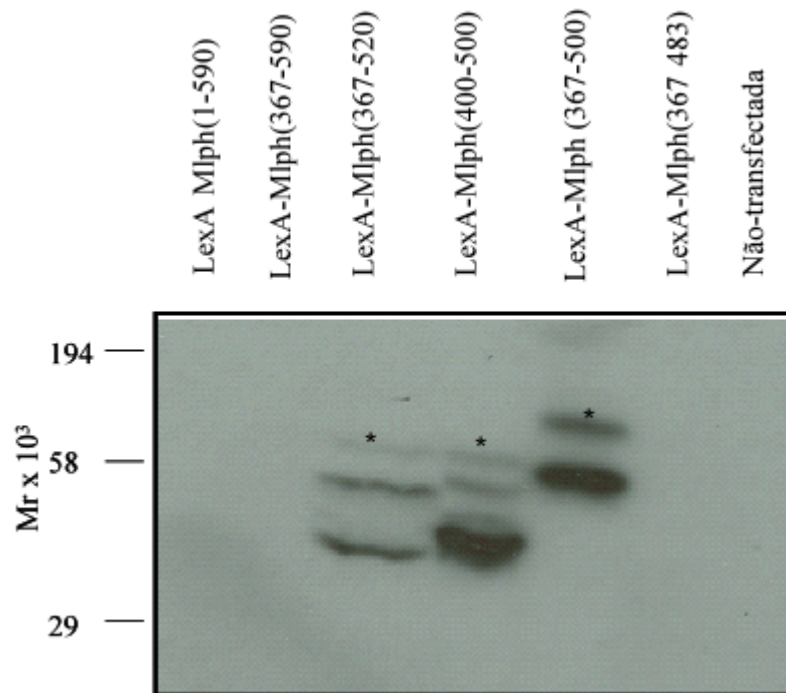


Figura 4.2. Expressão dos níveis dos construtos Mlph de fusionados com LexA (~ 22.3 kDa) em levedura L40. Leveduras L40 foram transformadas com os construtos indicados e lisadas. Volumes iguais do lisado foram carregados em gel SDS-PAGE de 10% e as proteínas separadas foram transferidas para membrana de PVDF. As proteínas expressas foram imunodetectadas por anticorpo antiLexA (1:5000). *, peso molecular do construto, as bandas abaixo são produto de degradação da Mlph.

4.3 Identificação da Pfd4 como proteína que interage com Mlph em ensaio de duplo híbrido de levedura contra biblioteca de cDNA de melanócitos

Nos últimos anos, através do esforço conjunto de diversos grupos de pesquisa, muitos eventos do tráfego intracelular de melanossomos já foram desvendados, mas a regulação bioquímica desses eventos permanece obscura. Interações proteína-proteína são cruciais para vários processos intracelulares e muitas dessas interações foram primeiramente descobertas via

ensaio de Y2H. Decidimos então utilizar este ensaio para procurarmos por proteínas que possam interagir com a Mlph *in vivo* utilizando o fragmento de Mlph 367-500 a.a como isca.

Todos os construtos isca foram fusionados com pBTM, plasmídeo que contém o domínio de ligação do DNA). Mlph 367-500 a.a, além de apresentar um bom nível de expressão em levedura L40 (**Figura 4.2**), é um fragmento interessante, pois nunca foi descrito que esta região interage com outra proteína além da cauda da miosina Va, diferente do C-terminal da Mlph, domínio que interage com EB1 e actina (Wu et al., 2005); (Hume et al., 2006). O construto 367-500 a.a., escolhido como isca, foi co-transformado com 500 µg de biblioteca de cDNA de melanócito (v § 3.7). As colônias com interação positiva cresceram em meio seletor e tornaram-se azuis após ensaio de β-galactosidase. Identificamos a interação da Mlph com outras proteínas do citoesqueleto de melanócitos em dez colônias diferentes. Os plasmídeos foram então extraídos, amplificados via PCR e sequenciados. Dentre os dez plasmídeos candidatos a interagir (plectina, miosina, RNAs) com o C-terminal da Mlph, três de 0,9 kb foram identificados como prefoldina 4 (Pfd4) (**Figura 4.3**).

A prefoldina (PFD) vem sendo identificada como importante chaperona em ambos sistemas celulares, onde atua no enovelamento de proteínas do citoesqueleto como tubulina e actina (Vainberg et al., 1998; Siegers et al., 1999).

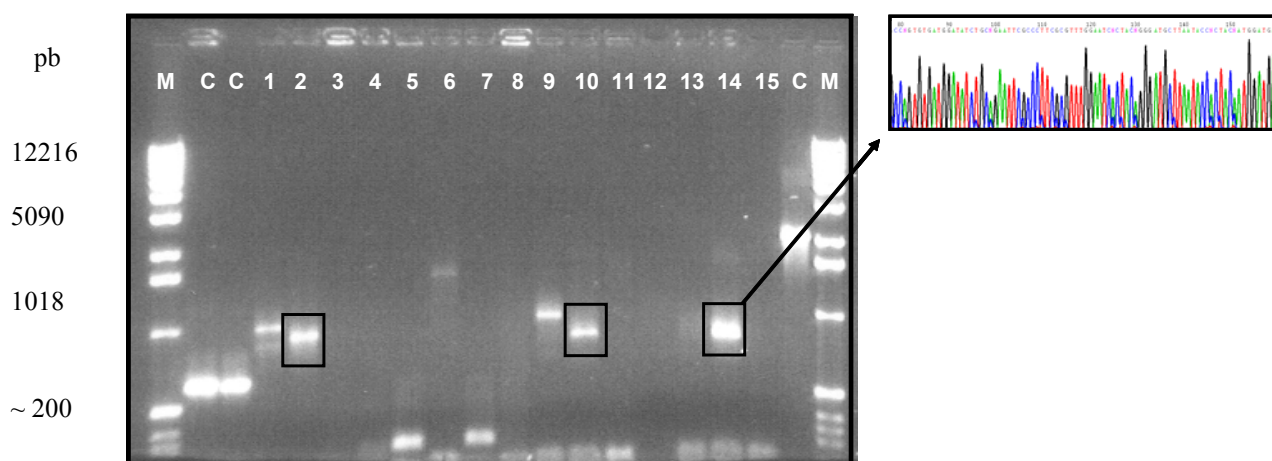


Figura 4.3. Análise das colônias por PCR. Os produtos de PCR foram amplificados e analisados em gel de agarose 1%. Os pontos claros representam a posição dos fragmentos obtidos pela recuperação dos plasmídeos da levedura. (M, marcador de peso molecular; C, controle). Os três fragmentos em destaque foram sequenciados e identificados como Pfd4 (eletrofotograma do sequenciamento - inserto).

4.4 Mapeamento do sítio de interação da Pfd4 com Mlph

Buscando avaliar a especificidade da interação entre Mlph e Pfd4 *in vivo*, realizamos novos experimentos de duplo híbrido em leveduras. Desta vez utilizamos diversos construtos de Mlph (pBTM-Mlph) como isca para interagir com MSGTA (pGAD-MSGTA) e Pfd4 (pGAD-Pfd4). As leveduras foram co-transformadas com os respectivos plasmídeos e plaqueadas em meio seletor (sem His).

No ensaio de Y2H pode ser observado que a Mlph selvagem (1-590) e as porções 367-590 a.a., 400-590 a.a., 367-520 a.a. e 367-500 a.a. se ligam tanto à Pfd4 quanto a MSGTA (**Figura 4.4**). A especificidade da interação entre Mlph e Pfd4 e entre Mlph com MSGTA foi confirmada, pois nenhum dos construtos de Mlph interagiu com pGAD vazio, o domínio de ligação do DNA sozinho sem Pfd4 ou MSGTA (**Figura 4.4**). Como controle positivo, o construto Mlph 367-590, que não contém o N-terminal da Mlph, não interage com Rab27a (**Figura 4.4 e Figura 4.6**).

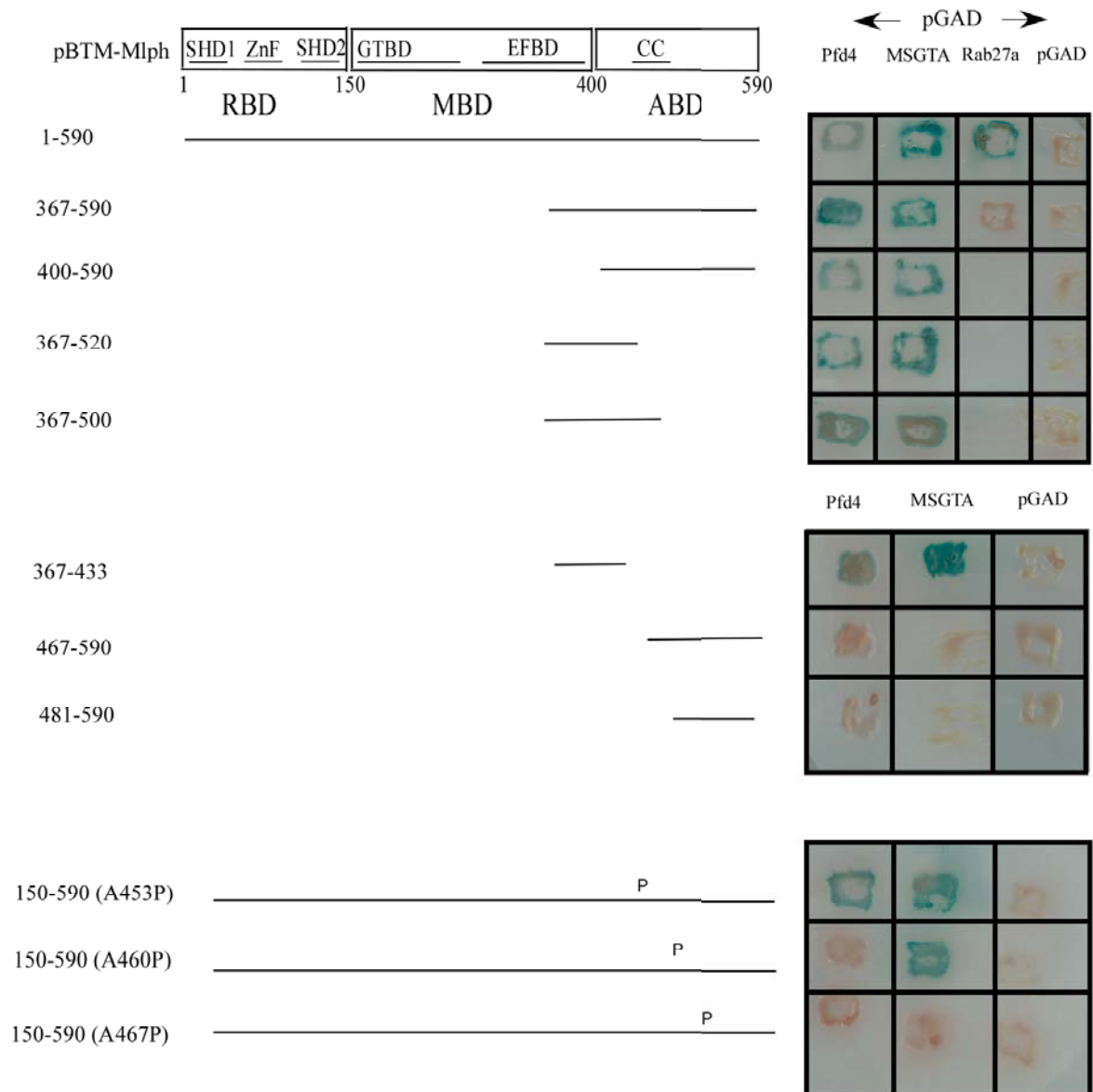


Figura 4.4. Ensaio de duplo híbrido de levedura por β -galactosidase para determinar a habilidade da Mlph em interagir com Pfd4 e Miosina Va. Leveduras L40 foram transformadas, como descrito em materiais e métodos, com plasmídeos que codificam as proteínas indicadas acima. As leveduras transformadas foram cultivadas por 2-3 dias em pratos -His+Leu+Trp e transferidas para membrana de nitrocelulose. As leveduras foram rompidas por incubação com nitrogênio líquido e submetidas ao ensaio de β -galactosidase. As colônias azuis indicam as interações positiva entre as proteínas expressas. Note que a os contrutos de Mlph com o C-terminal isolado não se ligam a Mlph. A troca pontual de alanina por prolina no aminoácido 460 interrompe a interação entre a Mlph e Pfd4 enquanto MSGTA permanece ligada.

Na **Figura 4.5** pode ser observado que o fragmento mínimo de Mlph que se liga à Pfd4 é o de 367-433 a.a.. Surpreendentemente, este mesmo domínio foi o mínimo necessário para a Mlph se ligar à MSGTA. Visando verificar se a porção C-terminal da Mlph sozinha (sem a porção N-terminal) e central é suficiente para se ligar à Pfd4 e à MSGTA, transformamos os fragmentos 467-590 a.a. e o 481-590 a.a. ora com Pfd4 ora com MSGTA. Pode ser observado na **Figura 4.5** que nem o fragmento 467-590 a.a. nem o 481-590 a.a. interage com a Pfd4 ou com MSGTA, indicando que alguma parte da região MBD (150-400 a.a.) e o C-terminal da Mlph (400-590 a.a.) necessitam co-existir para permitir a interação da Mlph com Pfd4 e também com MSGTA.

Utilizando programas que predizem a formação de *coiled-coil*, Hume e colaboradores (2005) indentificaram que o C-terminal da Mlph possui uma grande propabilidade de ser *coiled-coil*, região que pode ser necessária para a interação da Mlph com Pfd4 ou com a MSGTA. Para checarmos esta hipótese, nós realizamos mutações pontuais na Mlph que prejudicariam a estabilidade da *coiled-coil*. Alanina foi trocada por prolina em diferentes posições do C-terminal da Mlph, a saber: aminoácido 453, 460 ou 467. Estas três posições estão localizadas na região que forma a *coiled-coil*. A mutação no resíduo 453 não interferiu na capacidade da Mlph em recrutar a Pfd4 e tampouco a MSGTA. Por outro lado, a mutação pontual no resíduo 467 bloqueou a interação da Mlph com ambas as proteínas. Surpreendentemente, a mutação no resíduo 460 bloqueou especificamente a interação entre a Mlph e a Pfd4, embora permita a interação da Mlph com MSGTA (**Figura 4.5**). A **Figura 4.5** mostra um resumo das interações positivas e negativas entre os diferentes construtos. Quando trocamos o híbrido isca e o híbrido presa de lugar, ou seja, a Pfd4 fusionada ao domínio de ligação de DNA e Mlph fusionada ao domínio de ativação do DNA, os resultados obtidos foram os mesmos descritos anteriormente, confirmando a interação entre Pfd4 e Mlph

independente do vetor ao qual elas estejam fusionadas. Este resultado nos motivou a investigar se essas proteínas também se associam *in vitro*.

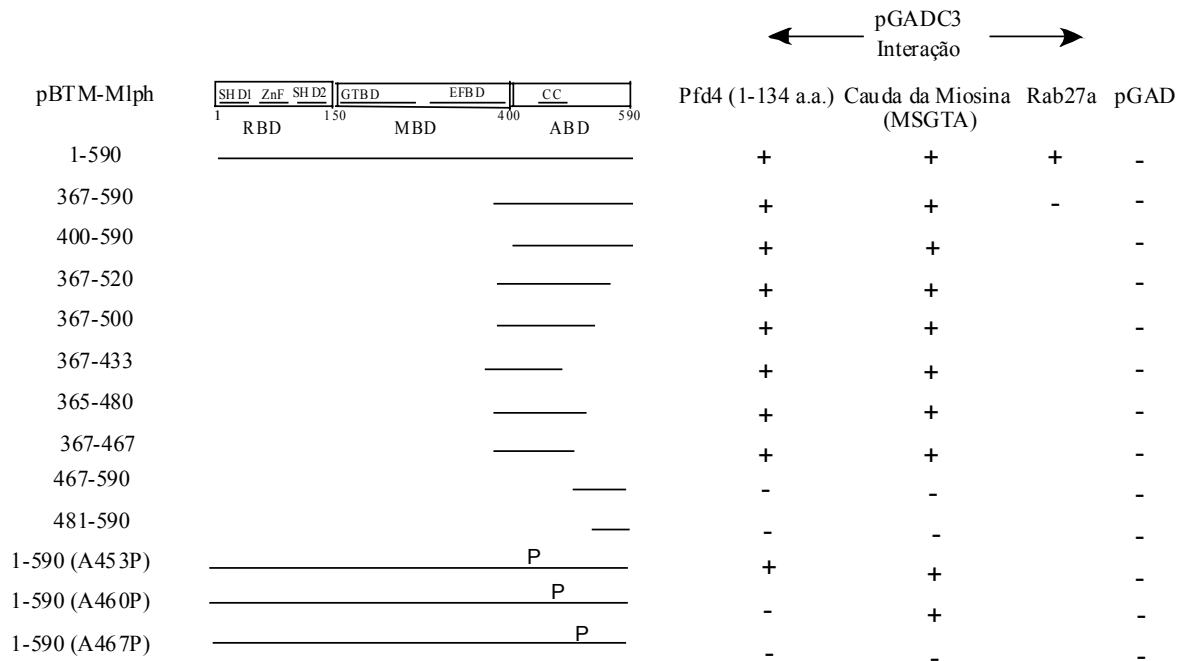


Figura 4.5. Resumo das interações entre os diferentes domínios da Mlph com Pfd4 ou com MSGTA em ensaios de duplo híbrido de levedura baseado na Figura 4.4.

4.5. Produção de proteínas recombinantes para ensaio de interação proteína-proteína *in vitro*

Uma vez que ensaios de duplo híbrido de levedura podem gerar resultados falso-positivos, há necessidade de confirmarmos bioquimicamente a interação direta entre Mlph e Pfd4.

Por isso, diferentes construtos de Mlph foram produzidos através da fusão da GST (Glutathione S-transferase) de bactéria no N-terminal da Mlph. O *tag*-GST foi utilizado por ser de fácil purificação e altamente solúvel o que auxilia a solubilidade da proteína fusionada como um todo, além de prevenir a formação de corpos de inclusão. A GST sozinha foi purificada (**Figura 4.6B**) para servir como controle negativo nos experimentos *in vitro* subsequentes. Nossa ideia inicial era de produzir e purificar GST-Mlph completa, todavia devido ao baixo nível de expressão obtido nas culturas de *E. coli* e ao fato de que a proteína completa ser altamente sujeita a degradação, nós retiramos os 150 primeiros aminoácidos da Mlph (Mlph- Δ RBD). A alta taxa de degradação pode ser consequência da presença de uma sequência de aminoácidos PEST na região central da Mlph, o que torna esta região altamente suscetível a proteólise (Fukuda & Itoh, 2004).

Os construtos de GST-Mlph expressos sem o N-terminal da Mlph 150-590 (Δ RBD) se mostraram mais estáveis, foram expressos em maior quantidade em *E. coli* e menos sujeitos a degradação quando comparado a Mlph inteira. Para aumentar a expressão das proteínas fusionadas a GST e reduzir os níveis de degradação, controlamos a temperatura e o tempo de indução. Variamos também a concentração de IPTG de 0,1 a 0,5 mM (v. § 3.5.1). A Figura 4.6B mostra umas das purificações de Mlph fusionada a GST. A condição escolhida para indução foi de 0,1 mM de IPTG, a 30°C por 4 horas. Mesmo nesta condição aperfeiçoada, a quantidade de GST-Mlph expressa foi baixa e sujeita à degradação, quando comparada a GST-MSGTA, por exemplo, indicando que a Mlph é uma proteína instável em solução.

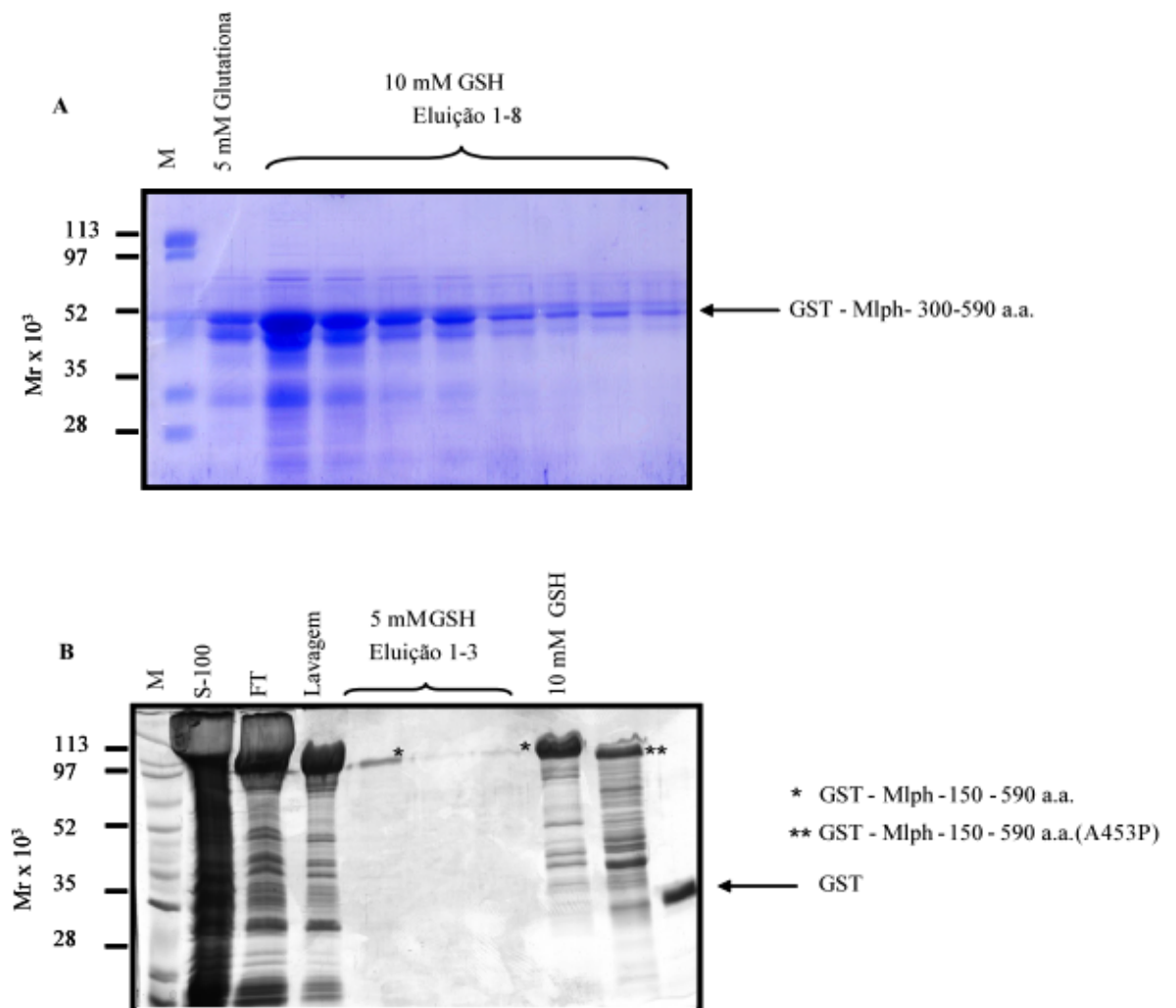


Figura 4.6. Perfil de purificação das proteínas fusionadas a GST. (A) GST-Mlph 300-590 a.a., (B) GST-Mlph150-590 a.a. (A453P) e GST foram induzidos a 37°C por duas horas com 0,5 mM de IPTG. GST-Mlph150-590 foi induzida a 30°C com IPTG 0,1 mM. As bactérias induzidas foram lisadas por sonicação e o resíduo celular centrifugadas a 100.000 x g. Proteínas fusionadas a GST foram separadas do sobrenadante via incubação com esferas de glutathione reduzida. As esferas foram lavadas e as proteínas fusionadas a GST eluidas com 5 ou 10 mM de glutathione. Amostras da eluição foram aplicadas em gel de SDS-PAGE a 12% e as proteínas detectadas por Coomassie. M- Marcador de peso molecular, S100- Sobrenadante após centrifugação a 100.000 x g, FT- Sem adição de glutathione reduzida.

4.6 Produção de proteínas fusionadas a MBP

Ainda com o objetivo de confirmar a interação da Mlph com Pfd4 e MSGTA observada em nosso ensaio do duplo híbrido de levedura, fusionamos Pfd4 e MSGTA ao vetor pMAL, que codifica a proteína que ligante de maltose (MBP). A escolha do vetor pMAL se deve à estabilidade da proteína quando fusionada a MBP e sua fácil purificação quando expressa em *E. coli*. O sobrenadante do lisado (S100) é incubado com esferas de amilose, a MBP se ligar às esferas com alta afinidade e a proteína é eluída com 10 mM de maltose (**Figura 4.7**). As frações eluídas são dialisadas no tampão de lavagem para retirada do excesso de maltose e a concentração da proteína aferida por microespectrofotômetro. A utilização de proteínas fusionadas a diferentes *tags* é ideal para detecção da interação proteína-proteína *in vitro* por imunodeteção. Utilizamos também MSGTA fusionada ao *tag* His₆ (v. § 3.5.2).

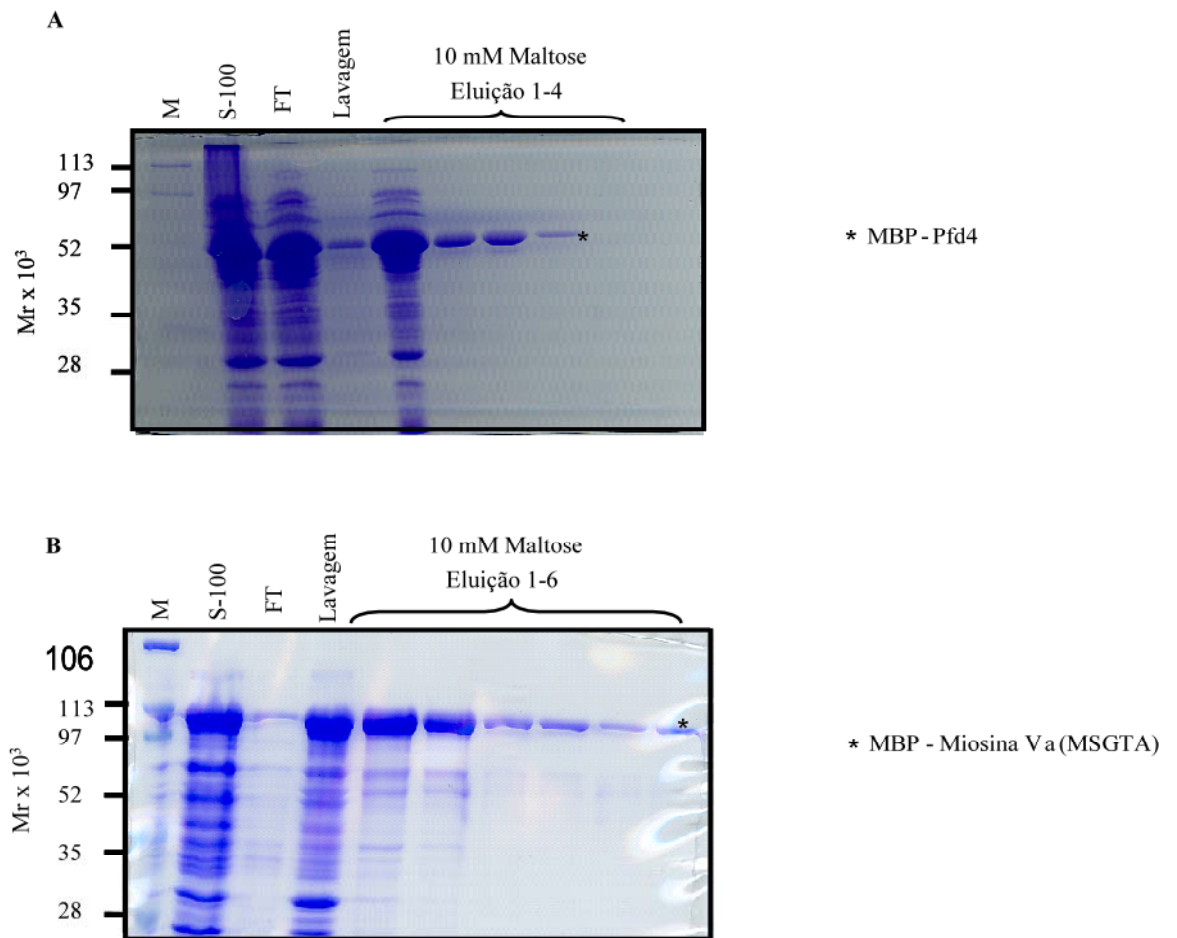


Figura 4.7. Perfil de purificação das proteínas fusionadas a MBP. (A) MBP-Pfd4 e (B) MBP-MSGTA foram induzidas a 37°C por 2 horas com 0,5 mM de IPTG. As bactérias induzidas foram lisadas por sonicação e o resíduo celular centrifugado a 100.000 x g. Proteínas fusionadas a MBP foram separadas do sobrenadante via incubação com esferas de amilose. As esferas foram lavadas e as proteínas fusionadas a MBP eluídas com 10 mM de maltose. Amostras da eluição foram carregadas em gel de SDS-PAGE a 12% e as proteínas detectadas por Coomassie. M- Marcador de peso molecular, S100- Sobrenadante após centrifugação a 100.000 x g, FT- Sem adição de maltose.

4.7 Mlph e Pfd4 recombinante interagem *in vitro*

Para investigar a interação da Pfd4 com determinados construtos da Mlph, primeiro testamos se 100 picomoles de Mlph (ou mais quando indicado) é suficiente para se ligar às esferas de glutationa Sefarose e ser detectada via ensaio de interação proteína-proteína denominado de *pull-down*. A **Figura 4.8B** mostra o resultado de pré-incubação durante 20 min a 60 h entre 100 pmol GST-Mlph150-500 a.a. e 20 μ L de esferas de glutationa Sefarose, em 50 μ L de volume final. Pode ser observado na **Figura 4.8B** que 30 min de incubação é suficiente para GST-Mlph se ligar às esferas, o que permite captá-las por centrifugação (0,8 x g). Sendo assim, após 30 min de interação entre Mlph e as esferas de glutationa Sefarose, adicionava-se 100 pmol de MBP-Pfd4 ou MSGTA e esperava-se mais 30 min para a interação proteína-proteína. Se houver interação da GST-Mlph com Pfd4 ou com MSGTA, a GST-Mlph se liga às esferas de glutationa-Sefarose que são separadas por centrifugação (0,8 x g). As proteínas fortemente ligadas à GST-Mlph permanecem no precipitado, mesmo após sucessivas lavagens, e podem ser detectadas pela técnica de *Western blot*.

Os construtos de GST-Mlph contendo apenas a região ligadora da parte globular da cauda da miosina (GTBD) (150-266 a.a) ou a outra extremidade da proteína, a região C-terminal (481-590 a.a), não interagem com Pfd4 (**Figura 4.9, colunas 2 e 9**). A Mlph com parte do C-terminal isolado (300-590 e 300-500) não é capaz de recrutar Pfd4 (**Figura 4.9, colunas 7 e 8**). Por outro lado, os construtos GST-Mlph 150-590 a.a, que contém a região central (MBD) junto com o C-terminal e GST-Mlph 150-500 a.a que contém o MBD unido à região de *coiled-coil* da Mlph, foram capazes de interagir significativamente mais com Pfd4 quando comparado à interação de Mlph com essas regiões isoladas (**Figura 4.9, colunas 3 e 5**).

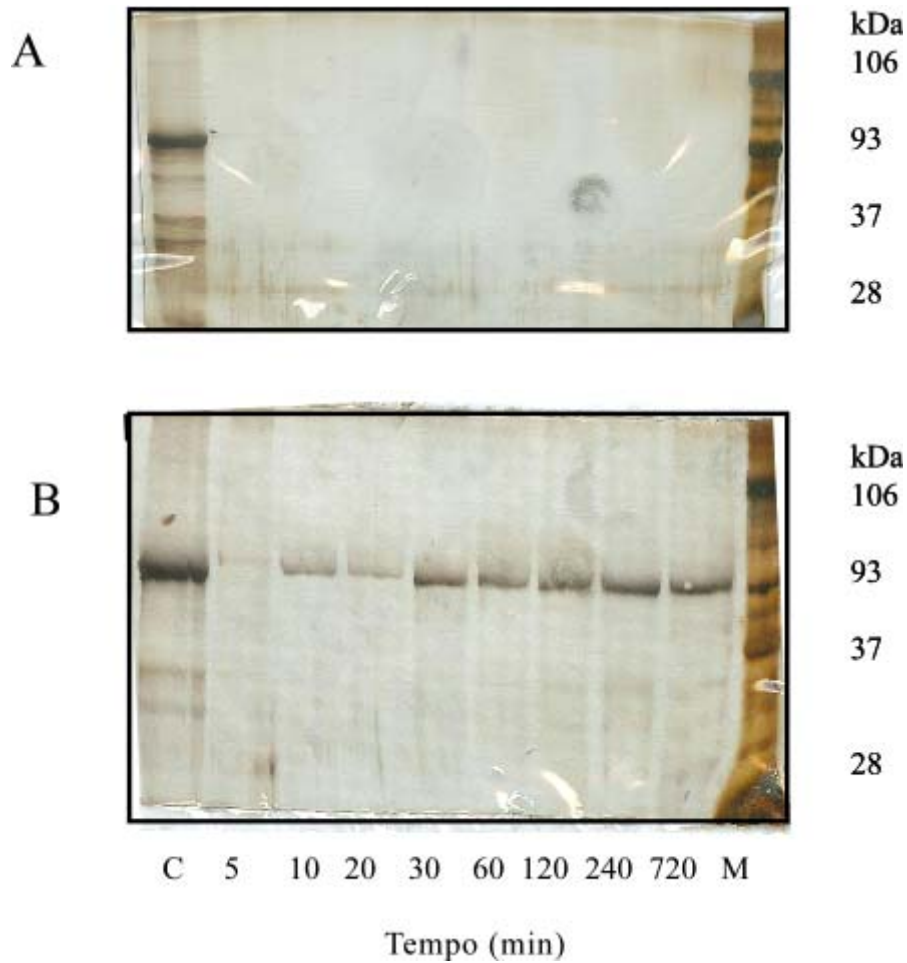


Figura 4.8. Ensaio de interação entre GST-Mlph com esferas de glutationa Sefarose. Após os tempos de pré-incubação indicado em baixo do gel B, as esferas de glutationa Sefarose foram centrifugadas e lavadas 3 vezes com tampão de lavagem e depois fervidas a 100% junto ao tampão SB. A GST-Mlph ligada às esferas foi identificada em gel SDS-PAGE 12% corado por prata. A (gel do sobrenadante): as proteínas não foram detectadas no sobrenadante; B (gel do precipitado):; GST-Mlph (GST-Mlph150-500) se liga estavelmente às esferas de glutationa Sefarose após 30 min de interação. C, Mlph controle; M, marcador de peso molecular.

A substituição da alanina por prolina pontualmente na posição 453 dos construtos Mlph 150-590 e Mlph 150-500, denominado de Mlph 150-590AP e Mlph 150-500AP, reduziu drasticamente a interação da Mlph com a Pfd4 (**Figura 4.9, colunas 4 e 6**). As prolinas são conhecidas por sua capacidade de desestabilizar regiões estruturadas em *coiled-coil*. Como controle, a GST sozinha não foi capaz de interagir com Pfd4.

Para aprofundar o mapeamento do domínio de ligação da Pfd4 (Pfd4BD) na Mlph, nós pré-incubamos construtos de Mlph contendo apenas regiões do C-terminal (400-500 a.a e 300-433 a.a) com Pfd4 (**Figura 4.10, colunas 6 e 7**). Pode ser observado que a interação foi significativamente menor do que a interação do construto de Mlph contendo a região central (Mlph-150-483) com a Pfd4 (**Figura 4.11, coluna 3**). Estes dados indicam que a interação da Pfd4 com Mlph é dependente da presença dos resíduos hidrofóbicos do C-terminal da Mlph. Entretanto, GST fusionado a MyRIP, proteína que divide alta homologia com a Mlph e que também contém uma região de *coiled-coil* em seu C-terminal, não interage com Pfd4 (**Figura 4.10, colunas 5 e Figura 4.11**), o que sugere certa especificidade na interação entre Mlph e Pfd4.

Comparando a interação entre Mlph e Pfd4 com a interação entre Mlph e MSGTA, nossos dados sugerem que o sítio de ligação da Pfd4 na Mlph sobrepõe domínio de ligação para MSGTA na Mlph. Os dados de interação entre Pfd4 e Mlph estão de acordo com os dados de Hume et al. (2006), que mostraram que apenas os fragmentos de Mlph que contém o C-terminal são competentes para recrutar miosina Va em melanócitos *leaden*. A **Figura 4.11** resume as interações entre Mlph e Pfd4 observados nesta tese.

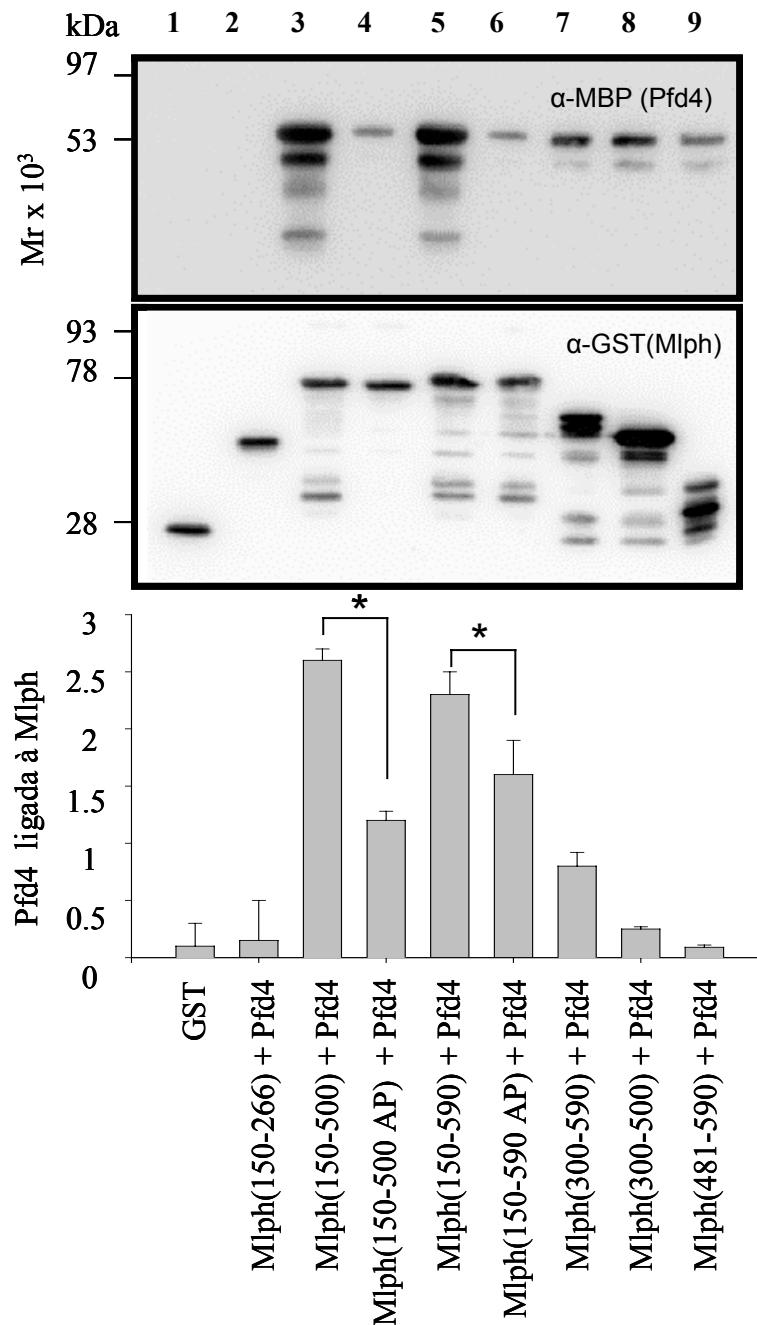


Figura 4.9. Interação entre construtos de Mlph e Pfd4. Cem pmoles da GST-Mlph foram incubadas com 100 pmoles MBP-Pfd4 na presença de esferas de glutationa Sefarose em 50 μ L de tampão. As proteínas ligadas foram precipitadas, e após 3 lavagens foram submetidas a eletroforese e transferência. As proteínas foram imunodetectadas por quimoluminescência, usando anticorpos anti-GST e anti-MBP. O total de bandas foi quantificado usando o software Aida e a interação relativa (histogramas) foi calculada pela divisão da intensidade das bandas da MBP-Pfd4 pela intensidade da banda de GST-Mlph. Os experimentos foram feitos em triplicata. * indica diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação a Mlph 150.590 a.a e 150-500 a.a. A migração do padrão de peso molecular está indicada à esquerda de cada blot. Os construtos AP contém a mutação A453P.

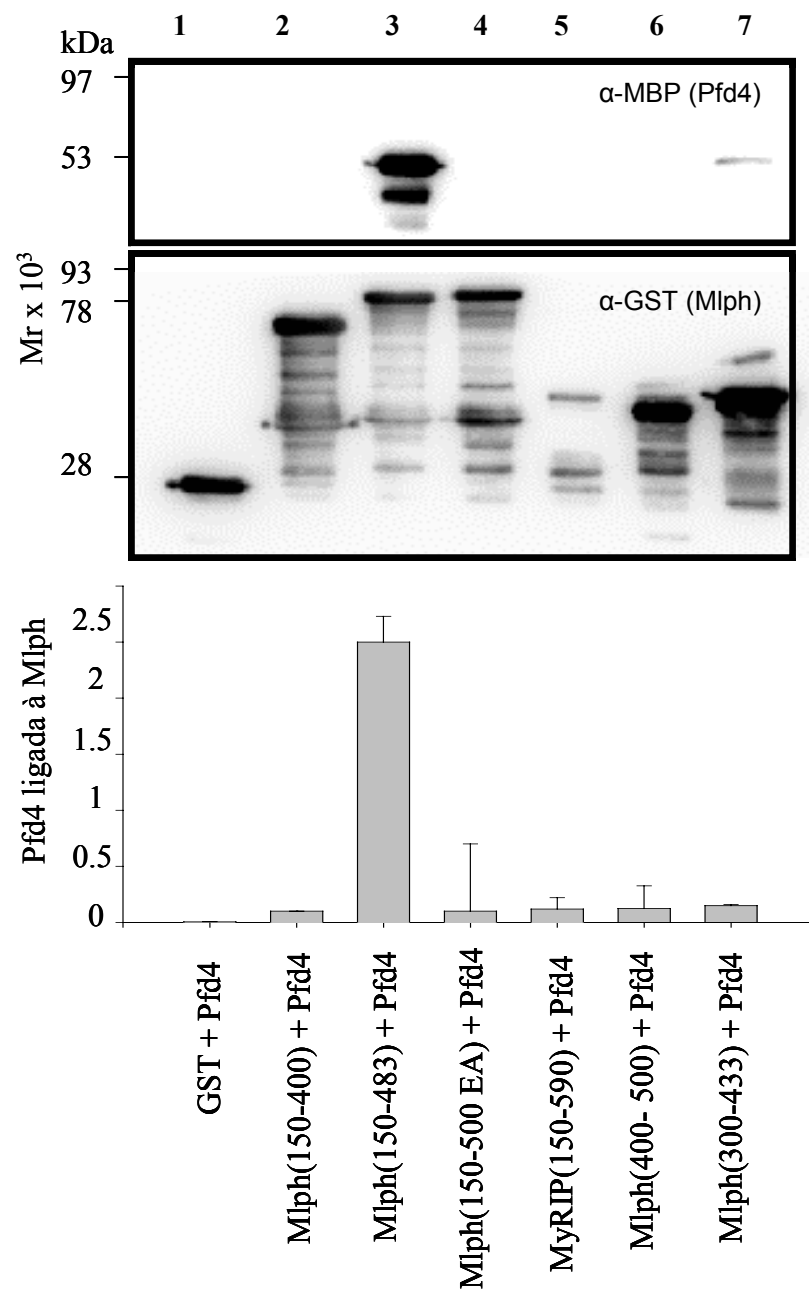


Figura 4.10 Interação da Pfd4 com construtos de Mlph ou MyRip. Cem pmoles da GST-Mlph ou GST-MyRIP foram incubadas com 100 pmoles MBP-Pfd4 na presença de esferas de glutathione Sefarose como descrito em Material e Métodos. Note que Pfd4 não interage com MyRIP tampouco com fragmentos de Mlph contendo apenas o C-terminal. O fragmento Mlph300-433 a.a. é o mínimo necessário para interação com Pfd4. As proteínas ligadas foram precipitadas, e após 3 lavagens consecutivas foram submetidas a eletroforese e transferência, seguida de imunotecção usando anticorpos anti-GST e anti-MBP. O total de bandas foram quantificadas por quimioluminescência usando o software Aida e a interação relativa (histograma) foi calculada pela divisão da intensidade das bandas da MBP-Pfd4 pela intensidade da banda de GST-Mlph. Os experimentos foram feitos em triplicata. A migração do padrão de peso molecular está indicado à esquerda de cada blot.

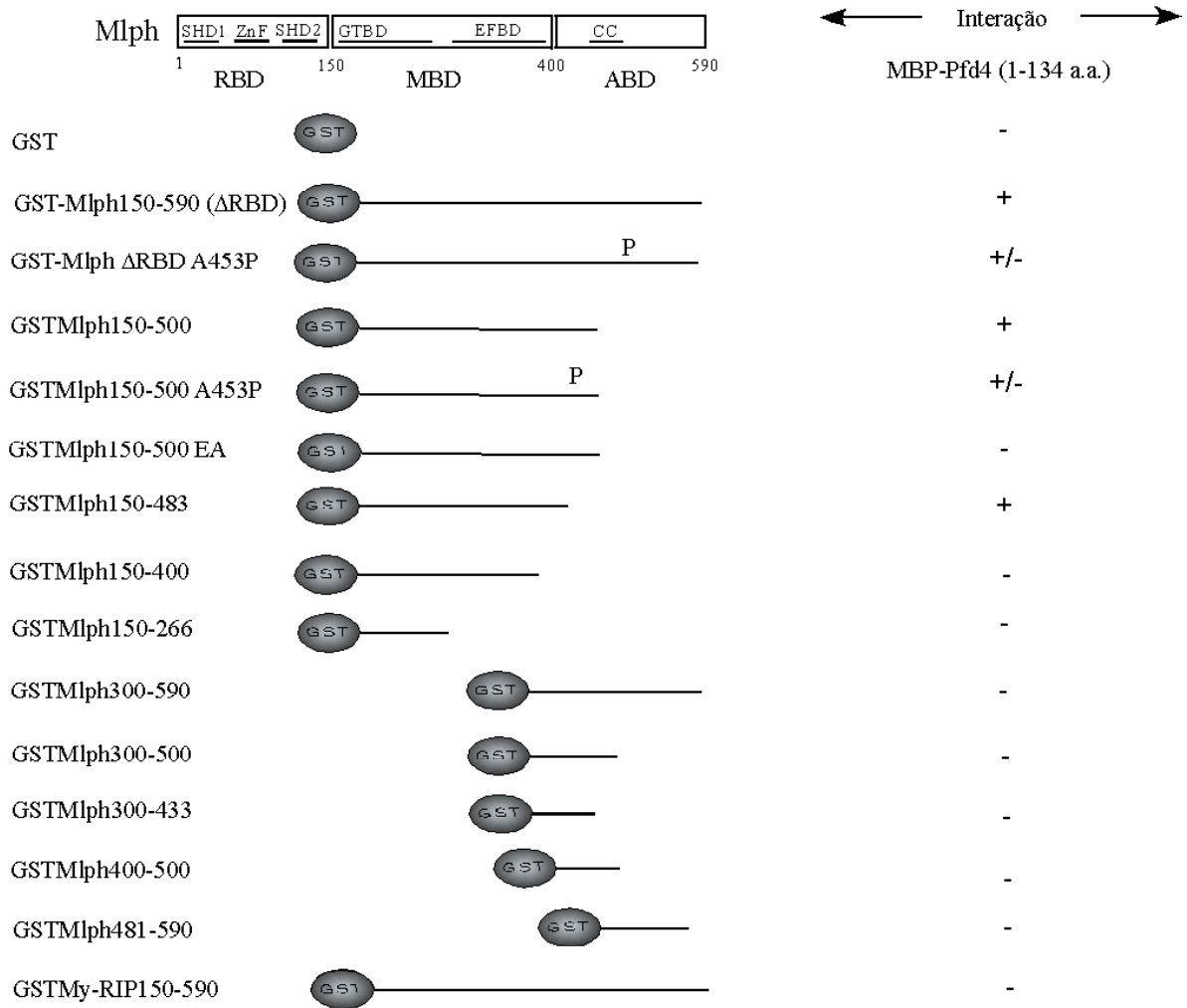


Figura 4.11. Resumo das interações entre os construtos GST-Mlph e MBP-Pfd4 *in vitro*.

Para confirmarmos a hipótese de que Pfd4 e MSGTA se ligam na mesma região da Mlph, nós desenvolvemos um ensaio de competição *in vitro* entre a MBP-Pfd4 e His-MSGTA pelo sítio de interação com Mlph. Cem pmoles de GST-Mlph foram pré-incubados com 100 pmoles de His-MSGTA na presença de esferas de glutaciona-Sefarose e 30 min depois adicionamos 100 pmol MBP-Pfd4. A pré-incubação entre Mlph com MSGTA reduziu em 60% a interação da Mlph com a Pfd4 (**Figura 4.12A, colunas 2 e 5**). Estes dados confirmam a hipótese de que a Pfd4 e a miosina Va se ligam na mesma região da Mlph. Por outro lado, quando invertermos o experimento, pré-incubando a GST-Mlph com MBP-Pfd4 por 30 min e depois adicionando His-MSGTA, a pré-interação da Pfd4 com a Mlph não interferiu na interação entre a miosina Va com a Mlph (**Figura 4.12B, colunas 2 e 5**).

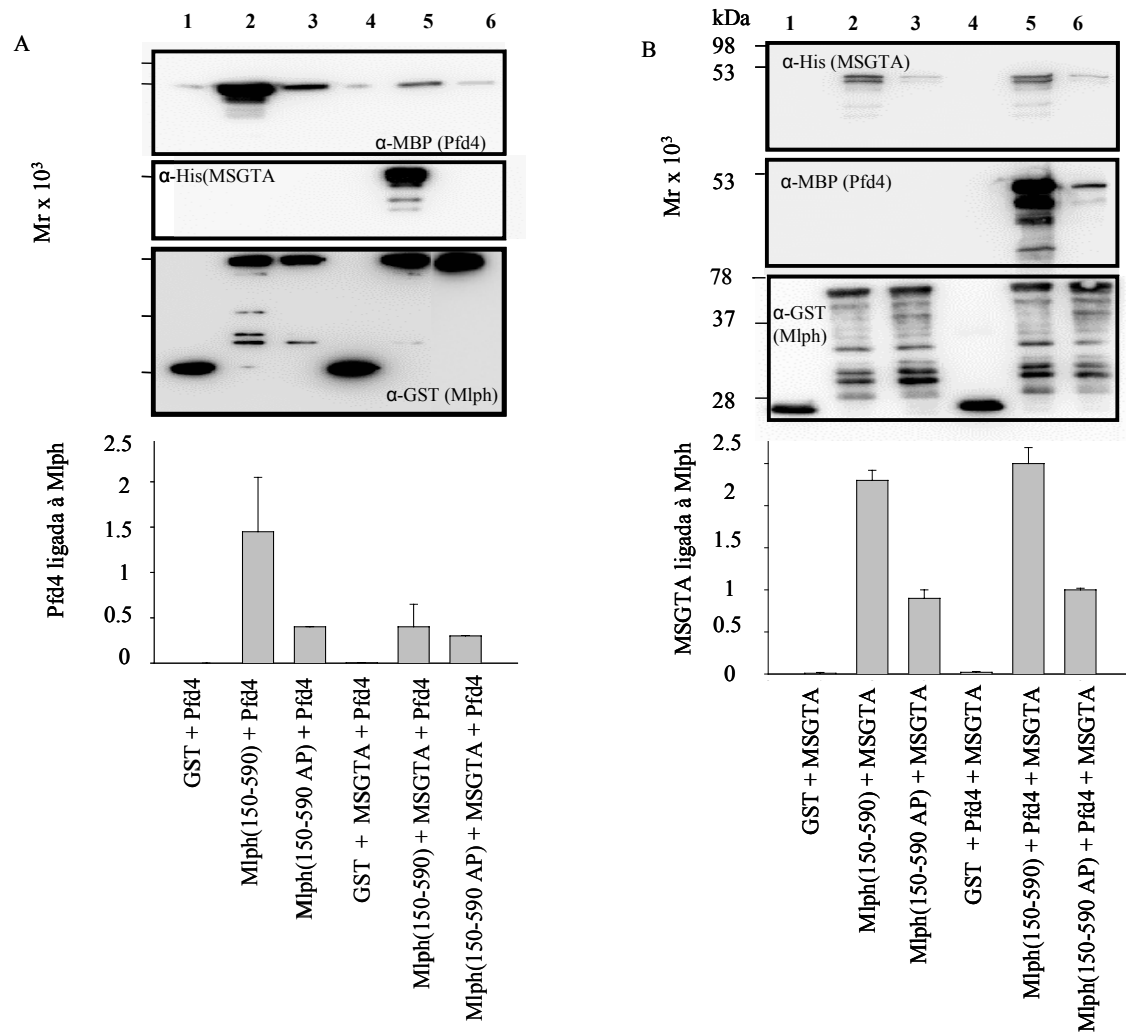


Figura 4.12. Competição entre MSGTA e Pfd4 pelo domínio de interação na Mlph. Cem pmoles de GST-Mlph foi pré-incubado com 100 pmoles de His-MSGTA (A) ou MBP-Pfd4 (B), na presença de esferas de glutathiona Sefarose por 30 min e depois foi adicionado MBP-Pfd4 (A) ou His-MSGTA (B), como descrito em Materiais e Métodos. (A) Note que a formação do complexo Mlph-Pfd4 não interfere na ligação de MSGTA à Mlph. (B) A formação do complexo Mlph-MSGTA impede a ligação de Pfd4 a Mlph. As amostras foram imunodetectadas com anticorpo anti-GST, anti-His e anti-MBP e analisadas como nos ensaios anteriores.

Este resultado nos causou surpresa e nos motivou a descobrir se em alta concentração a Pfd4 seria capaz de competir com MSGTA pelo sítio de interação com a Mlph. 100 pmoles de GST-Mlph (150-590 a.a.) foram pré-incubados com 50 a 600 pmoles de Pfd4. Após 30 min de pré-incubação, 100 pmoles de MSGTA foram adicionados (**Figura 4.13**). A interação de Mlph com MSGTA não foi reduzida pela pré-interação da Mlph com até 300 picomoles de Pfd4. Contudo, 4 vezes mais Pfd4 do que MSGTA foi suficiente para impedir a interação da Mlph com MSGTA. Este dado confirma que Pfd4 se liga à Mlph em uma região que sobrepõe o sítio de interação para a MSGTA. Nossos dados indicam ainda que Mlph tem maior afinidade por MSGTA do que para Pfd4 em concentrações equimolares. Vale destacar que MSGTA se mantém ligada à Mlph com cerca de 4 vezes mais afinidade que a Pfd4, e que é capaz de desfazer a interação da Pfd4 com Mlph em condições equimolares.

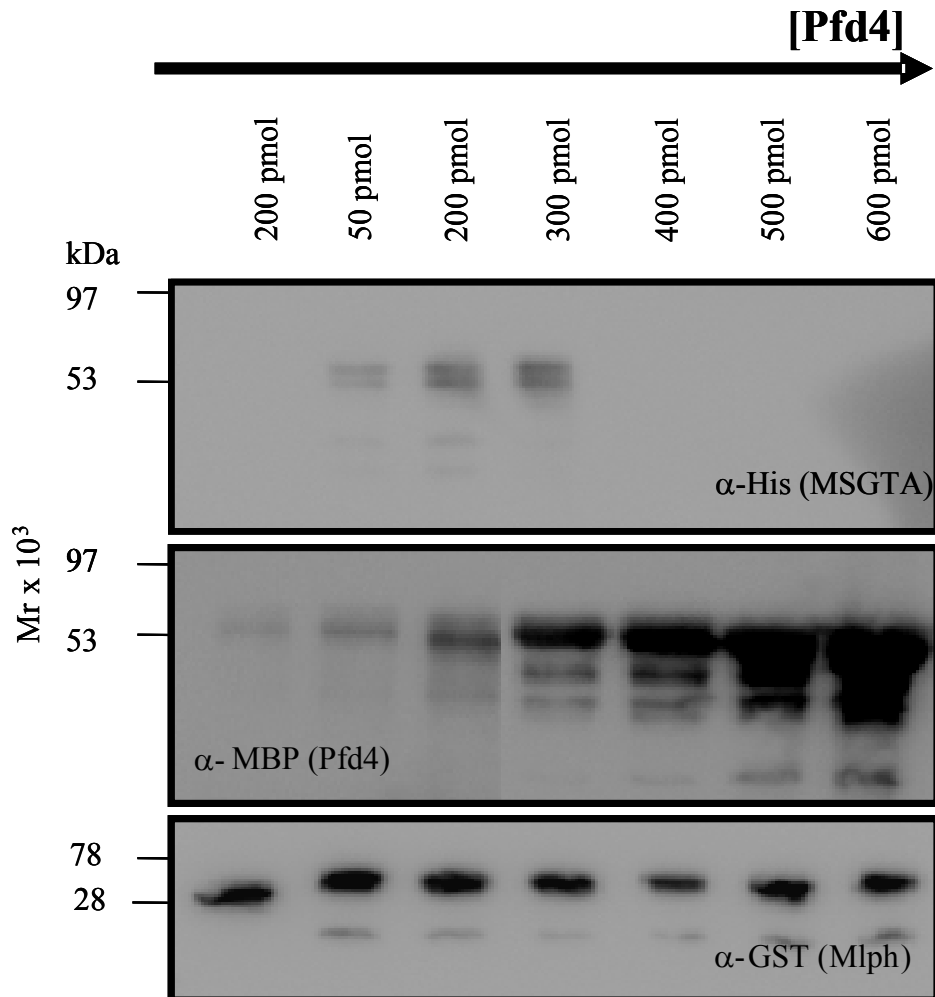


Figura 4.13. Experimento de competição entre MSGTA e diferentes concentrações de Pfd4 pelo domínio de interação com a Mlph. Cem pmols de GST-Mlph150-590 a.a. foram pré-incubada com diferentes concentrações de MBP-Pfd4 na presença de esferas de glutaciona sefarose. 30 min depois 100 pmols de His-MSGTA. Note que um excesso de quarto vezes mais MBP-Pfd4 foi capaz de impedir a interação da miosina Va com Mlph. Os dados foram analisados como descrito no experimento anterior.

4.8 O domínio da Mlph que interage com a Pfd4 e com miosina Va é intrinsecamente desestruturado

A interação da Mlph com a subunidade 4 da chaperona PFD e a grande instabilidade da Mlph *in vitro* nos levou a questionar se a Mlph pode ser uma proteína intrinsecamente desestruturada (ou desenovelada). Para detecção de possíveis regiões desestruturadas da Mlph, candidatas a interagir com chaperonas moleculares, como Pfd4. Nós usamos dois programas que predizem Região de Desordem Natural ou regiões intrinsecamente desordenadas, conhecidos como PONDR e Foldindex (Li et al., 1999; Prilusky et al., 2005).

Regiões de desordem natural podem ser encontradas na proteína como um todo ou em determinadas regiões da proteína que não apresentam estrutura terciária estável. A definição de desordem aqui nesta tese se aplica aos aminoácidos que formam o esqueleto da proteína. Se pegarmos um grupo de proteínas ordenadas, geralmente os seus esqueletos têm o mesmo ângulo de Ramachandran entre as diferentes proteínas, enquanto proteínas com regiões desordenadas apresentam ângulos de Ramachandran diferentes e frequentemente dinâmicos entre o grupo de proteínas desordenadas (Li et al., 1999; Prilusky et al., 2005).

Como evidenciado na **Figura 4.14A**, o programa PONDR prediz que uma grande parte da Mlph é desestruturada. Os gráficos de predição estrutural se baseiam no PONDR score, onde 0,5 a 1 representam probabilidade de uma região ser desestruturada. Analisamos a sequência primária da Mlph, e observamos que esta proteína tem um grande número de aminoácidos que frequentemente estão em regiões desordenadas de proteínas (Ala, Arg, Gly, Gln, Ser, Pro, Glu e Lys) em comparação com aminoácidos conhecidos por estruturar uma região proteica (Trp, Cys, Phe, Ile, Tyr, Val e Leu). Apenas duas regiões da Mlph são preditas como estruturadas. A primeira é no N-terminal da Mlph, domínio que compartilha grande homologia com rabfilina3A. Este domínio foi recentemente cristalizado e é composto por uma

estrutura bem ordenada em *coiled-coil* que interage com Rab3a (Ostermeier & Brunger, 1999; Kukimoto-Niino et al., 2008). A segunda exceção é o extremo do C-terminal da Mlph, que também é predito como ordenado e apresenta mais aminoácidos estabilizantes que a região medial da Mlph.

Os dados obtidos sugerem que a região C-terminal da Mlph é crucial para estruturar globalmente a Mlph e de algum modo garantir sua função. Nossos dados mostram que Pfd4 e miosina Va dependem do C-terminal da Mlph para se ligarem. Os dados de predição estrutural da Mlph mostram que os domínios de interação da Mlph com a Pfd4 e com a MSGTA não apresentam conformação estruturada definida. Contrariamente, MSGTA e Pfd4 apresentam uma grande quantidade de aminoácidos relacionados com proteínas bem estruturadas (**Figura 4.14B-C**), corroborando com a estabilidade e estrutura nativa compacta observada *in vitro* (Siegert et al., 2000; Berg et al., 2001).

4.9 Dicroísmo Circular – O C-terminal da Mlph é fundamental para manter a Mlph estruturada

Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) é um meio sensível para termos acesso às características da estrutura secundária de uma proteína em solução. Para investigarmos as características da Mlph em solução e confirmarmos a predição estrutural feitas *in silico* (**Figura 4.14A**) avaliamos a estrutura secundária da Mlph com e sem o seu C-terminal. Como pode ser observado na **Figura 4.14D** o espectro de CD da GST-Mlph 150-590 a.a. é característico de α -hélices, exibindo uma elipticidade negativa da curva em torno 208 e 222 nm, evidenciando que a Mlph 150-590 a.a. é uma proteína parcialmente estruturada em solução. Contudo, a porção central da Mlph sozinha (150-400 a.a.), sem o C-terminal, parece ser menos estruturada, com uma quantidade de α -hélices significativamente menor. Como comentamos anteriormente, nosso laboratório recentemente descobriu que o C-terminal da

Mlph é crucial para o transporte de melanossomos em células *leaden* (Hume et al., 2006), e nossos dados resumidos nas **Figuras 4.5 e 4.11** mostram que o C-terminal da Mlph é crucial para possibilitar sua ligação à Pfd4. Para confirmarmos os dados obtidos *in-silico*, que mostram que o C-terminal da Mlph é altamente organizado, quando comparado ao resto da proteína, comparamos o perfil da estrutura secundária da Mlph-150-590A453P (Mlph inteira com o C-terminal desestruturado) e Mlph 300-433 a.a. (apenas o C-terminal), com Mlph150-590 a.a. (**Figura 4.14D**). A Mlph150-590-A453P perdeu sua estrutura característica e apresentou uma elipticidade negativa em torno de 205 nm, característico de proteína intrinsecamente desestruturada, bem diferente do perfil da Mlph 150-590 a.a., que parece ser uma proteína melhor estruturada em α -hélice. Tampouco a Mlph 300-590 a.a. mostrou evidências de possuir estrutura secundária firme, seja ela em α -hélice ou folhas- β . Mlph sem o C-terminal (Mlph 150-400 a.a.) reduz o conteúdo de estrutura secundária e parece adquirir uma forma instável, reduzindo conteúdo de α -hélices, possivelmente por estar separada do C-terminal da Mlph (**Figura 4.14D**). Esses dados reforçam a nossa hipótese de que a Mlph precisa funcionar como um todo, e perde sua estabilidade quando seus múltiplos domínios são separados. O C-terminal parece garantir ao restante da Mlph a estabilidade necessária, porém sozinho não é capaz de se manter estruturado.

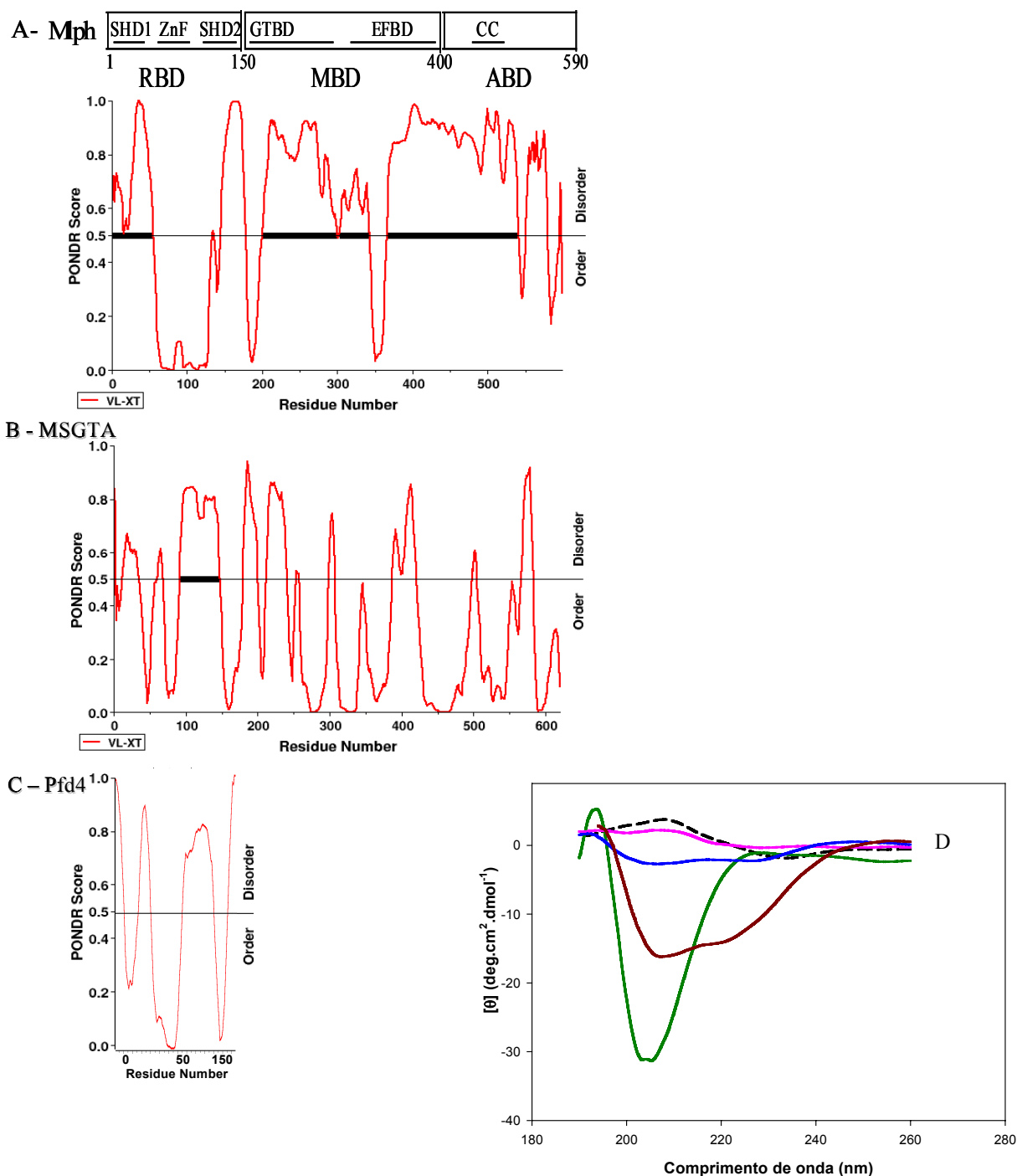


Figura 4.14. Análise estrutural *in silico* e *in vitro* da Mlph. (A) Análise da Mlph de camundongo; (B) Análise de MSGTA; (C) Análise da Pfd4. Note que diferente das outras proteínas, Mlph contém uma grande área predita como desordenada, principalmente sobre os domínios de interação com a miosina Va e Pfd4. D, Espectro de CD de diversos construtos da Mlph fusionada com GST. Mlph150-590 a.a. (marrom), Mlph150-400 a.a. (azul), Mlph300-590 a.a. (rosa) e Mlph150-590A453P (verde). Note que o fragmento que contém o C-terminal da Mlph isolado (Mlph300-590 a.a.) e o fragmento com a mutação pontual A453P (Mlph150-590A453P) perdem sua estrutura nativa. GST sozinha também parece ter uma estrutura randômica (preto pontilhado).

4.10 O conteúdo de α -hélice da Mlph aumenta quando ligada à miosina Va ou à

Pfd4 O enovelamento e a interação proteína-proteína são eventos análogos nos quais a proteína busca interações intra ou intermoleculares que favoreçam sua conformação nativa funcional. Por isso muitas proteínas instáveis ou intrinsecamente desestruturadas precisam se ligar a outra proteína ou proteínas para alcançar o enovelamento e função (Tsai et al., 1999). O mecanismo pelo qual o enovelamento é consequência da interação proteína-proteína é ainda pouco entendido. Mais recentemente, evidências experimentais demonstraram que a busca pelo enovelamento correto não é um processo guiado por uma série de passos bem definidos e sim uma busca aleatória. A base conceitual para esta afirmação seria que as flutuações inerentes à conformação de um polipeptídeo parcialmente enovelado permitem que mesmo resíduos bastante distantes na sequência de aminoácidos façam contatos uns com os outros (Fersht, 2000b).

Decidimos então conferir a estrutura global do complexo Mlph-MSGTA e do complexo Mlph-Pfd4, para verificarmos se as interação proteína-proteína estabilizam a estrutura secundária da Mlph. Vale lembrar que nossos dados *in silico* e *in vitro*, somados aos dados da literatura, predizem que a Mlph é a mais instável estruturalmente dentre as três proteínas (Geething & Spudich, 2007). Mlph e MSGTA foram misturadas em concentrações equimolares e interagiram por 12 h no gelo. Quando comparamos o espectro de CD das proteínas isoladas com o obtido pelo complexo protéico, o conteúdo de estrutura secundária observado para o complexo Mlph-MSGTA foi maior do que o espectro obtido pela soma dos espectros da Mlph e MSGTA individuais (Figura 4.15).

A Figura 4.15 A mostra que a Mlph Δ RBD apresenta estrutura secundária característica em α -hélice com elipticidade negativa em torno de 208 e 220 nm. Quando pré-incubamos Mlph com MSGTA, o espectro da Mlph foi maior que o predito teoricamente pela soma dos espectros das duas proteína isoladas. Assumimos que a proteína que ganha estrutura com a

interação é a Mlph, pois o cristal da miosina Va mostra que a sua porção globular é superestruturada em espiral superespiralada e é altamente estável em solução (Sellers & Knight, 2007). A Mlph 150-400 a.a. sem o C-terminal perde significativamente estrutura em α -hélice quando isolada, todavia, ganha estrutura maior que visto pela comparação do complexo com a soma dos dois espectros após a interação com MSGTA. Vale ressaltar que o maior ganho da Mlph 150-400 a.a. ocorre especificamente em torno de 220 nm (**Figura 4.15 B**).

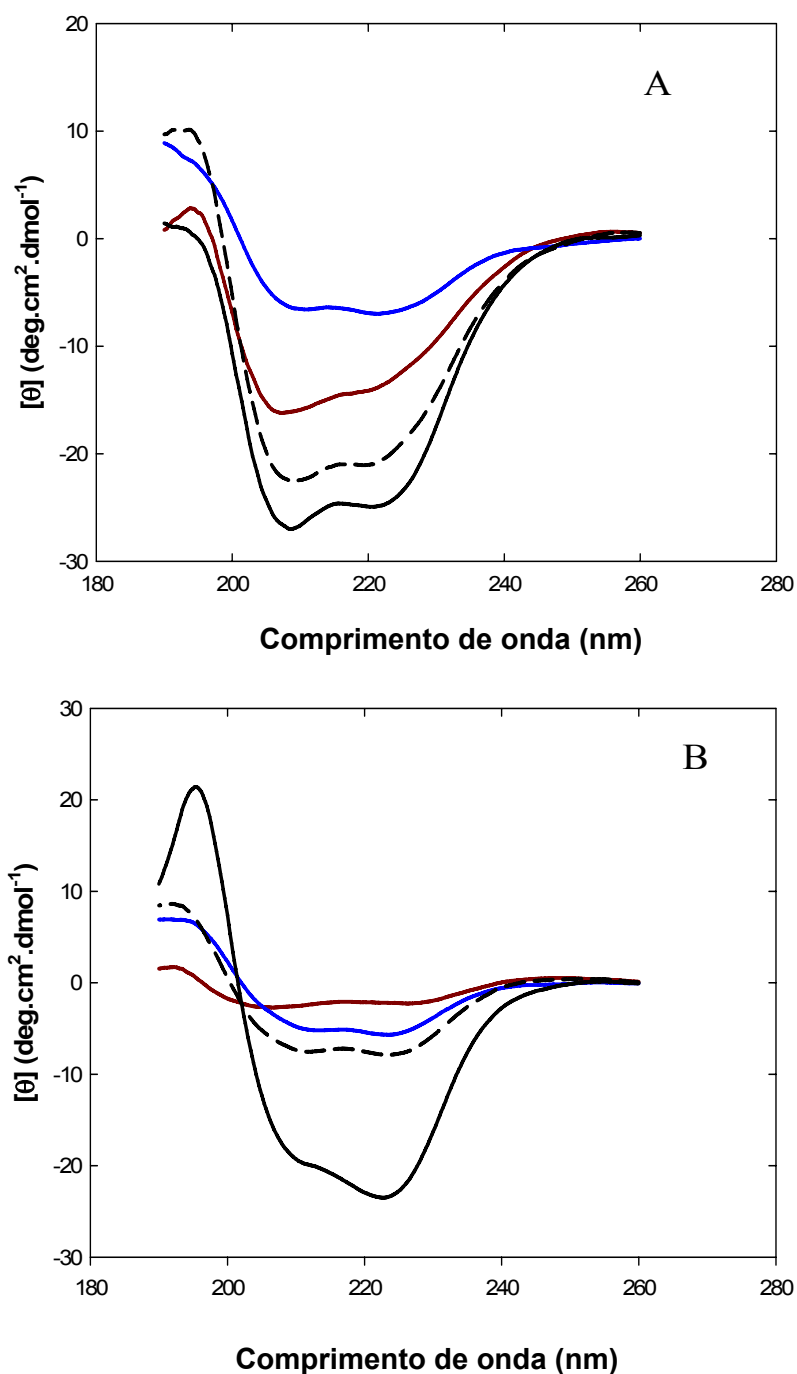


Figura 4.15. Os espectros de CD da Mlph (A,150-590; B,150-400) sugerem que a formação do complexo binário com MSGTA induz a aumento da quantidade de estrutura secundária da Mlph. Cada proteína foi adicionada na concentração final de 10 μM . A, Espectro de CD da Mlph 150-590 (marrom), espectro da cauda da miosina Va (azul), espectro teórico obtido com a soma dos espectros das duas proteínas (preto pontilhado); e espectro do complexo (Mlph + cauda da miosina Va, preto). B, Espectro de CD da Mlph 150-400 (marrom) e os outros marcados como no painel A. Note que o espectro de CD do complexo é maior que o espectro teórico.

O próximo passo foi pré-incubar a Mlph Δ RBD com Pfd4. O espectro da Mlph Δ RBD se manteve condizente com estrutura em α -hélice e o espectro do complexo Mlph Δ RBD e Pfd4 foi maior que o predito pelo somatório dos espectros das proteínas isoladas. Considerando os dados na literatura sobre a ultra-estrutura da PFD e de suas subunidades, inclusive Pfd4, assumimos que a proteína que ganha estrutura é a Mlph Δ RBD, principalmente em α -hélice, quando em contato com a Pfd4 (**Figura 4.16**).

O mesmo resultado foi observado quando a Mlph 150-400 a.a. foi incubada com a Pfd4 (**Figura 4.16B**). Destacamos que a elepticidade negativa dentro do espectro do complexo da Mlph quando em contato com Pfd4 é condizente com formação de *coiled-coil* (220 nm), sugerindo a maior estruturação deste domínio da Mlph. Estes dados mostram que a interação proteína-proteína favorece a aquisição de estrutura secundária da Mlph, e sugerem que tanto miosina Va como Pfd4 atuam como proteínas que induzem o enovelamento da Mlph (**Figura 4.15 e 4.16**).

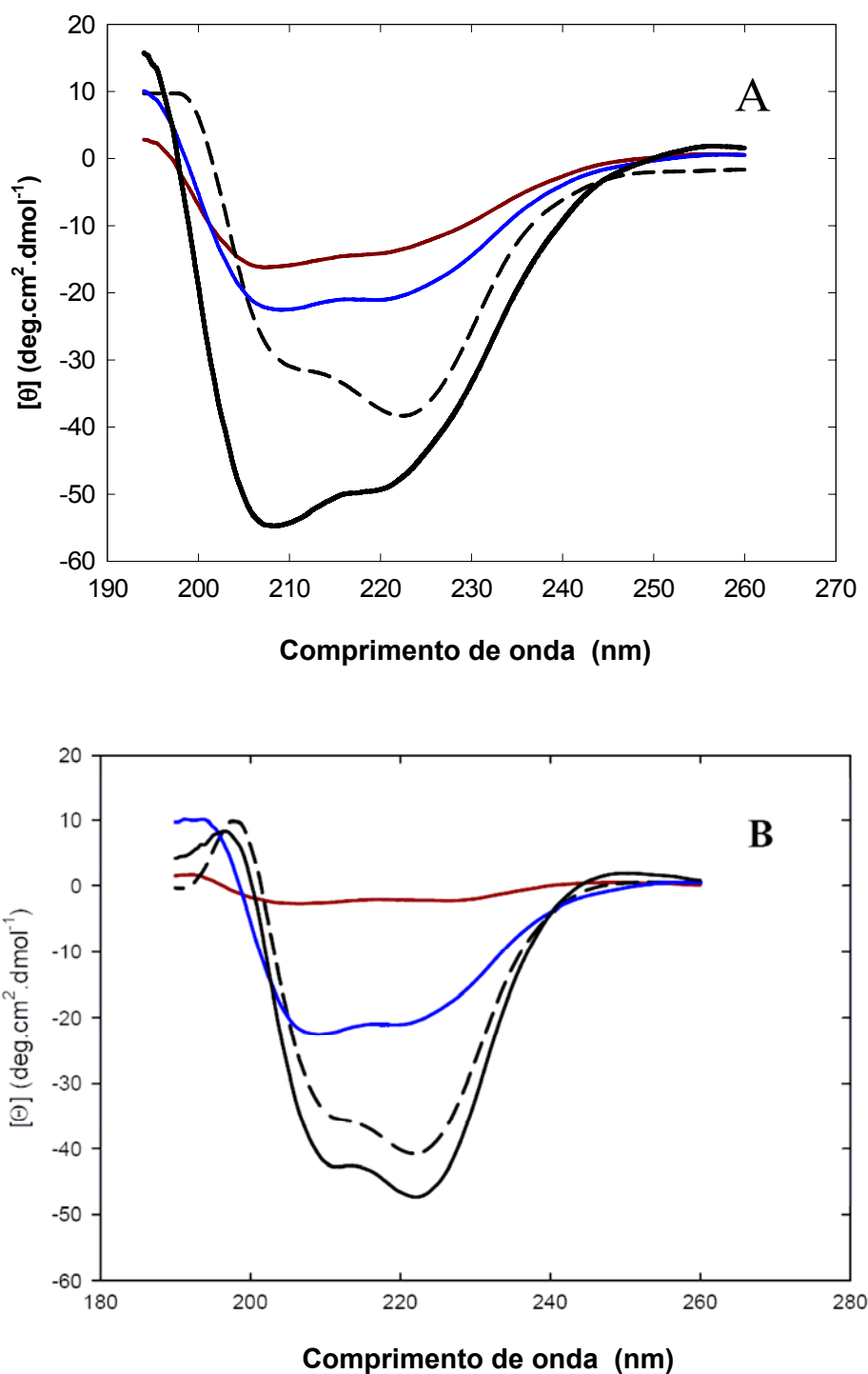


Figura 4.16. O espectro de CD da Mlph (A 150-590 a.a.; B 150-400 a.a.) sugerem que a formação do complexo binário com Pfd4 induz a aumento da quantidade de estrutura secundária da Mlph. Cada proteína foi adicionada na concentração final de 10 μM . A, Espectro de CD da Mlph 150-590 (marrom), da Pfd4 (azul), da soma dos espectros das duas proteínas (preto pontilhado), e o espectro do complexo (Mlph +Pfd4). B, Espectro de CD da Mlph 150-400 (marrom) e os outros indentificados como no painel A. Note que o conteúdo de estrutura secundária do complexo é maior que o espectro teórico.

4.11 O C-terminal da Mlph é crucial para recrutar miosina Va e Pfd4 *in vitro*

Para acessarmos diretamente a afinidade da Mlph por Pfd4 e da Mlph por MSGTA, os construtos de GST-Mlph foram marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (que reage com aminas livres em proteínas), para a realização de experimentos de anisotropia de fluorescência. A anisotropia de fluorescência é o parâmetro que mede a difusão rotacional de uma molécula a partir da diferença na correlação de polarização da fluorescência emitida (Chin et al., 2004). Esta técnica nos permite marcar a Mlph com uma sonda fluorescente e medir a rotação total da molécula ou parte da molécula em relação ao todo. Uma vez que a anisotropia de fluorescência mede a mobilidade dos fluoróforos durante o tempo de vida do estado excitado, podemos dizer que a anisotropia varia de maneira inversamente proporcional a mobilidade da molécula. Se houver interação entre a molécula marcada com algum ligante que diminua sua rotação, proporcionalmente haverá um aumento do sinal de anisotropia, pois será menor a rotação da proteína e consequentemente do seu fluoróforo.

As medidas de anisotropia mostram que a Mlph marcada com FITC (10 μ M) interage com miosina Va (MSGTA) (Figura 4.17A) e com Pfd4 (Figura 4.17B). O aumento do sinal de anisotropia mostra interação entre miosina Va ou Pfd4 e Mlph 150-590 a.a. Todavia, Mlph 150-590A453P, ou apenas o C-terminal da Mlph (400-590 a.a) marcadas com FITC não foram capazes de interagir com miosina Va ou Pfd4. Como controle negativo, utilizamos miosina II. Mlph não interage com miosina II, mostrando a especificidade de interação entre a Mlph e a miosina Va ou Pfd4 (**Figura 4.17**).

A curva de anisotropia nos permite avaliar a de interação da Mlph com a Miosina Va e Pfd4. A constante de dissociação entre Mlph 150-590 a.a. e MSGTA é de $\sim 0,5 \mu$ M. Mlph 150-590 e Pfd4 apresentam uma constante de dissociação de $\sim 4 \mu$ M. Estes dados comprovam que o C-terminal da Mlph é crucial para o recrutamento da Pfd4 e miosina Va, todavia ele sozinho não é suficiente para a interação.

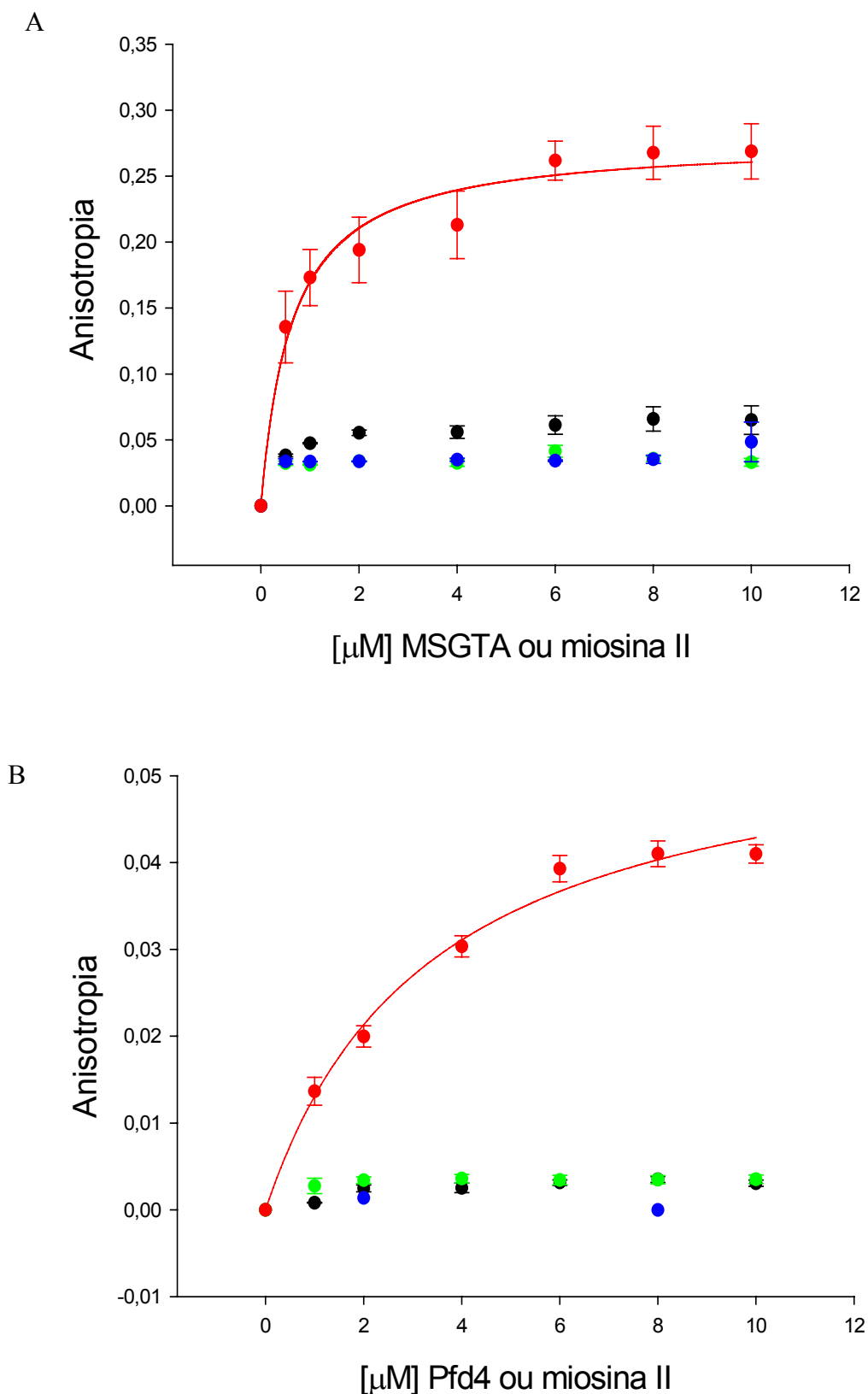


Figura 4.17. O C-terminal da Mlph é crucial para recrutar MSGTA (A) e Pfd4 (B). Mlph marcada com FITC (10 μ M) se liga à cauda da miosina Va e a Pfd4. Nem a miosina Va (A, vermelho) nem Pfd4 (B, vermelho) interage com o C-terminal da Mlph sozinho (400-590, preto), nem com a porção central da Mlph com o C-terminal da Mlph desestruturado (150-590 A453P, verde). Mlph não interage com miosina II muscular (azul). As amostras foram excitadas em 494 nm. Dados de 3 (A) e 4 (B) preparações diferentes.

Capítulo 5 - Discussão

5 Discussão

5.1 Identificação da prefoldina 4 (Pfd4) como parceiro molecular da melanofilina (Mlph)

O transporte de vesículas e organelas é crucial para diversos processos celulares em eucariotos, desde a compartimentalização subcelular, secreção de vesículas e hormônios, fertilização de ovócito, liberação de neurotransmissores até o transporte de melanosomos no epitélio pigmentado da retina e em melanócitos (Barral & Seabra, 2004; Desnos et al., 2007). O ciclo celular de uma vesícula geralmente tem três etapas: endocitose ou formação da vesícula em alguma membrana celular específica, exocitose ou fusão da vesícula na membrana alvo e por fim, reciclagem da maquinaria proteica após a exocitose. Todos estes eventos dependem da participação de motores moleculares e seus adaptadores proteicos. Nesta tese nós focamos na interação proteína-proteína e na caracterização estrutural da melanofilina, a proteína adaptadora chave para o transporte de vesículas contendo pigmentos em melanócitos.

Nós identificamos pela primeira vez uma interação da Mlph com Pfd4. A sequência da Mlph que interage com Pfd4 (150-483 a.a) contém o domínio de ligação descrito para a miosina Va (150-400 a.a) conforme visto no ensaio de duplo híbrido de levedura (*in vivo*) e nos ensaios de *pull-down* (*in vitro*). Devido à especificidade de interação entre a Pfd4 e Mlph, denominamos esta região de domínio de ligação para a Pfd4 (Pfd4BD). O Pfd4BD inclui uma pequena região do C-terminal da Mlph predita para ser estruturada em *coiled-coil* (429-468 a.a.), o que também sugere nossos experimentos de CD (**Figura 4.8D**). Mostramos também pela primeira vez que a Mlph, quando em contato com a cauda da miosina específica de melanócitos (MSGTA) ou Pfd4, adquire estrutura em α -hélice e que a afinidade da Mlph pela Pfd4 é cerca de 8 vezes menor do que a afinidade da Mlph pela MSGTA (**Figura 4.17A e B**).

Nosso grupo e outros vêm mostrando que a formação do complexo tripartido entre Rab27a, Mlph e miosina Va é indispensável para o transporte intracelular dos melanossomos (Provance et al., 2002; Hume et al., 2002). Todavia, a estrutura destas proteínas e a interação entre elas não foram estudadas em detalhe. Vale destacar que o volume de informações estruturais e funcionais sobre a Mlph é muito menor quando comparado as disponível para Rab27a e miosina Va. Ademais, o estudo da Mlph é interessante porque para estabelecer uma distribuição eficaz de melanossomos durante a dispersão de pigmentos, a Mlph precisa coordenar a interação com miosina Va e Rab27a. Nesta tese, avançamos na caracterização estrutural da Mlph, onde nossos dados mostram que a Mlph precisa dos seus diversos domínios trabalhando em conjunto para garantir que sua estrutura fique estável e haja o recrutamento da Pfd4 e da MSGTA.

Estudos de interação proteína-proteína, via ensaio de duplo híbrido de levedura (Y2H), mostram que tanto MSGTA como Pfd4 se ligam à Mlph através do C-terminal da Mlph, cuja integridade é fundamental, uma vez que mutações pontuais no C-terminal interrompem a interação entre Mlph e Pfd4 (**Figuras 4.4 e 4.5**). Mutação no resíduo 453 (**Figura 4.4B**) não interrompe a interação entre Mlph e MSGTA tampouco entre Mlph e Pfd4 no experimento de Y2H, mas surpreendentemente, esta mesma mutação reduz significativamente a interação entre Mlph e Pfd4 *in vitro* (**Figuras 4.9 colunas 4 e 6**). Esta discrepância pode ser devida a maior especificidade da interação *in vitro* quando comparada ao ensaio de Y2H. Vale ressaltar que o ensaio de Y2H mostra que a mutação no resíduo A460P interrompe apenas a interação entre Mlph e Pfd4, mantendo a interação entre Mlph e MSGTA (**Figuras 4.4B e 4.5**). Este resultado sugere que MSGTA e Pfd4 não compartilham exatamente o mesmo sítio de interação na Mlph, apesar da evidente sobreposição entre seus sítios de ligação. Estudos de ligação *in vitro* entre Mlph Δ RBDA460P, Pfd4 e MSGTA são necessários para confirmar as especificidades de interação e são objetos de nossa perspectiva para estudo futuro.

Quase todas as atividades biológicas requerem a formação de complexos multiprotéicos. As proteínas precisam portanto enovelar-se em sua estrutura apropriada, formando complexos específicos para realizar suas atividades (Vainberg et al., 1998). Para que estas proteínas sejam capazes de desempenhar sua função celular em um ambiente que favorece agregação e conformações protéicas não funcionais, a assistência de chaperonas é fundamental (Tomoyasu et al., 2001).

Mostramos nesta tese que a interação da Pfd4 com Mlph ocorre no mesmo domínio descrito como local de interação entre miosina Va e Mlph (**Figura 4.4**). Levando em consideração que interação e mudança conformacional são eventos interligados (Fersht, 2000b), sugerimos que miosina Va e Pfd4 exercem o papel de modulador estrutural, enovelando ou estabilizando a estrutura secundária da Mlph. Em outros sistemas, as subunidades da PFD por si só têm papel importante no enovelamento e estabilização de proteínas. A prefoldina 6 (Pfd6) por exemplo, é crucial para a dinâmica e organização dos microtúbulos em *Arabidopsis*, plantas que compartilham a mesma organização microtubular de eucariotos (Gu et al., 2008a). Uma mutação pontual na Pfd6 resulta em falhas na função dos microtúbulos, que provocam a redução do tamanho da planta, desorientação dos planos de divisão celular e alteração na organização e dinâmica dos microtúbulos. Gu et al., (2008) sugerem que Pfd4 e Pfd6 fazem parte do mesmo complexo, e segundo esses autores, o papel dessas subunidades é conservado em plantas e eucariotos (Gu et al., 2008b).

Para a maioria dos eucariotos, as vias de enovelamento continuam a ser um grande mistério, mesmo que diversas chaperonas tenham sido identificadas, incluindo complexos protéicos da família das proteínas de choque-térmico, como Hsp 70, Hsp 90 e a chaperonina CCT. Particularmente, o grande quebra-cabeça vem sendo o papel da CCT, uma proteína que compartilha homologia com as chaperoninas de procariotos GroEl. Muitas proteínas interagem com CCT no meio intracelular, entre elas a $G\alpha$ -transducina, a proteína supressora de tumor von

Hippel-Lindau (VHL) e histona diacetilase 3 (Siegers et al., 2003). Este dado mostra a importância da participação da CCT atuando como chaperona dentro da célula, inclusive regulando a interação entre monômeros de proteínas que fazem parte do citoesqueleto, como actina e tubulina. A CCT interage também com chaperonas Ssb, cujo substratos são proteínas desenoveladas que possuem repetições dos resíduos triptofano e ácido aspártico (WD) no C-terminal (Craig, 2003). Todavia, pouco se sabe como estas proteínas desenoveladas são encaminhadas às chaperoninas CCT, se de maneira direta após síntese no ribossomo ou através de proteínas intermediárias, como as chaperonas Ssb. Vem sendo sugerido que PFD atue como chaperona da actina e tubulina recém sintetizadas. Essas proteínas não apresentam repetições WD em seu C-terminal, logo não se ligam à Ssb tampouco diretamente ao CCT. Postula-se que a PFD atuaria direcionando essas proteínas entre o ribossomo e CCT (Siegers et al., 1999; Hansen et al., 1999a). Siegers et al. (1999) mostraram que células deficientes para PFD e para as chaperonas Ssb se tornam inviáveis. Por outro lado, células deficientes apenas para uma ou outra chaperona individualmente são viáveis, mesmo com seu perfil de crescimento prejudicado (Siegers et al., 1999). Estes dados indicam que pode haver uma alternância de funções entre PFD e Ssb em casos extremos. Vale lembrar que proteínas com repetição WD em seu C-terminal são alvos para a chaperona Ssb e não para as Pfd (Siegers et al., 1999). Analisando a sequência primária da Mlph (**Figura 5.1**), podemos observar que não há domínio WD em seu C-terminal, o que credencia Mlph a recrutar a Pfd4 ao invés de outras chaperonas.

Nossos dados de interação entre Mlph e Pfd4 nos permitem postular que o papel da Pfd4 seria o de recrutar a Mlph em seu estado desenovelado ou parcialmente enovelado. A Pfd4 levaria a Mlph a seu estado nativo, possibilitando tanto a interação da Mlph com miosina Va como o ancoramento da vesícula pigmentada no citoesqueleto de actina, via interação do ABD da Mlph com actina. Como perspectiva, pretendemos investigar se a depleção da Pfd4 e de outras subunidades da PFD em melanócitos poderia prejudicar o transporte de

melanossomos. Estudos em leveduras mostram que a ruptura dos genes que codificam as subunidades da PFD resulta em defeitos na formação do citoesqueleto de actina e tubulina, defeitos estes semelhantes com defeitos causados em leveduras sensíveis a temperatura *knockouts* para chaperonina TCP-1 (CCT) (Martin-Benito et al., 2007). Isso mostra mais uma vez a importância das subunidades de PFD para a viabilidade celular. Embora α -tubulina e β -actina não sejam homólogas, cada uma contém duas importantes regiões para a interação com PFD (Hansen et al., 1999c). PFD acelera o enovelamento de actina pelo menos em 5 vezes e previne a liberação prematura de proteínas não nativas do complexo CCT, como demonstrado por experimentos de marcação de *pulse-chase* seguidos de imunoprecipitação de CCT (Siegers et al., 1999).

Utilizando técnicas de biologia molecular *in vivo* e ensaios bioquímicos *in vitro*, nós demonstramos que Pfd4 interage diretamente com a Mlph. Além disso, mostramos que os diversos domínios da Mlph precisam trabalhar em conjunto, pois apesar do sítio de interação da Pfd4 sobrepor o sítio de interação da miosina Va, na porção central da Mlph, Pfd4 e miosina Va não são capazes de interagir com Mlph na ausência de seu C-terminal (**Figura 4.4**). Todavia, o C-terminal da Mlph sozinho não é suficiente para recrutar miosina Va ou Pfd4 (**Figuras 4.5 e 4.11**). Além da Pfd4, outros parceiros moleculares para a Mlph foram caracterizados recentemente. Sheets et al. (2007) mostraram que AMPc induz a dispersão de melanossomos por atuar em diversos resíduos de fosforilação da Mlph. Mostraram também que a Mlph coordena o movimento anterógrado inicial dos melanossomos, via interação com a dineína, uma proteína até então descrita por atuar apenas na região microtubular. Estes autores propõem que a interação entre dineína e Mlph coordena a transferência do melanossomo para o citoesqueleto de actina. Este foi o primeiro trabalho a descrever a dineína como parceiro molecular da Mlph (Sheets et al., 2007).

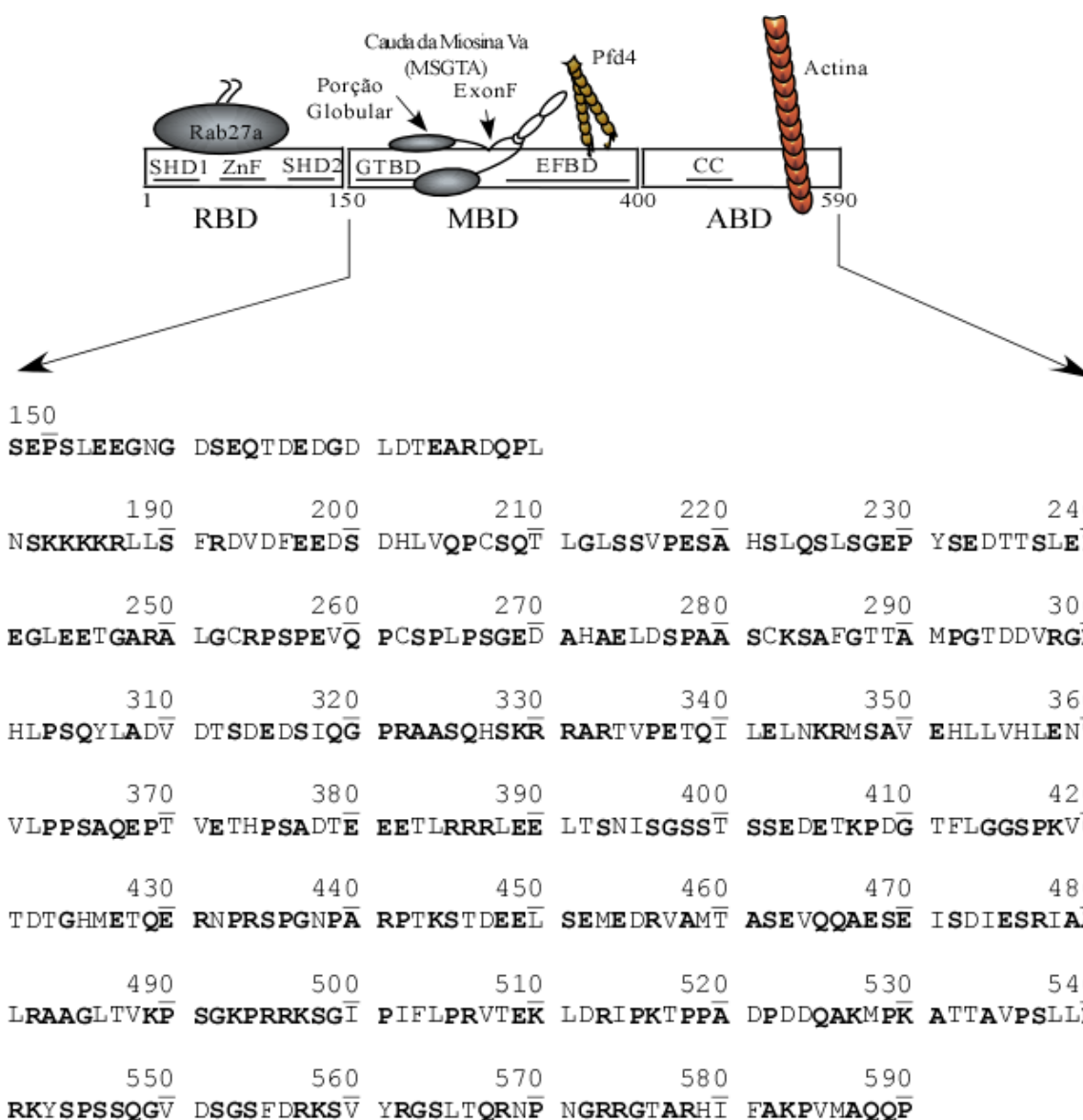


Figura 5.1. Diagrama esquemático da Mlph 1-590 a.a. e a disposição de aminoácidos na sua região central e no seu C-terminal (Mlph Δ RBD). Podemos observar que 62 % (resíduos em negrito) desta região é composta por aminoácidos que promovem a desorganização e induzem a instabilidade de proteínas.

5.2 A interação entre Mlph e MSGTA ou entre Mlph e Pfd4 aumenta o conteúdo de α -hélice da Mlph

Nesta tese, utilizando o construto Mlph Δ RBDA453P, com a substituição pontual de alanina por prolina no resíduo 453 (mutação que rompe a estrutura do C-terminal), obtivemos dados de CD mostrando pela primeira vez *in vitro* que a Mlph Δ RBDA453P é uma proteína desestruturada, com um espectro caracterizado por elipticidade negativa em torno de 205 nm (**Figura 4.14D**). Estes dados estão de acordo com os obtidos por Geething & Spudich (2007) para os domínios de Mlph 147-403 a.a. e 147-240 a.a, ambos sem o C-terminal. Utilizando medidas de ^1H -RMN e CD, eles mostraram que esta região não apresenta nenhuma evidência de possuir estrutura, seja em α -hélice ou folha β (Geething & Spudich, 2007). Todavia, nossos dados apontam que, com o C-terminal intacto e unido à porção central da proteína, como a Mlph 150-590 a.a. por exemplo, a Mlph deixa de ser desestruturada e ganha estrutura em α -hélice (**Figura 4.14D**). O C-terminal da Mlph é descrito como sítio de interação com o citoesqueleto de actina, independente do sítio de ligação para miosina (**Figura 5.2**). Esta região, 401-590 a.a, é denominada de domínio ligador de actina (ABD). A superexpressão de Mlph sem o domínio ABD provoca acúmulo perinuclear de melanossomos em melanócitos, possivelmente por um efeito dominante negativo. Uma mutação no ABD, denominada mutante KA, que consiste de uma substituição de 493KPRRK497 por APAAA, é incapaz de interagir com actina *in vitro*. A superexpressão do mutante KA em melanócitos causa um acúmulo de melanossomos na região perinuclear (Kuroda et al., 2003). Este dado sugere que o domínio ABD precisa estar intacto para manter o melanossomo atracado ao citoesqueleto de actina, assim como para interagir com Pfd4 e MSGTA.

Nosso segundo objetivo foi identificar se há alguma modulação estrutural da Mlph induzida pela interação com a cauda da miosina Va ou a Pfd4. Utilizando construtos com e sem o C-terminal da Mlph (150-590 a.a., 150-400 a.a.), avaliamos a capacidade desses domínios de

se estruturarem quando em contato com a miosina Va ou com a Pfd4. Após 12 h de interação entre Mlph e miosina Va, os construtos de Mlph sem o C-terminal ganham estrutura em α -hélice quando em contato com a cauda da miosina Va (**Figura 4.15**). Como pode ser observado na **Figura 4.16**, o mesmo se aplica para a interação entre Mlph e Pfd4. Estes dados são diferentes dos obtidos por Geething & Spudich (2007), que utilizaram para o ensaio de interação a cauda da miosina Vb, que apresenta apenas o Exon b. Nós utilizamos nesta tese MSGTA, a cauda da miosina Va específica para melanofilina, que apresenta tanto o exon D quanto o exon F. A cauda da miosina Va apresenta processamentos (*splicing*) alternativos em três exons. Os exons B, D e F, são expressos de maneira distintas em diferentes tecidos, oferecendo pelo menos seis isoformas com combinações distintas de exons, que possivelmente têm diferentes funções (Westbroek et al., 2003). Somando os resultados desta tese com os dados da literatura, fica evidente que o exon F presente na MSGTA é fundamental para a indução da mudança e estrutura da Mlph (**Figura 4.15**).

Myo2p é uma proteína análoga à miosina Va em levedura, e dois dos três adaptadores descritos para Myo2p, Vac17p e Mmr1p, foram caracterizados como proteínas intrinsecamente desestruturadas, segundo a predição estrutural através da sua sequência primária (Huang et al., 1998). Na **Figura 5.1**, mostramos que dentre os aminoácidos que compõem os domínios estruturais da região central e do C-terminal da Mlph, mais de 60% estão relacionados a regiões de desestruturação ou instabilidade de proteínas (Ala, Arg, Gly, Gln, Ser, Pro, Glu e Lys) (**Figura 5.1**). Somando os dados de Huang et al. (1998) e nossos dados, postulamos que a instabilidade ou desestruturação pode ser característica comum aos parceiros moleculares da miosina Va.

Nossos dados indicam que a Mlph é intrinsecamente desordenada ou parcialmente enovelada, assim como diversas outras proteínas dentro da célula, embora ainda haja divergência sobre o que significa “desestruturado”. Observações de RMN heteronuclear em

proteínas intrinsecamente desordenadas mostram a maioria com uma estrutura secundária transitória (Geething & Spudich, 2007). Por exemplo, pKID (cinesinas fosforiladas indutoras do domínio de ativação do fator de transcrição CREB) forma um conjunto de complexos transitórios ao se ligar ao domínio KIX do CREB. O pKID deixa o estado transitório e se torna estável após interações intermoleculares no seu sítio de ligação na KIX (Sugase et al., 2007). Outro exemplo de proteínas intrinsecamente desestruturadas ou parcialmente estruturadas é a p27, que regula cinases dependentes de ciclina. Esta proteína é parcialmente desestruturada em solução, mas contém algumas regiões estruturadas em hélices transitórias que são posteriormente estabilizadas pela ligação da Cdk2-ciclina A (Lacy et al., 2004).

As extremidades hidrofóbicas da PFD interagem com actina desenovelada. Uma vez ligada à PFD, actina parece adotar conformação similar à encontrada quando está ligada à CCT (Martin-Benito et al., 2002). Os resíduos hidrofóbicos característicos das proteínas parcialmente desenoveladas, como os encontrados na região central da Mlph, favorecem o recrutamento de subunidades também ricas em resíduos hidrofóbicos como os encontrados no N-terminal da Pfd4 e em outras subunidades protéicas da PFD. Vale lembrar que a MyRIP, proteína que divide grande homologia com Mlph, não interage com Pfd4, mostrando mais uma vez a especificidade da Mlph pela Pfd4 (**Figura. 4.10**).

A interação orquestrada entre proteínas, que exige uma constante associação, reorganização e dissociação de uma série de complexos protéicos, é uma característica importante do transporte intracelular. Portanto, não é surpresa que as chaperonas emergjam como importantes atores no transporte de melanossomos. Nosso estudo traz novas informações sobre o mecanismo pelo qual a Mlph, uma proteína parcialmente desestruturada, se enovela quando ligada aos seus parceiros moleculares. Baseado em nossos dados de interação entre Mlph e Pfd4 *in vivo* e *in vitro*, somado aos nossos dados de CD que mostram que Mlph necessita dos seus múltiplos domínios para se manter estruturada e que há um aumento no

conteúdo de estrutura secundária após a ligação da MSGTA ou da Pfd4 à Mlph, nós propomos um modelo de recrutamento da Mlph. A Mlph se liga à Pfd4 com baixa afinidade ($K_d \sim 4,0 \mu\text{M}$) para atingir uma estrutura mais estável, para posteriormente, e com alta afinidade ($K_d \sim 0,5 \mu\text{M}$) recrutar miosina Va (**Figura 4.17A e B**). Quando a Mlph atinge sua estrutura nativa, libera Pfd4 e se liga ao citoesqueleto de actina via seu ABD (**Figura 5.2**).

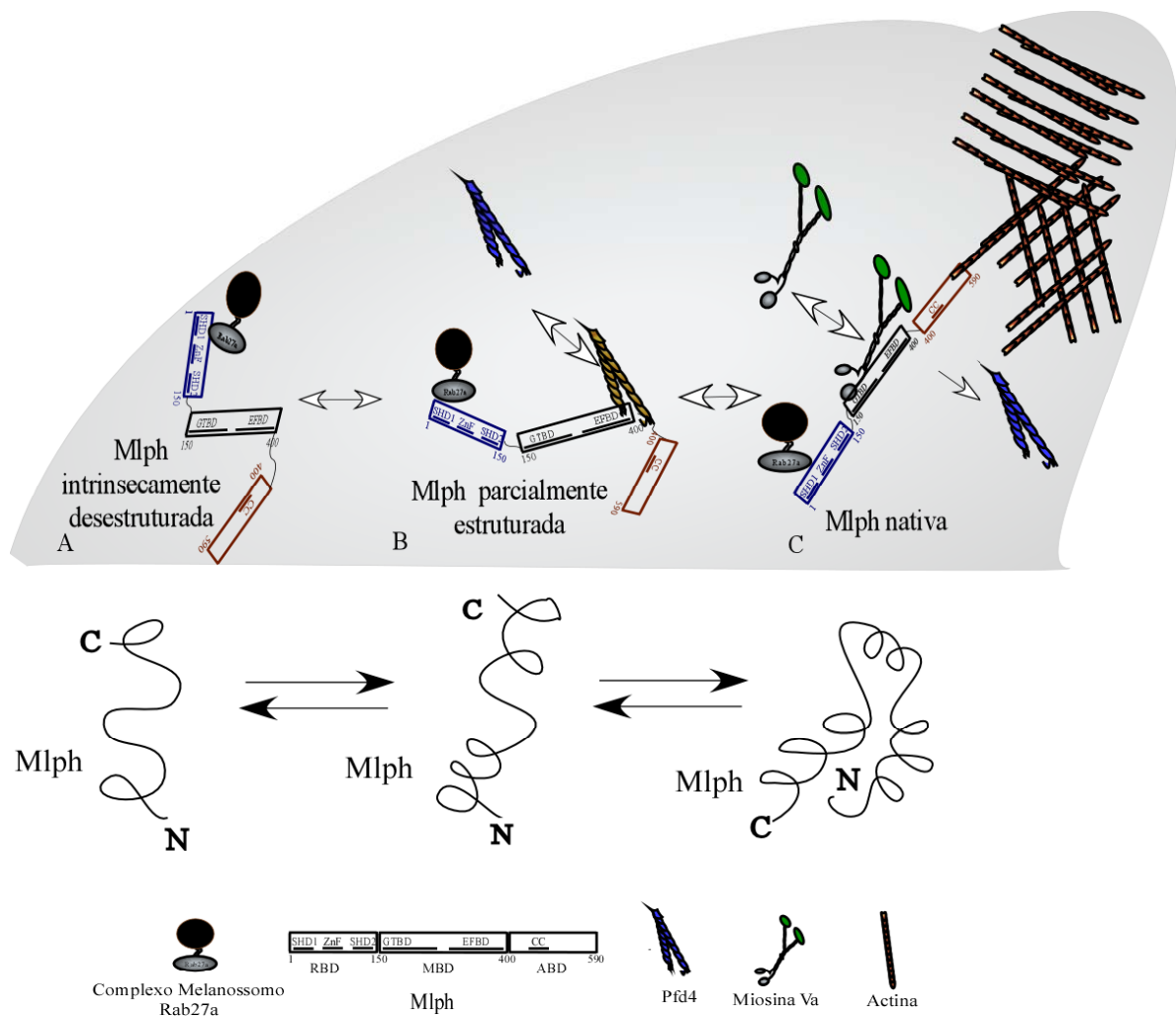


Figura 5.2. Papel da Pfd4 e do C-terminal da Mlph no transporte de melanossomos. (A) Mlph em seu estado intrinsecamente desestruturada (B) se associa à Pfd4 com baixa afinidade, mas com alta especificidade, para depois, parcialmente estruturada (C), se ligar à miosina Va, a qual levaria a Mlph ao completo enovelamento, ideal para manter o complexo tripartido ancorado ao córtex de actina via ABD da Mlph.

Outro estudo que já está em andamento é a caracterização estrutural da Mlph em baixa resolução (SAXS) e a caracterização estrutural da Mlph por difração de raios-X. Neste último, conseguimos os cristais para a Mlph Δ RBD, Mlph 150-400 a.a. e Mlph 300-590 a.a.

Em suma, nesta tese nós identificamos e mapeamos pela primeira vez a interação de Pfd4 com Mlph. PFD e suas subunidades isoladas vêm sendo identificadas como importantes chaperonas para o enovelamento de proteínas do citoesqueleto de eucarioto, como tubulina e actina (Vainberg et al., 1998; Siegers et al., 1999), e agora para a Mlph. Nossos dados mostram que a miosina Va e Pfd4 atuam como moduladores conformacionais da Mlph, possibilitando que a Mlph atue como ponte fiel entre substratos protéicos específicos para o transporte intracelular. O mesmo papel tem sido observado no caso de chaperonas entre os complexos SNAP/NSF, auxilina/Hsc70, e CSP/Hsc70, em outros modelos celulares (Zinsmaier & Bronk, 2001).

Em alguns casos, sabe-se que a ação de chaperonas moleculares e parceiros moleculares são necessárias para que o enovelamento ocorra de forma correta. A Pfd4 poderia ser a proteína “auxiliar” que previne a degradação e agregação da Mlph. Muitas vezes a agregação é favorecida pela temperatura e pelas condições iônicas dentro da célula. A Pfd4 parece reconhecer conformações desenoveladas ou parcialmente enoveladas da Mlph, e atua durante o processo de enovelamento da Mlph, dirigindo esta proteína para o enovelamento correto. A importância das chaperonas moleculares pode ser percebida no caso de doenças relacionadas ao enovelamento incorreto de proteínas. Estudos com proteínas envolvidas em doenças amiloidogênicas, por exemplo, têm mostrado que algumas chaperonas são capazes de inibir a agregação destas proteínas e também a morte celular decorrente das patologias (Carmichael et al., 2000). A Mlph pode estar sendo enovelada por Pfd4 antes de se ligar à miosina Va e dar início ao transporte e posterior ancoramento dos melanossomos na periferia da célula. A interação entre Mlph e Pfd4 poderia ter uma razão fisiológica, seja auxiliando na liberação do

melanossomo no momento apropriado, coordenando sua localização ou regulando a formação do complexo tripartido entre Mlph, Rab27a e miosina Va para o seu transporte entre o microtúbulo e a membrana celular. Em qualquer um destes casos há participação da Mlph, e devido à sua alta instabilidade e desestruturação, estes processos podem ser regulados via participação de chaperonas como PFD.

5.3 Perspectivas para a caracterização do papel da Pfd4 *in vitro* e *in vivo*

Chaperonas moleculares são críticas para diversas vias de sinalização dentro da célula. O rápido e fidedigno recrutamento do melanossomo para seu transporte à periferia celular é dependente da constante utilização da Mlph e para isso é fundamental que a Mlph se mantenha estável para ser reutilizada e continue seletiva aos seus parceiros moleculares durante o transporte vesicular. O grande número de interações proteína-proteína necessário para o tráfego intracelular aparentemente envolve passos sequenciais e diversos estados de transição. Como perspectiva, iremos testar se a presença de Pfd4 protegeria contra a degradação da Mlph. Se a proteção for confirmada, reforçaria a idéia de proteção e estabilização da Mlph induzidas pela Pfd4.

Fukuda e Itoh (2004) demonstraram que a Mlph contém diversos motivos PEST (prolina, ácido glutâmico, serina, treonina) na sua região central. Esses domínios PEST são altamente sensíveis a proteólise e comumente são encontrados em regiões desestruturadas (Wright & Dyson, 1999). A presença dos resíduos PEST pode auxiliar na rápida liberação do melanossomo para o queratinócito, onde seria conveniente uma rápida degradação da Mlph para desfazer o complexo com Rab27a e miosina Va (Fukuda & Itoh, 2004).

Este trabalho levanta diversas questões que ainda precisam ser respondidas no futuro. A Pfd4 realmente coordena a especificidade da ligação entre Mlph e seus parceiros moleculares durante o transporte de melanossomos dentro dos melanócitos? O que evitaria a ligação

inespecífica da Mlph a outras proteínas celulares? Para responder estas perguntas iremos testar se a especificidade da Mlph em recrutar Rab27a, miosina e actina aumenta na presença de Pfd4.

Estudos *in vivo* e *in vitro* serão necessários para dissecar mais em detalhes o mecanismo pelo qual Pfd4 regula a dispersão, ancoramento ou fusão do melanossomo na periferia celular, abrindo um novo caminho para entendermos o transporte de vesículas e organelas, seja em melanócitos ou em outros modelos celulares.

Capítulo 6 - Referências

1. Anfinsen, C.B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science*. 181, 223-230.
2. Aspengren, S., Hedberg, D., Skold, H.N., & Wallin, M. (2009). New insights into melanosome transport in vertebrate pigment cells. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 272, 245-302.
3. Barral, D.C., Ramalho, J.S., Anders, R., Hume, A.N., Knapton, H.J., Tolmachova, T., Collinson, L.M., Goulding, D., Authi, K.S., & Seabra, M.C. (2002). Functional redundancy of Rab27 proteins and the pathogenesis of Griscelli syndrome. *J Clin. Invest.* 110, 247-257.
4. Barral, D.C. & Seabra, M.C. (2004). The melanosome as a model to study organelle motility in mammals. *Pigment Cell Res.* 17, 111-118.
5. Berg, J.S., Powell, B.C., & Cheney, R.E. (2001). A millennial myosin census. *Mol Biol Cell.* 12, 780-794.
6. Bharti, K., Nguyen, M.T., Skuntz, S., Bertuzzi, S., & Arnheiter, H. (2006). The other pigment cell: specification and development of the pigmented epithelium of the vertebrate eye. *Pigment Cell Res.* 19, 380-394.
7. Bizario, J.C., Feldmann, J., Castro, F.A., Menasche, G., Jacob, C.M., Cristofani, L., Casella, E.B., Voltarelli, J.C., de Saint-Basile, G., & Espreafico, E.M. (2004). Griscelli syndrome: characterization of a new mutation and rescue of T-cytotoxic activity by retroviral transfer of RAB27A gene. *J Clin. Immunol.* 24, 397-410.
8. Carmichael, J., Chatellier, J., Woolfson, A., Milstein, C., Fersht, A.R., & Rubinsztein, D.C. (2000). Bacterial and yeast chaperones reduce both aggregate formation and cell death in mammalian cell models of Huntington's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 9701-9705.
9. Chang, K.W., Yang, P.Y., Lai, H.Y., Yeh, T.S., Chen, T.C., & Yeh, C.T. (2006). Identification of a novel actin isoform in hepatocellular carcinoma. *Hepatol. Res.* 36, 33-39.
10. Chen, Y.J. & Inouye, M. (2008). The intramolecular chaperone-mediated protein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18, 765-770.
11. Chin, J., Langst, G., Becker, P.B., & Widom, J. (2004). Fluorescence anisotropy assays for analysis of ISWI-DNA and ISWI-nucleosome interactions. *Methods Enzymol.* 376, 3-16.
12. Craig, E.A. (2003). Eukaryotic chaperonins: lubricating the folding of WD-repeat proteins. *Curr. Biol.* 13, R904-R905.

13. De La Cruz, E.M. & Ostap, E.M. (2009). Kinetic and equilibrium analysis of the myosin ATPase. *Methods Enzymol.* 455, 157-192.
14. Desnos, C., Huet, S., & Darchen, F. (2007). 'Should I stay or should I go?': myosin V function in organelle trafficking. *Biol. Cell.* 99, 411-423.
15. Desnos, C., Schonn, J.S., Huet, S., Tran, V.S., El-Amraoui, A., Raposo, G., Fanget, I., Chapuis, C., Menasche, G., de Saint, B.G., Petit, C., Cribier, S., Henry, J.P., & Darchen, F. (2003a). Rab27A and its effector MyRIP link secretory granules to F-actin and control their motion towards release sites. *J. Cell Biol.* 163, 559-570.
16. Desnos, C., Schonn, J.S., Huet, S., Tran, V.S., El-Amraoui, A., Raposo, G., Fanget, I., Chapuis, C., Menasche, G., de Saint, B.G., Petit, C., Cribier, S., Henry, J.P., & Darchen, F. (2003b). Rab27A and its effector MyRIP link secretory granules to F-actin and control their motion towards release sites. *J. Cell Biol.* 163, 559-570.
17. Desnos, C., Schonn, J.S., Huet, S., Tran, V.S., El-Amraoui, A., Raposo, G., Fanget, I., Chapuis, C., Menasche, G., de Saint, B.G., Petit, C., Cribier, S., Henry, J.P., & Darchen, F. (2003c). Rab27A and its effector MyRIP link secretory granules to F-actin and control their motion towards release sites. *J. Cell Biol.* 163, 559-570.
18. Desnos, C., Schonn, J.S., Huet, S., Tran, V.S., El-Amraoui, A., Raposo, G., Fanget, I., Chapuis, C., Menasche, G., de Saint, B.G., Petit, C., Cribier, S., Henry, J.P., & Darchen, F. (2003d). Rab27A and its effector MyRIP link secretory granules to F-actin and control their motion towards release sites. *J. Cell Biol.* 163, 559-570.
19. Desnos, C., Schonn, J.S., Huet, S., Tran, V.S., El-Amraoui, A., Raposo, G., Fanget, I., Chapuis, C., Menasche, G., de Saint, B.G., Petit, C., Cribier, S., Henry, J.P., & Darchen, F. (2003e). Rab27A and its effector MyRIP link secretory granules to F-actin and control their motion towards release sites. *J. Cell Biol.* 163, 559-570.
20. Dobson, C.M. & Karplus, M. (1999). The fundamentals of protein folding: bringing together theory and experiment. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9, 92-101.
21. Dulubova, I., Lou, X., Lu, J., Huryeva, I., Alam, A., Schneggenburger, R., Sudhof, T.C., & Rizo, J. (2005). A Munc13/RIM/Rab3 tripartite complex: from priming to plasticity? *EMBO J.* 24, 2839-2850.
22. Dunker, A.K., Oldfield, C.J., Meng, J., Romero, P., Yang, J.Y., Chen, J.W., Vacic, V., Obradovic, Z., & Uversky, V.N. (2008a). The unfoldomics decade: an update on intrinsically disordered proteins. *BMC. Genomics.* 9 Suppl 2, S1-
23. Dunker, A.K., Oldfield, C.J., Meng, J., Romero, P., Yang, J.Y., Chen, J.W., Vacic, V., Obradovic, Z., & Uversky, V.N. (2008b). The unfoldomics decade: an update on intrinsically disordered proteins. *BMC. Genomics.* 9 Suppl 2, S1-
24. Echard, A., Jollivet, F., Martinez, O., Lacapere, J.J., Rousselet, A., Janoueix-Lerosey, I., & Goud, B. (1998). Interaction of a Golgi-associated kinesin-like protein with Rab6. *Science.* 279, 580-585.
25. Euteneuer, U. & McIntosh, J.R. (1981). Polarity of some motility-related microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 372-376.

26. Fersht, A.R. (2000a). A kinetically significant intermediate in the folding of barnase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 14121-14126.
27. Fersht, A.R. (2000b). Transition-state structure as a unifying basis in protein-folding mechanisms: contact order, chain topology, stability, and the extended nucleus mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 1525-1529.
28. Fields, S. & Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature.* 340, 245-246.
29. Fukuda, M. (2002). Synaptotagmin-like protein (Slp) homology domain 1 of Slac2-a/melanophilin is a critical determinant of GTP-dependent specific binding to Rab27A. *J. Biol. Chem.* 277, 40118-40124.
30. Fukuda, M. (2003). Distinct Rab binding specificity of Rim1, Rim2, rabphilin, and Noc2. Identification of a critical determinant of Rab3A/Rab27A recognition by Rim2. *J. Biol. Chem.* 278, 15373-15380.
31. Fukuda, M. (2005). Versatile role of Rab27 in membrane trafficking: focus on the Rab27 effector families. *J. Biochem.* 137, 9-16.
32. Fukuda, M. & Itoh, T. (2004). Slac2-a/melanophilin contains multiple PEST-like sequences that are highly sensitive to proteolysis. *J. Biol. Chem.* 279, 22314-22321.
33. Fukuda, M., Kanno, E., & Yamamoto, A. (2004). Rabphilin and Noc2 are recruited to dense-core vesicles through specific interaction with Rab27A in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 279, 13065-13075.
34. Fukuda, M. & Kuroda, T.S. (2002). Slac2-c (synaptotagmin-like protein homologue lacking C2 domains-c), a novel linker protein that interacts with Rab27, myosin Va/VIIa, and actin. *J. Biol. Chem.* 277, 43096-43103.
35. Fukuda, M. & Kuroda, T.S. (2004). Missense mutations in the globular tail of myosin-Va in dilute mice partially impair binding of Slac2-a/melanophilin. *J. Cell Sci.* 117, 583-591.
36. Fukuda, M., Kuroda, T.S., & Mikoshiba, K. (2002). Slac2-a/melanophilin, the missing link between Rab27 and myosin Va: implications of a tripartite protein complex for melanosome transport. *J. Biol. Chem.* 277, 12432-12436.
37. Fukuda, M. & Mikoshiba, K. (2001). Synaptotagmin-like protein 1-3: a novel family of C-terminal-type tandem C2 proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281, 1226-1233.
38. Fukuda, M., Saegusa, C., Kanno, E., & Mikoshiba, K. (2001). The C2A domain of double C2 protein gamma contains a functional nuclear localization signal. *J. Biol. Chem.* 276, 24441-24444.
39. Futter, C.E., Ramalho, J.S., Jaissle, G.B., Seeliger, M.W., & Seabra, M.C. (2004). The role of Rab27a in the regulation of melanosome distribution within retinal pigment epithelial cells. *Mol. Biol. Cell.* 15, 2264-2275.

40. Geething, N.C. & Spudich, J.A. (2007). Identification of a minimal myosin Va binding site within an intrinsically unstructured domain of melanophilin. *J. Biol. Chem.* 282, 21518-21528.
41. Goding, C.R. (2007). Melanocytes: the new Black. *Int. J Biochem. Cell Biol.* 39, 275-279.
42. Gross, S.P., Tuma, M.C., Deacon, S.W., Serpinskaya, A.S., Reilein, A.R., & Gelfand, V.I. (2002). Interactions and regulation of molecular motors in *Xenopus melanophores*. *J Cell Biol.* 156, 855-865.
43. Gu, Y., Deng, Z., Paredez, A.R., DeBolt, S., Wang, Z.Y., & Somerville, C. (2008b). Prefoldin 6 is required for normal microtubule dynamics and organization in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 18064-18069.
44. Gu, Y., Deng, Z., Paredez, A.R., DeBolt, S., Wang, Z.Y., & Somerville, C. (2008a). Prefoldin 6 is required for normal microtubule dynamics and organization in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 18064-18069.
45. Hansen, W.J., Cowan, N.J., & Welch, W.J. (1999a). Prefoldin-nascent chain complexes in the folding of cytoskeletal proteins. *J. Cell Biol.* 145, 265-277.
46. Hansen, W.J., Cowan, N.J., & Welch, W.J. (1999b). Prefoldin-nascent chain complexes in the folding of cytoskeletal proteins. *J. Cell Biol.* 145, 265-277.
47. Hansen, W.J., Cowan, N.J., & Welch, W.J. (1999c). Prefoldin-nascent chain complexes in the folding of cytoskeletal proteins. *J. Cell Biol.* 145, 265-277.
48. Hara, M., Yaar, M., Byers, H.R., Goukassian, D., Fine, R.E., Gonsalves, J., & Gilchrist, B.A. (2000). Kinesin participates in melanosomal movement along melanocyte dendrites. *J Invest Dermatol.* 114, 438-443.
49. Hartl, F.U. & Hayer-Hartl, M. (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science.* 295, 1852-1858.
50. Hearing, V.J. (2005). Biogenesis of pigment granules: a sensitive way to regulate melanocyte function. *J. Dermatol. Sci.* 37, 3-14.
51. Hodge, T. & Cope, M.J. (2000). A myosin family tree. *J. Cell Sci.* 113 Pt 19, 3353-3354.
52. Huang, J.D., Mermall, V., Strobel, M.C., Russell, L.B., Mooseker, M.S., Copeland, N.G., & Jenkins, N.A. (1998). Molecular genetic dissection of mouse unconventional myosin-VA: tail region mutations. *Genetics.* 148, 1963-1972.
53. Hume, A.N., Collinson, L.M., Hopkins, C.R., Strom, M., Barral, D.C., Bossi, G., Griffiths, G.M., & Seabra, M.C. (2002). The leaden gene product is required with Rab27a to recruit myosin Va to melanosomes in melanocytes. *Traffic.* 3, 193-202.
54. Hume, A.N., Tarafder, A.K., Ramalho, J.S., Sviderskaya, E.V., & Seabra, M.C. (2006). A coiled-coil domain of melanophilin is essential for Myosin Va recruitment and melanosome transport in melanocytes. *Mol. Biol. Cell.* 17, 4720-4735.

55. Hume, A.N., Ushakov, D.S., Tarafder, A.K., Ferenczi, M.A., & Seabra, M.C. (2007). Rab27a and MyoVa are the primary Mlph interactors regulating melanosome transport in melanocytes. *J. Cell Sci.* 120, 3111-3122.
56. Kukimoto-Niino, M., Sakamoto, A., Kanno, E., Hanawa-Suetsugu, K., Terada, T., Shirouzu, M., Fukuda, M., & Yokoyama, S. (2008). Structural basis for the exclusive specificity of Slac2-a/melanophilin for the Rab27 GTPases. *Structure.* 16, 1478-1490.
57. Kuroda, T.S., Ariga, H., & Fukuda, M. (2003). The actin-binding domain of Slac2-a/melanophilin is required for melanosome distribution in melanocytes. *Mol. Cell Biol.* 23, 5245-5255.
58. Kuroda, T.S. & Fukuda, M. (2004). Rab27A-binding protein Slp2-a is required for peripheral melanosome distribution and elongated cell shape in melanocytes. *Nat. Cell Biol.* 6, 1195-1203.
59. Lacy, E.R., Filippov, I., Lewis, W.S., Otieno, S., Xiao, L., Weiss, S., Hengst, L., & Kriwacki, R.W. (2004). p27 binds cyclin-CDK complexes through a sequential mechanism involving binding-induced protein folding. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 358-364.
60. Langford, G.M. (2002). Myosin-V, a versatile motor for short-range vesicle transport. *Traffic.* 3, 859-865.
61. Lewis, T.L., Jr., Mao, T., Svoboda, K., & Arnold, D.B. (2009). Myosin-dependent targeting of transmembrane proteins to neuronal dendrites. *Nat. Neurosci.* 12, 568-576.
62. Li, X., Romero, P., Rani, M., Dunker, A.K., & Obradovic, Z. (1999). Predicting Protein Disorder for N-, C-, and Internal Regions. *Genome Inform. Ser. Workshop Genome Inform.* 10, 30-40.
63. Lopes, V.S., Ramalho, J.S., Owen, D.M., Karl, M.O., Strauss, O., Futter, C.E., & Seabra, M.C. (2007). The ternary Rab27a-Myrip-Myosin VIIa complex regulates melanosome motility in the retinal pigment epithelium. *Traffic.* 8, 486-499.
64. Malik, F. & Vale, R. (1990). Cell biology. A new direction for kinesin. *Nature.* 347, 713-714.
65. Martin-Benito, J., Boskovic, J., Gomez-Puertas, P., Carrascosa, J.L., Simons, C.T., Lewis, S.A., Bartolini, F., Cowan, N.J., & Valpuesta, J.M. (2002). Structure of eukaryotic prefoldin and of its complexes with unfolded actin and the cytosolic chaperonin CCT. *EMBO J.* 21, 6377-6386.
66. Martin-Benito, J., Gomez-Reino, J., Stirling, P.C., Lundin, V.F., Gomez-Puertas, P., Boskovic, J., Chacon, P., Fernandez, J.J., Berenguer, J., Leroux, M.R., & Valpuesta, J.M. (2007). Divergent substrate-binding mechanisms reveal an evolutionary specialization of eukaryotic prefoldin compared to its archaeal counterpart. *Structure.* 15, 101-110.
67. Marx, A., Hoenger, A., & Mandelkow, E. (2009). Structures of kinesin motor proteins. *Cell Motil. Cytoskeleton.*

68. Matesic, L.E., Yip, R., Reuss, A.E., Swing, D.A., O'Sullivan, T.N., Fletcher, C.F., Copeland, N.G., & Jenkins, N.A. (2001). Mutations in *Mlph*, encoding a member of the Rab effector family, cause the melanosome transport defects observed in leaden mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 10238-10243.
69. Maxfield, F.R. & McGraw, T.E. (2004). Endocytic recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 121-132.
70. Menasche, G., Fischer, A., & de Saint, B.G. (2002). Griscelli syndrome types 1 and 2. *Am. J Hum. Genet.* 71, 1237-1238.
71. Menasche, G., Ho, C.H., Sanal, O., Feldmann, J., Tezcan, I., Ersoy, F., Houdusse, A., Fischer, A., & de Saint, B.G. (2003). Griscelli syndrome restricted to hypopigmentation results from a melanophilin defect (GS3) or a *MYO5A* F-exon deletion (GS1). *J. Clin. Invest.* 112, 450-456.
72. Menasche, G., Pastural, E., Feldmann, J., Certain, S., Ersoy, F., Dupuis, S., Wulffraat, N., Bianchi, D., Fischer, A., Le, D.F., & de Saint, B.G. (2000). Mutations in *RAB27A* cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome. *Nat Genet.* 25, 173-176.
73. Mermall, V., Post, P.L., & Mooseker, M.S. (1998). Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. *Science.* 279, 527-533.
74. Morris, R.L. & Hollenbeck, P.J. (1995). Axonal transport of mitochondria along microtubules and F-actin in living vertebrate neurons. *J. Cell Biol.* 131, 1315-1326.
75. Munch, C., Sedlmeier, R., Meyer, T., Homberg, V., Sperfeld, A.D., Kurt, A., Prudlo, J., Peraus, G., Hanemann, C.O., Stumm, G., & Ludolph, A.C. (2004). Point mutations of the p150 subunit of dynactin (*DCTN1*) gene in ALS. *Neurology.* 63, 724-726.
76. Nagashima, K., Torii, S., Yi, Z., Igarashi, M., Okamoto, K., Takeuchi, T., & Izumi, T. (2002). Melanophilin directly links *Rab27a* and myosin Va through its distinct coiled-coil regions. *FEBS Lett.* 517, 233-238.
77. Nascimento, A.A., Roland, J.T., & Gelfand, V.I. (2003). Pigment cells: a model for the study of organelle transport. *Annu. Rev Cell Dev. Biol.* 19, 469-491.
78. Nelson, R.J., Ziegelhoffer, T., Nicolet, C., Werner-Washburne, M., & Craig, E.A. (1992). The translation machinery and 70 kd heat shock protein cooperate in protein synthesis. *Cell.* 71, 97-105.
79. Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P.B., & Steitz, T.A. (2000a). The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science.* 289, 920-930.
80. Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P.B., & Steitz, T.A. (2000b). The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science.* 289, 920-930.
81. O'Sullivan, T.N., Wu, X.S., Rachel, R.A., Huang, J.D., Swing, D.A., Matesic, L.E., Hammer, J.A., III, Copeland, N.G., & Jenkins, N.A. (2004). *dsu* functions in a *MYO5A*-independent pathway to suppress the coat color of dilute mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 16831-16836.

82. Olkkonen, V.M. & Ikonen, E. (2006). When intracellular logistics fails--genetic defects in membrane trafficking. *J. Cell Sci.* 119, 5031-5045.
83. Ostermeier, C. & Brunger, A.T. (1999). Structural basis of Rab effector specificity: crystal structure of the small G protein Rab3A complexed with the effector domain of rabphilin-3A. *Cell.* 96, 363-374.
84. Potter, R.L. & Hadley, M.E. (1970). Comparative effects of sulfhydryl inhibitors on melanosome movements within vertebrate melanophores. *Experientia.* 26, 536-538.
85. Prilusky, J., Felder, C.E., Zeev-Ben-Mordehai, T., Rydberg, E.H., Man, O., Beckmann, J.S., Silman, I., & Sussman, J.L. (2005). FoldIndex: a simple tool to predict whether a given protein sequence is intrinsically unfolded. *Bioinformatics.* 21, 3435-3438.
86. Provance, D.W., James, T.L., & Mercer, J.A. (2002). Melanophilin, the product of the leaden locus, is required for targeting of myosin-Va to melanosomes. *Traffic.* 3, 124-132.
87. Provance, D.W., Jr., Wei, M., Ipe, V., & Mercer, J.A. (1996). Cultured melanocytes from dilute mutant mice exhibit dendritic morphology and altered melanosome distribution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 14554-14558.
88. Ptitsyn, O.B. (1995). How the molten globule became. *Trends Biochem. Sci.* 20, 376-379.
89. Ptitsyn, O.B., Finkel'shtein, A.V., & Dobson, C.M. (1999). [Self-organization of protein structures--a bridge between physics and biology]. *Mol. Biol. (Mosk).* 33, 1012-1015.
90. Ramalho, J.S., Lopes, V.S., Tarafder, A.K., Seabra, M.C., & Hume, A.N. (2009). MYRIP USES DISTINCT DOMAINS IN THE CELLULAR ACTIVATION OF MYOSIN VA AND MYOSIN VIIA IN MELANOSOME TRANSPORT. *Pigment Cell Melanoma Res.*
91. Roghi, C. & Allan, V.J. (1999). Dynamic association of cytoplasmic dynein heavy chain 1a with the Golgi apparatus and intermediate compartment. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 24), 4673-4685.
92. Romero, P., Obradovic, Z., Li, X., Garner, E.C., Brown, C.J., & Dunker, A.K. (2001). Sequence complexity of disordered protein. *Proteins.* 42, 38-48.
93. Schliwa, M. (1984a). Mechanisms of intracellular organelle transport. *Cell Muscle Motil.* 5, 1-6.
94. Schliwa, M. (1984b). Mechanisms of intracellular organelle transport. *Cell Muscle Motil.* 5, 1-6.
95. Seabra, M.C., Mules, E.H., & Hume, A.N. (2002). Rab GTPases, intracellular traffic and disease. *Trends Mol Med.* 8, 23-30.
96. Seiberg, M. (2001). Keratinocyte-melanocyte interactions during melanosome transfer. *Pigment Cell Res.* 14, 236-242.

97. Sellers, J.R. & Knight, P.J. (2007). Folding and regulation in myosins II and V. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 28, 363-370.
98. Sheets, L., Ransom, D.G., Mellgren, E.M., Johnson, S.L., & Schnapp, B.J. (2007). Zebrafish melanophilin facilitates melanosome dispersion by regulating dynein. *Curr. Biol.* 17, 1721-1734.
99. Siegers, K., Bolter, B., Schwarz, J.P., Bottcher, U.M., Guha, S., & Hartl, F.U. (2003). TRiC/CCT cooperates with different upstream chaperones in the folding of distinct protein classes. *EMBO J.* 22, 5230-5240.
100. Siegers, K., Waldmann, T., Leroux, M.R., Grein, K., Shevchenko, A., Schiebel, E., & Hartl, F.U. (1999). Compartmentation of protein folding in vivo: sequestration of non-native polypeptide by the chaperonin-GimC system. *EMBO J.* 18, 75-84.
101. Siegert, R., Leroux, M.R., Scheufler, C., Hartl, F.U., & Moarefi, I. (2000). Structure of the molecular chaperone prefoldin: unique interaction of multiple coiled coil tentacles with unfolded proteins. *Cell.* 103, 621-632.
102. Steingrimsson, E., Copeland, N.G., & Jenkins, N.A. (2004). Melanocytes and the microphthalmia transcription factor network. *Annu. Rev. Genet.* 38, 365-411.
103. Strom, M., Hume, A.N., Tarafder, A.K., Barkagianni, E., & Seabra, M.C. (2002). A family of Rab27-binding proteins. Melanophilin links Rab27a and myosin Va function in melanosome transport. *J. Biol. Chem.* 277, 25423-25430.
104. Sugase, K., Dyson, H.J., & Wright, P.E. (2007). Mechanism of coupled folding and binding of an intrinsically disordered protein. *Nature.* 447, 1021-1025.
105. Takeda, K., Takahashi, N.H., & Shibahara, S. (2007). Neuroendocrine functions of melanocytes: beyond the skin-deep melanin maker. *Tohoku J Exp Med.* 211, 201-221.
106. Tolmachova, T., Anders, R., Stinchcombe, J., Bossi, G., Griffiths, G.M., Huxley, C., & Seabra, M.C. (2004). A general role for Rab27a in secretory cells. *Mol Biol Cell.* 15, 332-344.
107. Tomoyasu, T., Mogk, A., Langen, H., Goloubinoff, P., & Bukau, B. (2001). Genetic dissection of the roles of chaperones and proteases in protein folding and degradation in the Escherichia coli cytosol. *Mol Microbiol.* 40, 397-413.
108. Tsai, C.J., Kumar, S., Ma, B., & Nussinov, R. (1999). Folding funnels, binding funnels, and protein function. *Protein Sci.* 8, 1181-1190.
109. Uversky, V.N. (2002). What does it mean to be natively unfolded? *Eur. J. Biochem.* 269, 2-12.
110. Uversky, V.N. & Fink, A.L. (2002). The chicken-egg scenario of protein folding revisited. *FEBS Lett.* 515, 79-83.
111. Vainberg, I.E., Lewis, S.A., Rommelaere, H., Ampe, C., Vandekerckhove, J., Klein, H.L., & Cowan, N.J. (1998). Prefoldin, a chaperone that delivers unfolded proteins to cytosolic chaperonin. *Cell.* 93, 863-873.

112. Van Gele, M., Dynoodt, P., & Lambert, J. (2009). Griscelli syndrome: a model system to study vesicular trafficking. *Pigment Cell Melanoma Res.*
113. van, C.W. & Beyaert, R. (1999). Yeast Two-Hybrid: State of the Art. *Biol Proced. Online.* 2, 1-38.
114. Vance, K.W. & Goding, C.R. (2004). The transcription network regulating melanocyte development and melanoma. *Pigment Cell Res.* 17, 318-325.
115. Waselle, L., Coppola, T., Fukuda, M., Iezzi, M., El-Amraoui, A., Petit, C., & Regazzi, R. (2003). Involvement of the Rab27 binding protein Slac2c/MyRIP in insulin exocytosis. *Mol. Biol. Cell.* 14, 4103-4113.
116. Wasmeier, C., Hume, A.N., Bolasco, G., & Seabra, M.C. (2008). Melanosomes at a glance. *J. Cell Sci.* 121, 3995-3999.
117. Westbroek, W., Lambert, J., Bahadoran, P., Busca, R., Herteleer, M.C., Smit, N., Mommaas, M., Ballotti, R., & Naeyaert, J.M. (2003). Interactions of human Myosin Va isoforms, endogenously expressed in human melanocytes, are tightly regulated by the tail domain. *J Invest Dermatol.* 120, 465-475.
118. Wright, P.E. & Dyson, H.J. (1999). Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *J Mol Biol.* 293, 321-331.
119. Wu, X., Bowers, B., Rao, K., Wei, Q., & Hammer, J.A., III. (1998a). Visualization of melanosome dynamics within wild-type and dilute melanocytes suggests a paradigm for myosin V function In vivo. *J Cell Biol.* 143, 1899-1918.
120. Wu, X., Kocher, B., Wei, Q., & Hammer, J.A., III. (1998b). Myosin Va associates with microtubule-rich domains in both interphase and dividing cells. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 40, 286-303.
121. Wu, X., Rao, K., Bowers, M.B., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., & Hammer, J.A., III. (2001). Rab27a enables myosin Va-dependent melanosome capture by recruiting the myosin to the organelle. *J Cell Sci.* 114, 1091-1100.
122. Wu, X.S., Rao, K., Zhang, H., Wang, F., Sellers, J.R., Matesic, L.E., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., & Hammer, J.A., III. (2002). Identification of an organelle receptor for myosin-Va. *Nat. Cell Biol.* 4, 271-278.
123. Wu, X.S., Tsan, G.L., & Hammer, J.A., III. (2005). Melanophilin and myosin Va track the microtubule plus end on EB1. *J Cell Biol.* 171, 201-207.
124. Yildiz, A., Tomishige, M., Gennerich, A., & Vale, R.D. (2008). Intramolecular strain coordinates kinesin stepping behavior along microtubules. *Cell.* 134, 1030-1041.
125. Yildiz, A., Tomishige, M., Vale, R.D., & Selvin, P.R. (2004). Kinesin walks hand-over-hand. *Science.* 303, 676-678.
126. Young, J.C., Agashe, V.R., Siegers, K., & Hartl, F.U. (2004). Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 781-791.

127. Zinsmaier, K.E. & Bronk, P. (2001). Molecular chaperones and the regulation of neurotransmitter exocytosis. *Biochem. Pharmacol.* 62, 1-11.

Apêndice 1. Doenças ou desordens relacionadas a falha na maquinária transportadora.

Doença	Modo de herança	Número de herança mendeliana <i>on-line</i> (OMIM)	Proteína defeituosa (gene)	Fenótipo celular
Categoria A				
Miopia Centronuclear	Autossômica dominante	160150	GTPase Dinamina 2 esta envolvida em receptores mediados por endocitose, formação de vesículas no sistema trans-Golgi e endossomas tardios, internalização endossomas, compartimentos lipídicos, união de actina e coesão do centróssoma (<i>DNM2</i>).	Núcleos localizados centralmente em grande número de fibras musculares extrafusais, organização radial dos fios sarcoplasmáticos ao redor do núcleo. Hipertrofia e predominância de fibras do tipo 1, aprisionamento parcial da maturação de miofibrilas sugerem defeitos na função de centróssomas; defeitos nos axônios dos nervos periféricos.
Doença de Charcot-Marie-Tooth, dominante B intermerdiário (CMTDIB)	Autossômica dominante	606482	Dinamina 2 (veja acima)	Degeneração axonal nos sistema nervosa periférico, defeitos na mielinização, transporte axonal e na organização de microtubulos.
Corea-acantocitose (CHAC)	Autossômica recessiva	200150	corea (VPS13A) fator de liberação de proteína vacuolar Vps13p (<i>VPS13A</i>)	Acantocitose de células vermelhas; atrofia dos gânglios basal no cérebro, defeito na ciclo de proteínas entre o sistema trans golgi, endossoma e membrana plasmática.

Deficiência Combinada com fatores de coagulação V e VIII	Autossômica recessiva	227300	Liberador intermediário ERGIC-53 ER-Golgi (<i>LMAN1</i>). MCFD2 forma complexo com ERGIC-53 (<i>MCFD2</i>)	Defeitos na secreção e coagulação dos fatores V e VIII devido ao defeito na liberação de vesículas cardadoras do RE-Golgi
Síndrome de Hermansky-Pudlak (HPS)	Autossômica recessiva	203300	Adaptador Tipo 2 relacionado com proteínas do complexo 3 subunidade beta-1 (<i>AP3B1</i>). Tipos 1, 3-8 Componentes da biogênese do complexo de organelas relacionadas ao lisossomos 1 a 3 (<i>BLOC1</i> para <i>BLOC3</i>) (<i>DTNBP1</i> codificando disbidina), <i>BLOC1S3</i> ; <i>HPS3</i> , <i>HPS5</i> , <i>HPS6</i> ; <i>HPS1</i> , <i>HPS4</i>)	Defeito de organelas relacionadas aos lisossomos (melanossomo, plaquetas, corpos lamelar tipo II, células alveolares epiteliais, grânulos líticos linfócitos T); vazamento de membranas onde proteínas dos lisossomas vão para superfície celular.
Síndrome óculocerebrorenal	Recessiva ligado ao cromossomo X	309000	OCRL1 PtdIns(4,5) P_2 5-fosfatase localizada na rede trans-Golgi, endossomos primários e vesículas revestidas por clarítina (<i>OCRL1</i>)	Secreção de hidrolases lisossomais; anormalidades do citoesqueleto de actina, acumulação de PtdIns(4,5) P_2 ; defeito do tráfego de proteínas entre a rede trans-Golgi e endossomos.

Heterotopia periventricular com microencefalia.	Autossômica recessiva	608097	ARFGEF2 (BIG2) fator de troca do nucleotídeo Guanina pelo fator ARF (<i>ARFGEF2</i>)	Defeitos no precursor de proliferação neural e falha na migração de neurônios para o córtex cerebral; defeitos na mielinização. ARFGEF2 aparentemente atua na saída do RE e no transporte vesicular pós-Golgi.
Displasia da sutura Crânio-lenticular (CLSD)	Autossômica recessiva	607812	SEC23A componente do revestimento da COPII que atua no transporte de membrana do RE para o Golgi (<i>SEC23A</i>)	Formação anormal do tecido conectivo do osso – resultado do defeito na secreção de proteínas da matrix extracelular, dilatação do RE nos fibroblastos, falha na localização do complexo COPII/SEC31

Categoria B

Esclerose Lateral Amiotrofica 1 (ALS1)	Autossômica dominante	105400	Subunidade p150 ^{glued} do motor molecular dineína-dinactina (<i>DCTN1</i>)	Degeneração progressiva dos neurônios motores, distúrbio no transporte axonal retrogrado.
Doença axonal de Charcot-Marie-Tooth tipo 2B (CMT2B)	Autossômica dominante	600882	Pequena Rab7a GTPase endossomal tardia. (<i>RAB7</i>)	Neuropatia sensorial periférica; degeneração axonal. Rab7 atua no transporte de receptores de neurotrofina, defeitos que levarão a neurodegeneração.
Doença axonal de Charcot-Marie-Tooth tipo 2A1 (CMT2A1)	Autossômica dominante	118210	Motor molecular Kinesina KIF1B Kinesina (<i>KIF1B</i>)	Defeito sensoriais e na função do nervo motor; distúrbio no transporte axonal de vesículas precursoras.

Síndrome de Griscelli (GS)	Autossômica dominante	214450, 609227	Tipos 1 e 3 motor molecular Miosina Va; (MYO5A) Tipo3 melanofilina (Slac-2). A Síndrome Elejalde representa a mesma entidade da GS1	Acumulação de Melanossomos nos melanócitos, defeito no ancoramento de melanossomos no córtex celular, (nos três tipos); defeitos neurológicos múltiplos (tipo 1); desregulação dos Linfócitos T e ativação de macrófagos, defeito na localização de lisossomos secretores para a sinapse imunológica da células T citotóxica (Tipo 2)
Doença de Huntington	Autossômica dominante	143100	Huntingtin (Htt) Associada como microtúbulos e proteínas de transporte envolvidas com endocitose e exocitose; antiapoptótico; regulação de genes de transcrição; expansão dos tratos de poliglutamina forma patogênica (polyQ) (HD)	Acumulação de agregados de proteínas conjugadas a ubiquitina em neurônios e glia; disfunção sináptica; morte neuronal seletiva no cortex e corpo estriado; polyQ-Htt falha na associação de microtúbulo com dinactina e transporte de fator neurotrófico derivado do cérebro; (BDNF); regulação da transcrição de fatores neurotróficos pela Htt seria a maior causa da neurodegeneração.
Doença do neurônio motor distal	Autossômica dominante	607641	Subunidade p150 ^{glued} do motor molecular dineína-dinactina (DCTN1)	Degeneração tardia dos neurônios motores; defeito no transporte retrógrado.
Paraplegia espástica 10 (SPG10)	Autossômica dominante	604187	Cadeia pesada da kinesina VA (KIF5A)	Degeneração distal dos axônios, possivelmente defeito no transporte axonal.

Categoria C				
Esclerose Lateral Amiotrófica 8 (ELA8)	Autossômica dominante	608627	Proteína B reguladora de SNARE associada a VAMP; localizada nos compartimentos do RE e Golgi compartimentos; associado com respostas ao desenovelamento de proteínas (<i>VAPB</i>)	Degeneração progressiva dos neurônios motores; possível alteração no trafico de membrana neuronal; disfunção da VAPB na mediação do desenovelamento de proteínas pode contribuir para a degeneração motora.
Síndrome de Chediak-Higashi (CHS)	Autossômica dominante	214500	Regulador do trafego lisossomal (<i>LYST</i> , <i>CHS1</i>). Regulação do tamanho e fusão do lisossomo na membrana plasmática (<i>CHS1</i>)	Melanossomos Gigantes em melanócitos (hipopigmentação); enlargamento dos lisossomos, vazamento lisossomal; deficiência dos grânulos T, citotoxicidade das células NK e função bactericida da neutrofilina; defeito na exocitose lisossomal, neuropatia periférica progressiva.
Coroideremia (CHM)	Recessiva ligado ao cromossomo X	303100	REP-1 (Rab escort protein 1) fator requerido para modificação de isoprenilação da Rab GTPase (<i>CHM</i>)	Degeneração do epitélio da retina, coróide e células fotoreceptoras; defeito na modificação por isoprenilação das GTPases
Doença de Danon	Recessiva ligado ao cromossomo X	300257	Lamp2 (proteína de membrana associada ao lisossomo, <i>LAMP2</i>)	Patologia do músculo cardíaco; acúmulo intracelular de autolisossomos geralmente rodeados por membranas com proteínas de sarcolema; acúmulo de glicogênio muscular.

Atrofia muscular espinhal adulta- (<i>SMA</i>)	Autossômica dominante	182980	Proteína B reguladora de SNARE associada a VAMP; localizada nos compartimentos do RE e Golgi compartimentos; associado com respostas ao desenovelamento de proteínas (<i>VAPB</i>)	Degeneração do corno anterior da medula espinhal; Disfunção do transporte axonal.
Esclerose tuberosa (TS)	Autossômica dominante	191100	Proteína Tuberina (Rab5GAP) GTPase-ativada, modulador da excitose, supressora de tumor. Também tem atividade GAP para uma pequena GTPase Rap1 (<i>TSC2</i>)	Formação de tumor; sugerindo defeito na função endocitária levando a uma má distribuição de moléculas internalizadas que iniciaria a degradação lisossomal.
Recessiva ligado ao cromossomo X	Recessiva ligado ao cromossomo X	313400	Sedilina; p20, Trs20p parte do complexo TRAPP que regula o ancoramento do RE e Golgi (<i>SEDL</i>)	Anormalidades esquelética e início de osteoartrite. mostra excessivo complexo de Golgi e RE dilatado.

Adaptado de OLKKONEN et al., (2006).

Prefoldin 4 interacts with melanophilin within an unstructured domain overlapping the myosin Va binding site

De Paulo, R.F.[‡], Hume, A.N.^ξ, Seabra, M.C.^ξ, Sorenson, M.M.[‡], Salerno, V.P.[‡]

From [‡]Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 21941-590 RJ, Brazil and ^ξMolecular Medicine, National Heart and Lung Institute, Imperial College London, London SW7 2AZ, UK.

* This work was supported by CAPES, CNPQ and Wellcome Trust UK. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked “*advertisement*” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

- 1- Supported by PhD fellowship from the CAPES PDEE program.
- 2- To whom correspondence should be addressed: m.seabra@imperial.ac.uk
sorenson@bioqmed.ufrj.br

KEYWORDS Griscelli / melanocytes / melanosome transport / prefoldin / MyoVa / melanophilin / intrinsically unstructured protein.

The abbreviations used are: IUP, intrinsically unstructured protein; TCP-1 (CCT), Chaperonin containing TCP-1 (also termed TriC); GTD, Globular tail domain; DTT, dithiothreitol; Mlph, Melanophilin; GST, Glutathione S-transferase; MyoVa-MSGTA, Melanocyte-specific globular tail of MyoVa; Mlph Δ RBD, Mlph without Rab binding domain; PFD, prefoldin; Pfd4, prefoldin 4; Myo Va, myosin Va; Slp, synaptotagmin-like protein; Slac2-a, synaptotagmin-like protein homolog lacking C2 domains-c; SHD, Slp homology domain; ABD, Actin binding domain; MBD, myosin binding domain; FITC, Fluorescein isothiocyanate; PONDR, Predictor of naturally disordered regions.

Abstract: An unexplained aspect of melanosome transport is the mechanism that allows the formation of the essential tripartite complex between myosin Va (MyoVa), melanophilin (Mlph) and Rab27a. The interaction among these proteins is the key to melanosome transport. Here we identify a new partner of Mlph, prefoldin4 (Pfd4, ~14kDa), and map for the first time the interaction between Mlph and Pfd4 using the yeast two-hybrid system (in vivo) and biochemical assays (in vitro). Pfd4 is a subunit of prefoldin (PFD, ~87kDa), a chaperone that delivers unfolded proteins to a chaperonin for correct folding. Our in-vivo results suggest that Pfd4 interaction with Mlph overlaps the MyoVa binding site of Mlph. This interaction is confirmed using pull-down assays and fluorescence spectroscopy; Pfd4 competes with MyoVa for the Mlph binding site and C-terminal residues (including a putative coiled-coil region) of Mlph are crucial for Pfd4 binding. In-vitro fluorescence anisotropy reveals a ~8 fold tighter interaction of fluorescein-labeled Mlph with MyoVa tail (Kd ~0.48 μ M) than with Pfd4 (Kd ~3.9 μ M). Mlph's central and C-terminal domains (including putative coiled-coil) work in concert to recruit MyoVa and Pfd4. The MyoVa binding domain on Mlph is a structured element when part of the C-terminal Mlph is present but the Mlph central region alone seems to be intrinsically unstructured. The circular dichroism spectra

of Mlph pre-incubated with Pfd4 or MyoVa show that binding of the central part of Mlph with either Pfd4 or the MyoVa tail causes a large increase in Mlph α -helix content.

Proteins that work as cargo transport carriers, are regulated by different protein partners during movement along cytoskeletal tracks and participate in vesicle tethering, docking and fusion at the plasma membrane in melanocytes offer a fascinating and unique system to study a variety of human genetic disorders caused by defects in membrane trafficking. Melanocytes have numerous advantages as a model system for studying a wide variety of processes from organelle transport and biogenesis to disease. Our understanding of membrane trafficking has been augmented by the advent of tools for generation of melanocyte-specific knockouts of target genes (1;2). Melanosome transport is a complex and tightly regulated process that involves sequential interaction of many membrane traffic proteins and the key event is the recruitment of MyoVa by Mlph.

In the last ten years, the molecular mechanisms involved in Griscelli syndrome (GS) and other diseases characterized by disruption in the interactions of motor proteins have been described in some detail using mouse models with spontaneous mutations. Griscelli syndrome, first described in 1978, is a rare autosomal recessive disorder characterized by dilute pigmentation of the skin, silver-grey hair, large clumps of pigment in hair shafts and abnormal accumulation of end-stage melanosomes near the melanocyte nucleus (3). The mechanism by which MyoVa attaches to melanosomes has been elucidated in part through studies on three mouse coat-color mutants. *Dilute* mice mimic Griscelli syndrome I (GS1) in humans, which is characterized by neurological problems with delayed development and mental retardation and is due to mutation in the heavy chain of MyoVa

(MYOVA). The mouse model *ashen* mimics Griscelli syndrome II (GS2), the most common of these disorders, and is caused by mutation in Rab27A (RAB27A) leading to defects in secretion in immune cells as well as in melanocytes (4;5). A third mouse model, *leaden*, mimics Griscelli syndrome III (GS3). GS3 patients and mice have only dermatologic manifestations, unlike GS1 and GS2, and carry a mutation in the gene that encodes melanophilin (MLPH) (6;7).

Melanophilin in melanosome transport

Melanophilin, also called synaptotagmin-like protein (Slp) lacking C2 domains-a (Slac2-a), represents a novel class of the Slp family. All members of the Slp family contain an N-terminal Slp homology domain (SHD) consisting of two conserved potential α -helical regions (SHD1 and SHD2), frequently separated by two zinc-finger motifs (8). In contrast to other Slp proteins, the Slac2 family (Slac2-a / Mlph, Slac2-b, and Slac2-c / MyRIP) lacks C-terminal tandem C2 domains (C2A and C2B). Instead, Mlph contains two unique coiled-coil domains (Coil 1 and Coil 2) at its C-terminal end (9). Biochemical and cell biological analyses have confirmed that Mlph is the specific linker protein between MyoVa and Rab27a (10;11).

The discovery that melanosome transport to the melanocyte dendrites is dependent on the interaction of Rab27a, Mlph and Myo Va was an important step in understanding how the proteins work inside the melanocyte (12). Studies of the mouse mutants indicate that the binding between proteins follows this sequence: Rab27a binds to the melanosome and then recruits Mlph, which in turn recruits MyoVa. Mlph creates

this link by binding to Rab27a in a GTP-dependent fashion through the Mlph amino terminus, and to Myo Va through its carboxy terminus (13). Studies in vitro suggest that most of the C-terminal part of Mlph functions as an actin-binding domain (ABD) (**Figure 1**); it directly interacts with globular and fibrous actin in vitro, and the C-terminus of Mlph co-localizes with actin filaments when it is expressed in living cells (14).

Mlph has three independent binding domains. Its N-terminus (RBD, 1-150 a.a.) interacts with Rab27a, the medial part of Mlph (MBD, 150-400 a.a.) interacts with MyoVa and the C-terminal region is the actin-binding domain (ABD, 400-590 a.a.) (**Figure 1**). Despite numerous studies of melanosome transport, the biochemistry of the regulation of interaction among these three proteins and especially the role of the C-terminus of Mlph are still obscure.

Taking into consideration the important role of Mlph in melanosome transport, here we characterized its interaction with a new Mlph partner Pfd4. We prepared different constructs of Mlph and studied their interactions with Pfd4 and MyoVa using the yeast two-hybrid (Y2H) technique. We also mapped the interaction between Mlph and Pfd4 using in-vivo and several biochemical (in-vitro) techniques. Secondary structural features of Mlph in solution were evaluated using circular dichroism (CD) spectroscopy, in the presence and absence of MyoVa globular tail domain (MSGTA- with exons: D and F) and Pfd4. Our in-vivo and in-vitro experiments show that Pfd4 binds to the same binding site on Mlph as MyoVa (150-483 a.a.) and that MyoVa out-competes Pfd4 for the Mlph binding site. These findings contribute to the map of functional domains of Mlph and improve our understanding of the molecular basis of Griscelli syndrome type 3 (albinism due to insufficient Mlph).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Construction of plasmids

pBMT-Mlph367-500 was constructed by PCR amplification of DNA encoding Mlph a.a 367-500 using oligonucleotide primers 5'-CGCGAATTCCCCCAGTGCTGACACAG AG-3' and 5'-GGCCCTCGAGGATGCCTGACTTTCTCC GAGG-3' and IMAGE clone 4862487 as template. The resulting PCR product was digested using EcoR1 and Xho1 restriction enzymes and ligated into pBTM116 vector (prepared using the same enzymes) using T4 DNA ligase. Following transformation of DH5 α cells, recombinant clones were identified by restriction digestion and the sequence confirmed by DNA sequencing.

Yeast two-hybrid assay

Yeast two-hybrid (Y2H) interactions were tested in the yeast strain L40 strain genotype MATa, trp1, leu2, his3, LYS2::lexA-HIS3 URA3::lexA-lacz (a generous gift of J. Camonis, Institut Curie) using standard protocols. Melanocyte cDNA was inserted into yeast expression vector pGAD and transformed into L40 competent yeast using lithium acetate (LiAc) protocol (TRAFO). Yeast were transformed with combinations of pBTM116 and pGAD constructs and grown for 2 days on standard drop-out medium plates lacking tryptophan and leucine and colonies were streaked out in patches, grown for 2 days and then assayed for β -galactosidase activity as described in Durfee et al (15). A murine melanocyte cDNA library was prepared by ligation of wild-type melanocyte (melan-a) derived random primed cDNA into EcoRI-digested pGAD-C1 (GATC Biotech, Konstanz, Germany). The mouse melanocyte library was screened with bait construct pBTM-mouse Mlph-367-500a.a as described in Fromont-Racine et al. (16).

Expression in yeast of LexA fusion proteins was determined by Western blot analysis using LexA antibodies (Upstate,

New York, NY) and chemiluminescent visualization.

Sequence analyses

After the large-scale library transformation we obtained 10 positive blue colonies in the β -galactosidase liquid assay. These were amplified by PCR and the product analyzed on a 1 % agarose gel (data not shown). Three of these colonies were identified as prefoldin 4 (Pfd4).

Expression and purification of GST-Mlph, MBP-MSGTA and MBP-Pfd4

pMAL-c2XMyoVa which encodes MyoVa specific melanocyte-globular tail (MSGTA, aa 1260-1853 and including alternatively spliced exons D and F and lacking exon B) fused to the C-terminus of E. coli maltose-binding protein (MBP) was produced by subcloning of MyoVaMSGTA from pLEX MyoVaMSGTA (17) using EcoRI and SalI restriction endonucleases into pMAL-c2X (New England Biolabs, Beverly, MA) prepared using the same enzymes. The fidelity of sequences of clones was confirmed by DNA sequencing. All oligonucleotide primers were synthesized and desalted by Sigma-Genosys (Cambridge, UK), and protein sequences were aligned using ClustalW (available at <http://pbil.univ-lyon1.fr/>). The sequence of all oligonucleotide primers used in this study is available on request. Fractions containing recombinant protein were dialyzed against lysis buffer. The purity of eluted protein was judged by SDS-PAGE followed by Coomassie blue staining.

For production of pGEX-4T1-Mlph constructs, which allow the synthesis of fragments of Mlph fused to the C-terminus of GST, the appropriate regions of Mlph coding sequence were amplified by PCR using IMAGE clone 4862487 as a template. PCR products were digested with restriction enzymes EcoRI and XhoI and ligated into empty pGEX-4T1 prepared

using the same enzymes. A pGEX-4T1 clone encoding GST-Mlph150-500AP was produced in the same way using pCS26xMyc-MlphA467P as a template.

In-vitro pull-down assay

His-tagged MyoVa-MSGTA, MBP-tagged Pfd4 or MBP-tagged MyoVa-MSGTA and GST-tagged Mlph were purified from bacterial lysate. GST-Mlph (100 pmol) was mixed with 100 pmol (or more) MBP-Pfd4/His-MyoVa-MSGTA, in buffer A (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT and 0.075 mM Nonidet P-40) and incubated for 30 min at RT with gentle agitation. Equilibrated glutathione-Sepharose beads, 20 μ l, were added to each reaction mixture and incubated for 30 min at RT with gentle agitation. The glutathione-Sepharose beads were precipitated by centrifugation and washed twice with 1 ml buffer A. Bound proteins were eluted by boiling the beads in SDS loading buffer, and the eluates were analyzed by immunoblotting using antibodies specific to GST, His or MBP. Signals were analyzed using a Fujifilm LAS (Tokyo, Japan) and quantified using Aida software (Aquasana, Alpharetta, GA) and relative binding (shown in bar chart) was calculated by dividing the band intensity of MBP-Pfd4 or His-MSGTA by the band intensity of GST-Mlph.

Circular dichroism measurements

CD spectra were recorded in a Jasco J-715 spectropolarimeter (Jasco Corporation, Tokyo, Japan) at 25°C with circular 0.10-mm-pathlength cells. The buffer used for CD spectra was 20 mM K phosphate pH 7.5. The buffer spectrum was subtracted from each sample spectrum, and traces shown are averages of four repeat recordings. Each protein was added to a final concentration of 10 μ M.

Fluorescence anisotropy measurements

GST-Mlph 150-590, 400-590 and A453P constructs were labeled with amino-

reactive fluorescein isothiocyanate (FITC) for fluorescence anisotropy assays. For the labeling reaction, Mlph constructs were dissolved in 0.1 M sodium bicarbonate buffer at pH 8.0 to a final concentration of 5–10 mg/ml and incubated with FITC (final concentration, 0.5–1.0 mg/ml) for 1 h at room temperature. After incubation, the FITC-Mlph conjugate was separated from the free dye by gel filtration using a PD-10 desalting column (Amersham Biosciences, New York, NY) equilibrated with Tris buffer (50 mM, pH 7.4) containing 100 mM NaCl. After elution, concentration of the labeled protein and the efficiency of labeling were determined based on molar extinction coefficients of Mlph 150-590 ($46,280 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ at 280 nm), Mlph 400-590 ($47,580 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ at 280 nm), Mlph 150-590A457P ($46,280 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ at 280 nm), and FITC ($68,000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ at 494 nm). FITC-Mlph was stored at $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ and protected from light. For anisotropy measurements, the samples were excited at 494 nm, and the emission was observed through a 490 nm filter. Fluorescence spectra were recorded on an ISS K2 spectrofluorometer (ISS Inc., Champaign, IL).

RESULTS

Yeast two-hybrid screen of a melanocyte library; Pfd4 as prey in the yeast two-hybrid screen (Y2H)

The first experiment was designed to identify candidate Mlph binding partners *in vivo* using the yeast two-hybrid system to screen a melanocyte library with Mlph (367-500 a.a.) construct as bait. This important piece of Mlph has the two essential parts for its function, MBD and most of the C-terminal (18;19), and may be able to bind proteins associated with the cytoskeleton, signaling, and regulation of melanosome transport. Mlph 367-500 a.a. was well expressed in L40 yeast (data not shown).

An L40 co-transformation using pBTM-Mlph 367-500 a.a. (bait) and 500 μg human melanocyte library DNA (prey) was performed. We isolated ten His⁺/ β -Gal⁺ colonies representing protein-protein interaction *in vivo*. On PCR amplification, three of these colonies yielded an 0.9-kb band that was found to be identical with Pfd4 upon sequencing.

Pfd4 (14 kDa) is a subunit of the ~ 90 -kDa prefoldin complex (PFD). Eukaryotic PFD is assembled from six different proteins that consist of 2 α subunits (Pfd3 and Pfd5) and 4 β -subunits (Pfd1, Pfd2, Pfd4 and Pfd6). The eukaryotic PFD have no similarity with known protein structures, indicating that PFD belongs to a new class of molecular chaperones that process folding by a novel structural and functional mechanism (20). The structure of the archaeal PFD from *Methanobacterium thermoautotrophicum* (MtPFD), determined at atomic resolution, resembles a jellyfish with a base composed of a double β barrel and six protruding coiled-coil “tentacles.” Each tentacle belongs to one of the six PFD subunits (Pfd), arranged as two Pfd α subunits located in the center of the structure and four of the homologous Pfd β placed at the periphery (21).

Misfolded proteins or misassembled complexes can malfunction and such events can be detrimental to all living organisms, including humans. Successful protein folding is a multistep process that results in a protein structure often representing the lowest free-energy state. Chaperones typically interact with and stabilize hydrophobic peptide sequences that are ultimately buried in the folded protein but become exposed transiently during protein synthesis or upon denaturation in conditions of cellular stress (22). It has been suggested that a few cytoskeleton proteins, mainly actin and tubulins, are the major targets for PFD and chaperonin-containing TCP1 (CCT) in mammals (23).

The Mlph coiled-coil binds Pfd4

Our first objective with Pfd4 was to examine its ability to bind to Mlph C-terminal regions. It is known that the C-terminal region of Mlph between a.a. 400 and 483 is required together with the N-terminal RBD and medial MBD in order to allow recruitment of MyoVa and melanosome transport in melanocytes (24). This region contains a predicted coiled-coil segment (**Figure 1**) and is an interesting candidate for binding a chaperone such as Pfd4. In the Y2H assay, the C-terminal segments of Mlph (367-590 a.a, 400-590 a.a, 367-520 a.a and 367-500 a.a) were able to interact with Pfd4 as well as the full-length Mlph (**Figure 2**). As positive control, all of the Mlph constructs were able to bind MSGTA (**Figure 2**). There was no binding between Rab27a and Mlph 367-590 a.a., which lacks the Rab27a binding domain (**Figure 2**).

The smallest piece of Mlph that bound Pfd4 and MSGTA was the fragment 367-433 a.a. (**Figure 2**). Neither the fragment 467-590 a.a. nor 481-590 a.a. was able to bind Pfd4 (**Figure 2**). Thus truncated segments of the C-terminus of Mlph alone, without the MBD region, were not effective.

The prediction that 440-483 a.a of Mlph forms an amphipathic α -helix means that it could associate with other similar α -helices to form a coiled-coil region (25). We performed three different point mutations in part of Mlph with a view to disrupting the Mlph coiled-coil structure (26). Alanine was replaced by proline at positions 453 a.a , 460 a.a or 467 a.a and then full-length Mlph with each point mutation was tested to see if it could still bind to Pfd4 and MSGTA. Mutation of residue 453 did not stop the binding of either Pfd4 or MSGTA. On the other hand, mutation of residue 467 blocked the binding of Mlph to both Pfd4 and MSGTA, and mutation of residue 460 blocked binding to Pfd4. These data suggest that disruption of the α -helix around residue

460 is specific for preventing the binding between Pfd4 and Mlph (**Figure 2**).

Pfd4 binds also to a bigger fragment of Mlph

In order to determine whether Mlph binds directly to Pfd4 and as a strategy to confirm our *in vivo* data, recombinant Mlph, MSGTA and Pfd4 proteins were tested for their ability to interact *in vitro*. To express GST-tagged Mlph proteins efficiently in *E.coli*, the Rab27a binding site was omitted because this region contributes considerably to instability of recombinant protein (our unpublished observations). GST-Mlph constructs containing just globular tail binding domain (GTBD, 150-266 a.a.) or just the C-terminal region were not able to interact with Pfd4 (Figure 4). On the other hand, a GST fusion Mlph (150-590 a.a.) and a GST fusion protein containing the MBD region together with the coiled-coil region (150-500 a.a.) were able to interact significantly more strongly with Pfd4 (**Figure 3, columns 3, 5**) than was either of these regions alone (**see below, Figure 4**). The enhancement of interaction was attenuated by the introduction of point mutation A453P (Mlph 150-590AP and Mlph 150-500AP), predicted to disrupt the coiled-coil structure of this region (**Figure 3, columns 4, 6**). As a control, GST alone was not able to interact with Pfd4.

To extend the map of the Pfd4 binding site in Mlph, we observed that there was no interaction between Mlph that contains just the C-terminal alone (481-590 a.a, 400-500 a.a) (**Figure 3, column 9; Figure 4, column 6**), in contrast with an Mlph construct (150-483 a.a) that includes the MBD region (**Figure 4, column 3**). These data indicate that Pfd4 may bind to Mlph along the hydrophobic residues in the C-terminal part of Mlph, but it needs at least part of the MBD segment to do so. It is noteworthy that GST-tagged MyRIP, which contains a coiled-coil region in its C-terminus, was not able to bind to Pfd4

(**Figure 4, column 5**), suggesting a possible specific binding of Pfd4 just with Mlph.

Our data show clearly that Pfd4 binds to Mlph in the same region as previously described for MSGTA (27). To confirm this hypothesis, a competition experiment between Pfd4 and MSGTA was performed. One hundred picomoles of the indicated GST-Mlph construct was pre-incubated with 100 picomoles of His-MSGTA in the presence of glutathione-Sepharose beads, and 30 min later MBP-Pfd4 was added (see Materials and Methods). The pre-binding between Mlph and MSGTA (**Figure 5A, columns 5, 6**) significantly decreased the binding between Pfd4 and Mlph in comparison with the control (**Figure 5A column 2**). On the other hand, the pre-interaction of Mlph and Pfd4 did not interfere with the MSGTA binding to Mlph (**Figure 5B, columns 2 vs 5**). **Figure 6** shows a summary of interactions between recombinant Mlph and Pfd4 based on the 3-4 assays.

To obtain an idea of the relative affinities of Mlph for its two partners, we established pre-binding of Mlph (150-590) with 0-600 picomoles of Pfd4 and after 30 min added 100 picomoles of MSGTA (data not shown). The binding of MSGTA was not affected by the pre-incubation with up to 300 picomoles of Pfd4, but at higher concentrations it was blocked. This observation supports the hypothesis that Pfd4 and MSGTA bind at the same site on Mlph and it shows that MSGTA out-competes Pfd4 on the Mlph binding site with an affinity that is about four-fold higher than that between Pfd4 and Mlph.

Our data show that Pfd4 binding domain (Pfd4BD) (150-483 a.a.) overlaps with the predicted MBD, and that the coiled-coil Mlph is necessary but not sufficient for Pfd4 and MyoVa binding. The Mlph's coiled-coil region clearly enhances Pfd4 recruitment.

Anisotropy measurements

C-terminal of Mlph is crucial to recruit MyoVa-MSGTA and Pfd4 Mlph interaction.

To directly assess the affinity of Mlph-MSGTA and Mlph-Pfd4 interactions, Mlph constructs were labeled with amino-reactive fluorescein isothiocyanate (FITC) for fluorescence anisotropy assays. The total fluorescence decay is a measure of the population of the excited state. The anisotropy of the fluorescence is the degree to which molecular orientation polarizes the emitted fluorescence. The anisotropy is initially non-zero because the excitation beam polarization selectively excites a particular orientation of molecules. The decay of the anisotropy therefore measures the decay of net molecular orientation due to diffusive motion. The characteristic decay time, known as the rotational diffusion time, increases with the size of the rotating particles and can be used to titrate one component of a complex with another.

Fluorescein-tagged Mlph (10 μ M) binds to MyoVa-MSGTA (**Figure 7A**) and Pfd4 (**Figure 7B**) in the same concentration range. Anisotropy measurements revealed a strong interaction between Mlph Δ RBD and MyoVa-MSGTA or Pfd4, and no interaction of these two proteins with Mlph-150-590A453P, or with Mlph400-590 a.a.. Mlph 150-590 a.a. did not bind to muscle myosin II.

Mlph 150-590 a.a. bound to MSGTA with a K_d value of $\sim 0.48 \mu$ M. For Pfd4, the affinity was lower, with a K_d value of $\sim 3.9 \mu$ M. There was little or no interaction of Mlph 400-590 a.a. or 150-590A453P with either protein. Therefore, we conclude that MBD is needed but not sufficient for Mlph to bind to MyoVa-MSGTA and Pfd4, and Pfd4 has a weak affinity for Mlph compared to MyoVa-MSGTA.

The Pfd4/MyoVa-MSGTA binding domain of Mlph is intrinsically unstructured
Primary sequence analysis of Mlph

The primary sequence of Mlph was analyzed using the Predictor of Naturally Disordered Regions (PONDR-VL-XT) program to map putative unstructured regions of Mlph (28-30). As shown in **Figure 8**, several long stretches of Mlph are predicted to be unstructured. The Mlph primary sequence has a large number of disorder-promoting amino acids (Ala, Arg, Gly, Gln, Ser, Pro, Glu and Lys) when compared to the number of order-promoting amino acids (Trp, Cys, Phe, Ile, Tyr, Val and Leu) (31). There are two notable exceptions to the prediction of disorder. The first is in the N-terminal domain, as described by (32). This domain was recently crystallized and shares a high sequence identity with rabphilin 3A, which forms a well-ordered structure bound to Rab3a (33;34). The second is in the C-terminal segment, which is more ordered than the Pfd4 binding domain and contains a greater number of order-promoting amino acids. Our data suggest that this ordered C-terminal may be essential but not sufficient to recruit Pfd4 and Myo Va (35). The PONDR score for Mlph indicates that the Pfd4 binding domain probably lacks a well-defined, compact fold. MSGTA (**Figure 8B**) and Pfd4 (**Figure 8C**), different from Mlph, seem to be well-structured proteins. The Foldindex program showed qualitatively the same profile.

Circular dichroism (CD) – The C-terminal region of Mlph is crucial to keep Mlph structured

CD spectroscopy is a sensitive means of assessing the secondary structural features of a protein in solution. The CD spectra of different Mlph constructs were recorded at 25°C in 20 mM K phosphate buffer (**Figure 8D**). Mlph Δ RBDB exhibits primarily an α -helical structure with distinct minima at 208 and 222 nm, characteristic of a stable compact structure. However, the construct Mlph 150-400 a.a. alone, without the extreme C-terminal (ordered) part of

Mlph, changes its structure, decreasing the amount of α -helix. As mentioned, data of Hume et al. (2006) show that the C-terminal part of Mlph is crucial for melanosome rescue experiments and our data show that this part is important for binding to Pfd4. The CD profile of the Mlph-150-590A453P and Mlph 300-590 a.a. showed no evidence for stable secondary structure. The C-terminal by itself, Mlph 400-590 a.a., seems to be unstructured as well (data not shown) reinforcing the idea that the Mlph needs its central part combined with to its C-terminal part to be structured and functional. Pfd4 seems to be an interesting candidate to bind to the intrinsically unstructured region of Mlph and to regulate its folding. To confirm this idea, we collected CD spectra for the Pfd4 and MSGTA complex with Mlph.

Melanophilin α -helix content increases upon binding to MyoVa-MSGTA and Pfd4

Protein folding and binding are analogous processes, in which the protein searches for favorable intramolecular or intermolecular interactions on a funneled energy landscape (36). Many disordered proteins need to bind to other proteins to achieve fold and function. The mechanism by which folding is coupled to binding is poorly understood, but it has been hypothesized on theoretical grounds that the binding kinetics may be enhanced by a fly-casting effect, where the disordered protein binds weakly and unspecifically to its target and folds as it approaches the cognate binding site (37). To evaluate the global conformation of the MSGTA-Mlph complex, and to discover whether binding stabilizes Mlph secondary structure, we mixed equimolar amounts of Mlph and MyoVa-MSGTA on ice, and let them bind overnight. The CD spectrum for each component was compared with the spectrum of the complex. The observed spectrum of the complex revealed much greater negative ellipticity

than the calculated spectrum for the sum of the two individual components (**Figure 9A**). The complex showed negative peaks at 208 and 222 nm, a characteristic of α -helical structure. This was also true for Pfd4 bound to Mlph (**Figure 9B**). Thus binding of either MSGTA or Pfd4 leads to the formation or stabilization of significant secondary structure in Mlph.

DISCUSSION

In this study, we report for the first time that Pfd4 binds to an intrinsically disordered domain of Mlph. We report here that the Pfd4 binding site (Pfd4BD, 150-483 a.a.) on Mlph overlaps the MBD (150-400 a.a.) *in vivo and in vitro*. The Pfd4BD is composed of a large domain predicted to be relatively unstructured, 62% of the residues are typical of disordered regions in proteins (**Figures 8A and 11A**) and there is a hydrophobic region predicted to be structured as a coiled-coil (429-468 a.a.). Here we show that when Mlph interacts with MSGTA or Pfd4, it gains α -helix content. Myosin tail affinity for Mlph was eight-fold greater than the affinity of Pfd4 for Mlph.

How does Mlph recruit Myo-Va in the cell? Our group and others have shown that the formation of a tripartite protein complex composed of Rab27a, Mlph and MyoVa is indispensable for normal melanosome transport in melanocytes *in vivo* (38;39). The molecular and biochemical mechanisms for Mlph binding to these proteins is poorly understood. To establish an even distribution of melanosomes during dispersion, Mlph must coordinate its binding with Myo-Va and Rab27a. However, the secondary and tertiary structure of these proteins and their interactions are unknown.

Here we screened a melanocyte-bait library using a Y2H system to isolate Mlph-interacting proteins and identified Pfd4 as a Mlph interacting protein. Furthermore, our Y2H and biochemical data demonstrate that

MSGTA and Pfd4 bind to Mlph via its C-terminal, a region required for its stability: point mutations in the C-terminus of Mlph abolished the interactions between Mlph and Pfd4 (**Figures 2 and 3**). Mutating residue 453, located in the Mlph C-terminus did not prevent the interactions between Mlph-MSGTA and Mlph-Pfd4 (**Figure 2**). Surprisingly, however, this mutation does decrease the *in vitro* interaction between Mlph and Pfd4 (**Figure 3**). This contradiction in our data can be explained by a greater specificity of the *in-vitro* interaction than in the Y2H assay. It is worth mentioning that in the Y2H assay, mutation at residue 460 (A460P) prevents the specific binding between Mlph and Pfd4, yet MSGTA still interacts with Mlph (**Figure 2**). This result suggests that MSGTA and Pfd4 do not share exactly the same binding site on Mlph, despite the apparent overlap. Additional *in-vitro* and *in-vivo* experiments need to be performed to confirm this specificity.

Almost all biological activities and resulting functions require protein-protein interactions. Proteins must therefore be able to fold into their appropriate tertiary structures and to assemble into their specific complexes to carry out their biological activities (40). To achieve this process in a cellular environment, which predominantly favors aggregation and nonproductive folding, the assistance of protein complexes called chaperones is required (41).

In this study we have shown that the interaction between Mlph and Pfd4 occurs on the Mlph domain described to bind to Myo-Va (**Figures 2, 3 and 4**). Considering that binding and folding are interconnected events (42), our data suggest that MyoVa and Pfd4 could act as induced-fit binding proteins, binding to Mlph to stabilize its folding and secondary structure. As shown here with Pfd4, PFD subunits by themselves have a major role in protein stabilization; prefoldin 6 (Pfd 6) is required for normal

microtubule dynamics and organization in Arabidopsis (43). Mutations in Pfd6 resulted in an impaired microtubule function, which was associated with reduced plant size, abnormal orientation of cell division planes and altered microtubules, both in organization and dynamics suggested that Pfd4 and Pfd6 are part of the same complex. The role of PFD appears to be conserved between plants and eukaryotes. Prefoldin 2 (Pfd2), interacts with hepatitis C virus (HCV) F protein, and this interaction perturbs the normal function of PFD complex, resulting in an aberrant organization of microtubule cytoskeleton. The authors propose that this molecular event likely contributes to viral persistence in chronic HCV infection (44).

For most proteins in the cytosol of eukaryotes, the folding pathways are still largely a mystery, even though cytosolic chaperones have been identified, including multiple members of the heat shock protein (Hsp) 70 family, Hsp 90 and the chaperonin, CCT/TriC. Particularly puzzling has been the role of CCT. These results suggest that CCT acts as chaperone for many cellular proteins, including the cytoskeletal components actin and tubulin (45). However, an intriguing question is how its substrates arrive at CCT – whether directly from their site of synthesis, the ribosome, or through an intermediary. This implicates PFD as an intermediary for newly synthesized actin and tubulin, acting between the ribosome and CCT (46;47). Unstructured proteins with WD repeats in their C-terminal domain are targets for other chaperones such as Ssb, but proteins with WD repeats in the C-terminus do not bind to PFD (Siegiers et al., 1999). It is worth mentioning that actin and tubulin, like Mlph, have no WD repeat domain near the C-terminus (**Figure 11**) (48-50).

Disruption of yeast genes encoding PFD subunits results in actin and microtubule cytoskeletal defects, which are comparable to those of various yeast strains

with temperature-sensitive defects in the chaperonin containing TCP-1 (CCT) (51). Although α -tubulin and β -actin are not homologous, each contains two regions important for binding to PFD (52). PFD accelerates actin folding at least 5-fold and prevents the premature release of nonnative proteins from CCT, as demonstrated by pulse-chase labeling experiments followed by immunoprecipitation of CCT (53).

We demonstrate here that Pfd4 interacts directly with Mlph, and furthermore, that the C-terminal region of Mlph is crucial for Pfd4 binding. Additionally, we show that the multiple domains of Mlph must work in concert: despite the requirement for the C-terminus of Mlph (**Figures 3 and 4**), the C-terminal region by itself is not able to interact with Pfd4 (**Figures 3 and 4**). Recently, it was shown that cAMP-induced melanosome dispersion was due to Mlph phosphorylation. The authors also demonstrated that Mlph binds to dynein, a microtubule-motor protein that coordinates the early outward movement of melanosomes along microtubules and their later transfer to actin filaments. Dynein seems to be another new Mlph partner (54).

In our work, we used CD measurements to check Mlph 150-590 Δ RBD secondary structure. When this construct has a protein with a point mutation (A453P) that disrupts the putative C-terminal structure, the spectrum exhibited a minimum ellipticity around 205 nm (**Figure 8 D**). This observation is consistent with those for Mlph 147-403 a.a and Mlph 147-240 a.a. (55). However, we also show that Mlph, when its C-terminal region together with its central part is analyzed, exhibits ellipticity minima around 208 and 222 nm, representing α -helix structure (**Figure 8 D**).

The myosin Va tail contains three alternative spliced exons; B, D and F. These exons are distinctly incorporated into myosin-Va in a tissue-dependent manner,

creating six possible isoforms, and by extension, different functions (56). Our data suggest that exon F, present in MSGTA, is fundamental for binding to Mlph and to induce a conformational change in Mlph (**Figure 9A and B**). Presence of this exon may explain why we find that MSGTA causes an increase in Mlph structure and myosin Vb tail from brain does not (57). Myo2p is the yeast homologue of MyoVa. Two of the Myo2p adapters, Vac17p and Mmr1p, have been characterized as intrinsically disordered proteins (Huang et al., 1998).

PFD interacts with unfolded actin along the tips of its projecting arms. In its PFD-bound state, actin seems to acquire a conformation similar to that adopted when it is bound to CCT (58). In another work, using pulse-chase labeling experiments and immunoprecipitation assays, PFD was shown to accelerate actin folding 5-fold and prevent the premature release of nonnative protein CCT (59).

Molecular chaperones are a critical factor of signaling pathways. The rapid and high-fidelity coupling of melanosome transport requires that the Mlph be sequentially used. It has sustained an optimal selectivity despite repeated use. The numerous protein-protein interactions that are involved in melanosome transport apparently require a sequential step transition through several states of transient protein complexes or protein conformation. MyoVa and Pfd4 working as molecular chaperones, or in the case of Myo Va by inducing a fit for Mlph, may serve to supervise these specific transitions during its binding to a unique substrate. This role is observed for the SNAP/NSF, auxilin/Hsc70, and CSP/Hsc70 chaperone machinery in neurons and other cells (60). The literature now contains numerous reports of disordered regions that are crucial for function (61). Our data led us to speculate that Mlph is initially in a partially unfolded state. In our model

(**Figure 10**), the protein converts from this form to a state with some liquid-like characteristics, the “molten globule” state. For example, the side chains transform from a rigid to non-rigid packing. Upon binding to Pfd4 or the MyoVa tail, the secondary structure of Mlph changes and it assumes a more compact form. Thus, Pfd4 or MyoVa tail bound to Mlph might allow Mlph to bind different, but selective, substrate proteins.

This study raises several questions that will need to be addressed through additional work. Does Pfd4 actually coordinate Mph and MyoVa interaction in vivo as suggested by our in-vitro experiments? Addressing this question will help define the mechanism of Pfd4 regulation during melanosome dispersion and tethering. Future experiments should elucidate the mechanism of action of Pfd4 in melanosome transport and in different cell types.

Reference List

1. Provance, D. W., Jr., Wei, M., Ipe, V., and Mercer, J. A. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 14554-14558
2. Seabra, M. C., Mules, E. H., and Hume, A. N. (2002) *Trends Mol Med* **8**, 23-30
3. Griscelli, C. and Prunieras, M. (1978) *Int. J Dermatol.* **17**, 788-791
4. Menasche, G., Pastural, E., Feldmann, J., Certain, S., Ersoy, F., Dupuis, S., Wulffraat, N., Bianchi, D., Fischer, A., Le, D. F., and de Saint, B. G. (2000) *Nat Genet.* **25**, 173-176
5. Bizario, J. C., Feldmann, J., Castro, F. A., Menasche, G., Jacob, C. M., Cristofani, L., Casella, E. B., Voltarelli, J. C., de Saint-Basile, G., and Espreafico, E. M. (2004) *J. Clin. Immunol.* **24**, 397-410
6. Matesic, L. E., Yip, R., Reuss, A. E., Swing, D. A., O'Sullivan, T. N., Fletcher, C. F., Copeland, N. G., and Jenkins, N. A. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 10238-10243
7. Provance, D. W., James, T. L., and Mercer, J. A. (2002) *Traffic.* **3**, 124-132
8. Fukuda, M. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 15373-15380
9. Nagashima, K., Torii, S., Yi, Z., Igarashi, M., Okamoto, K., Takeuchi, T., and Izumi, T. (2002) *FEBS Lett.* **517**, 233-238
10. Provance, D. W., Jr., Wei, M., Ipe, V., and Mercer, J. A. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 14554-14558
11. Hume, A. N., Collinson, L. M., Rapak, A., Gomes, A. Q., Hopkins, C. R., and Seabra, M. C. (2001) *J Cell Biol* **152**, 795-808
12. Seabra, M. C., Mules, E. H., and Hume, A. N. (2002) *Trends Mol Med* **8**, 23-30
13. Hume, A. N., Ushakov, D. S., Tarafder, A. K., Ferenczi, M. A., and Seabra, M. C. (2007) *J. Cell Sci.* **120**, 3111-3122
14. Kuroda, T. S., Ariga, H., and Fukuda, M. (2003) *Mol. Cell Biol.* **23**, 5245-5255
15. Durfee, T., Becherer, K., Chen, P. L., Yeh, S. H., Yang, Y., Kilburn, A. E., Lee, W. H., and Elledge, S. J. (1993) *Genes Dev.* **7**, 555-569
16. Fromont-Racine, M., Rain, J. C., and Legrain, P. (1997) *Nat. Genet.* **16**, 277-282

17. Strom, M., Hume, A. N., Tarafder, A. K., Barkagianni, E., and Seabra, M. C. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 25423-25430
18. Hume, A. N., Tarafder, A. K., Ramalho, J. S., Sviderskaya, E. V., and Seabra, M. C. (2006) *Mol. Biol. Cell* **17**, 4720-4735
19. Ramalho, J. S., Lopes, V. S., Tarafder, A. K., Seabra, M. C., and Hume, A. N. (2009) *Pigment Cell Melanoma Res.*
20. Siegert, R., Leroux, M. R., Scheufler, C., Hartl, F. U., and Moarefi, I. (2000) *Cell* **103**, 621-632
21. Martin-Benito, J., Gomez-Reino, J., Stirling, P. C., Lundin, V. F., Gomez-Puertas, P., Boskovic, J., Chacon, P., Fernandez, J. J., Berenguer, J., Leroux, M. R., and Valpuesta, J. M. (2007) *Structure.* **15**, 101-110
22. Vainberg, I. E., Lewis, S. A., Rommelaere, H., Ampe, C., Vandekerckhove, J., Klein, H. L., and Cowan, N. J. (1998) *Cell* **93**, 863-873
23. Mogk, A. and Bukau, B. (2004) *Curr. Biol* **14**, R78-R80
24. Hume, A. N., Tarafder, A. K., Ramalho, J. S., Sviderskaya, E. V., and Seabra, M. C. (2006) *Mol. Biol. Cell* **17**, 4720-4735
25. Lupas, A., Van, D. M., and Stock, J. (1991) *Science* **252**, 1162-1164
26. Hume, A. N., Tarafder, A. K., Ramalho, J. S., Sviderskaya, E. V., and Seabra, M. C. (2006) *Mol. Biol. Cell* **17**, 4720-4735
27. Hume, A. N., Tarafder, A. K., Ramalho, J. S., Sviderskaya, E. V., and Seabra, M. C. (2006) *Mol. Biol. Cell* **17**, 4720-4735
28. Li, X., Romero, P., Rani, M., Dunker, A. K., and Obradovic, Z. (1999) *Genome Inform. Ser. Workshop Genome Inform.* **10**, 30-40
29. Romero, P., Obradovic, Z., Li, X., Garner, E. C., Brown, C. J., and Dunker, A. K. (2001) *Proteins* **42**, 38-48
30. Prilusky, J., Felder, C. E., Zeev-Ben-Mordehai, T., Rydberg, E. H., Man, O., Beckmann, J. S., Silman, I., and Sussman, J. L. (2005) *Bioinformatics.* **21**, 3435-3438
31. Dunker, A. K., Lawson, J. D., Brown, C. J., Williams, R. M., Romero, P., Oh, J. S., Oldfield, C. J., Campen, A. M., Ratliff, C. M., Hipps, K. W., Ausio, J., Nissen, M. S., Reeves, R., Kang, C., Kissinger, C. R., Bailey, R. W., Griswold, M. D., Chiu, W., Garner, E. C., and Obradovic, Z. (2001) *J. Mol. Graph. Model.* **19**, 26-59
32. Geething, N. C. and Spudich, J. A. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 21518-21528
33. Ostermeier, C. and Brunger, A. T. (1999) *Cell* **96**, 363-374

34. Kukimoto-Niino, M., Sakamoto, A., Kanno, E., Hanawa-Suetsugu, K., Terada, T., Shirouzu, M., Fukuda, M., and Yokoyama, S. (2008) *Structure*. **16**, 1478-1490
35. Hume, A. N., Tarafder, A. K., Ramalho, J. S., Sviderskaya, E. V., and Seabra, M. C. (2006) *Mol. Biol. Cell* **17**, 4720-4735
36. Tsai, C. J., Kumar, S., Ma, B., and Nussinov, R. (1999) *Protein Sci.* **8**, 1181-1190
37. Sugase, K., Dyson, H. J., and Wright, P. E. (2007) *Nature* **447**, 1021-1025
38. Hume, A. N., Collinson, L. M., Hopkins, C. R., Strom, M., Barral, D. C., Bossi, G., Griffiths, G. M., and Seabra, M. C. (2002) *Traffic*. **3**, 193-202
39. Provance, D. W., James, T. L., and Mercer, J. A. (2002) *Traffic*. **3**, 124-132
40. Vainberg, I. E., Lewis, S. A., Rommelaere, H., Ampe, C., Vandekerckhove, J., Klein, H. L., and Cowan, N. J. (1998) *Cell* **93**, 863-873
41. Tomoyasu, T., Mogk, A., Langen, H., Goloubinoff, P., and Bukau, B. (2001) *Mol Microbiol.* **40**, 397-413
42. Fersht, A. R. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 1525-1529
43. Gu, Y., Deng, Z., Paredez, A. R., DeBolt, S., Wang, Z. Y., and Somerville, C. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **105**, 18064-18069
44. Tsao, M. L., Chao, C. H., and Yeh, C. T. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **348**, 271-277
45. Craig, E. A. (2003) *Curr. Biol.* **13**, R904-R905
46. Hansen, W. J., Cowan, N. J., and Welch, W. J. (1999) *J. Cell Biol.* **145**, 265-277
47. Siegers, K., Waldmann, T., Leroux, M. R., Grein, K., Shevchenko, A., Schiebel, E., and Hartl, F. U. (1999) *EMBO J* **18**, 75-84
48. Vainberg, I. E., Lewis, S. A., Rommelaere, H., Ampe, C., Vandekerckhove, J., Klein, H. L., and Cowan, N. J. (1998) *Cell* **93**, 863-873
49. Siegers, K., Waldmann, T., Leroux, M. R., Grein, K., Shevchenko, A., Schiebel, E., and Hartl, F. U. (1999) *EMBO J* **18**, 75-84
50. Hansen, W. J., Cowan, N. J., and Welch, W. J. (1999) *J. Cell Biol.* **145**, 265-277
51. Martin-Benito, J., Gomez-Reino, J., Stirling, P. C., Lundin, V. F., Gomez-Puertas, P., Boskovic, J., Chacon, P., Fernandez, J. J., Berenguer, J., Leroux, M. R., and Valpuesta, J. M. (2007) *Structure*. **15**, 101-110
52. Hansen, W. J., Cowan, N. J., and Welch, W. J. (1999) *J. Cell Biol.* **145**, 265-277

53. Siegers, K., Waldmann, T., Leroux, M. R., Grein, K., Shevchenko, A., Schiebel, E., and Hartl, F. U. (1999) *EMBO J* **18**, 75-84
54. Sheets, L., Ransom, D. G., Mellgren, E. M., Johnson, S. L., and Schnapp, B. J. (2007) *Curr. Biol.* **17**, 1721-1734
55. Geething, N. C. and Spudich, J. A. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 21518-21528
56. Westbroek, W., Lambert, J., Bahadoran, P., Busca, R., Herteleer, M. C., Smit, N., Mommaas, M., Ballotti, R., and Naeyaert, J. M. (2003) *J Invest Dermatol.* **120**, 465-475
57. Geething, N. C. and Spudich, J. A. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 21518-21528
58. Martin-Benito, J., Boskovic, J., Gomez-Puertas, P., Carrascosa, J. L., Simons, C. T., Lewis, S. A., Bartolini, F., Cowan, N. J., and Valpuesta, J. M. (2002) *EMBO J.* **21**, 6377-6386
59. Siegers, K., Waldmann, T., Leroux, M. R., Grein, K., Shevchenko, A., Schiebel, E., and Hartl, F. U. (1999) *EMBO J* **18**, 75-84
60. Zinsmaier, K. E. and Bronk, P. (2001) *Biochem. Pharmacol.* **62**, 1-11
61. Dunker, A. K., Oldfield, C. J., Meng, J., Romero, P., Yang, J. Y., Chen, J. W., Vacic, V., Obradovic, Z., and Uversky, V. N. (2008) *BMC. Genomics* **9 Suppl 2**, S1

Figure 1

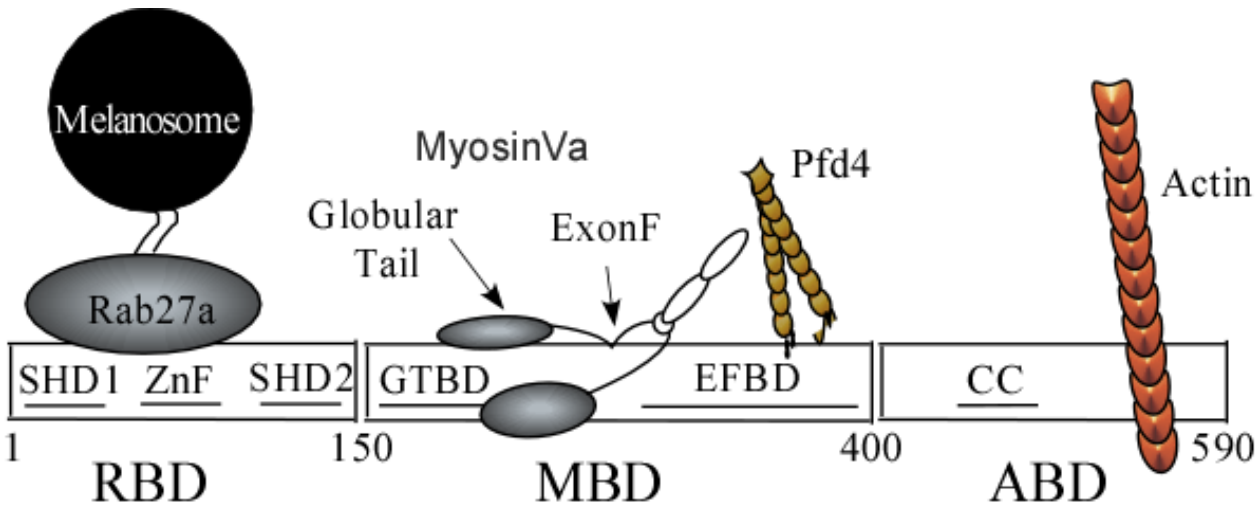


Figure 2

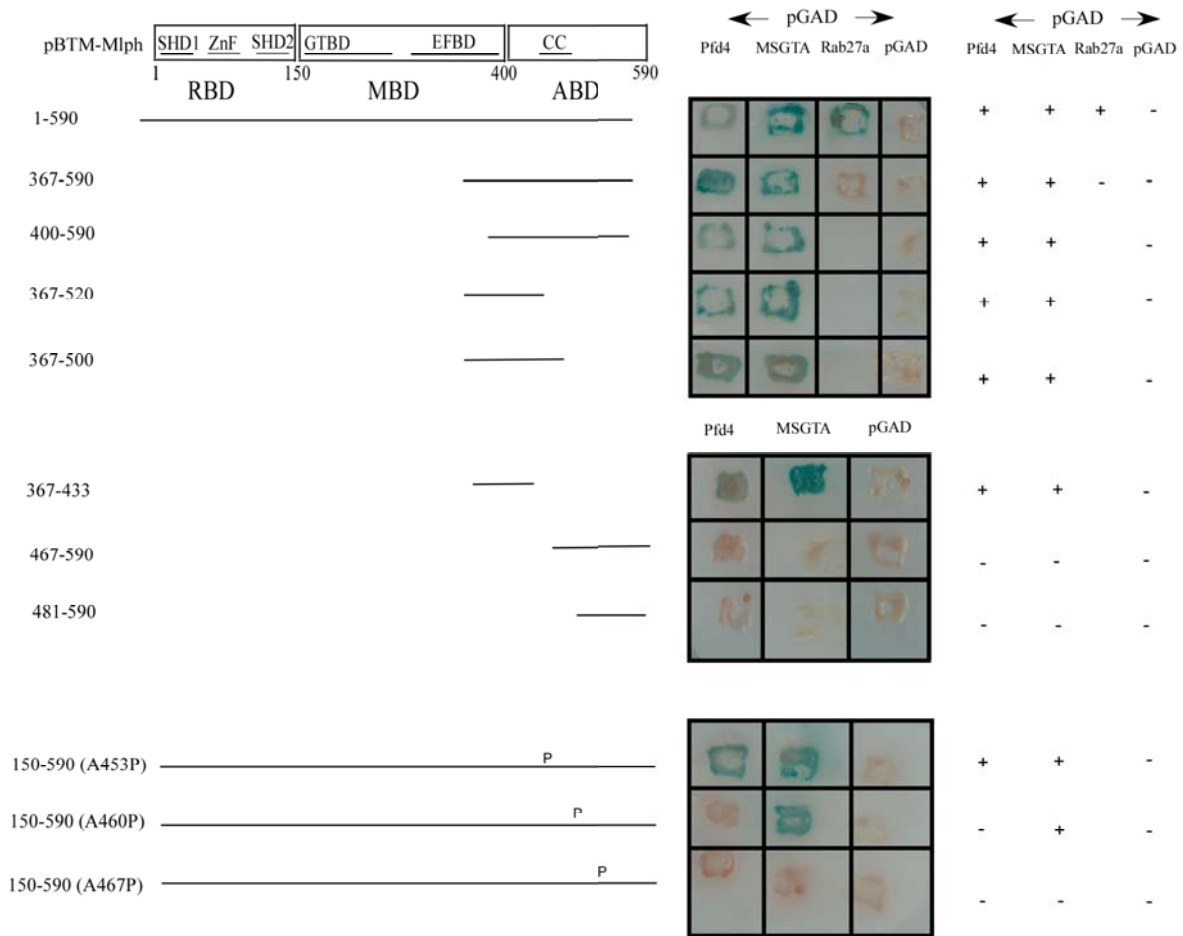


Figure 3

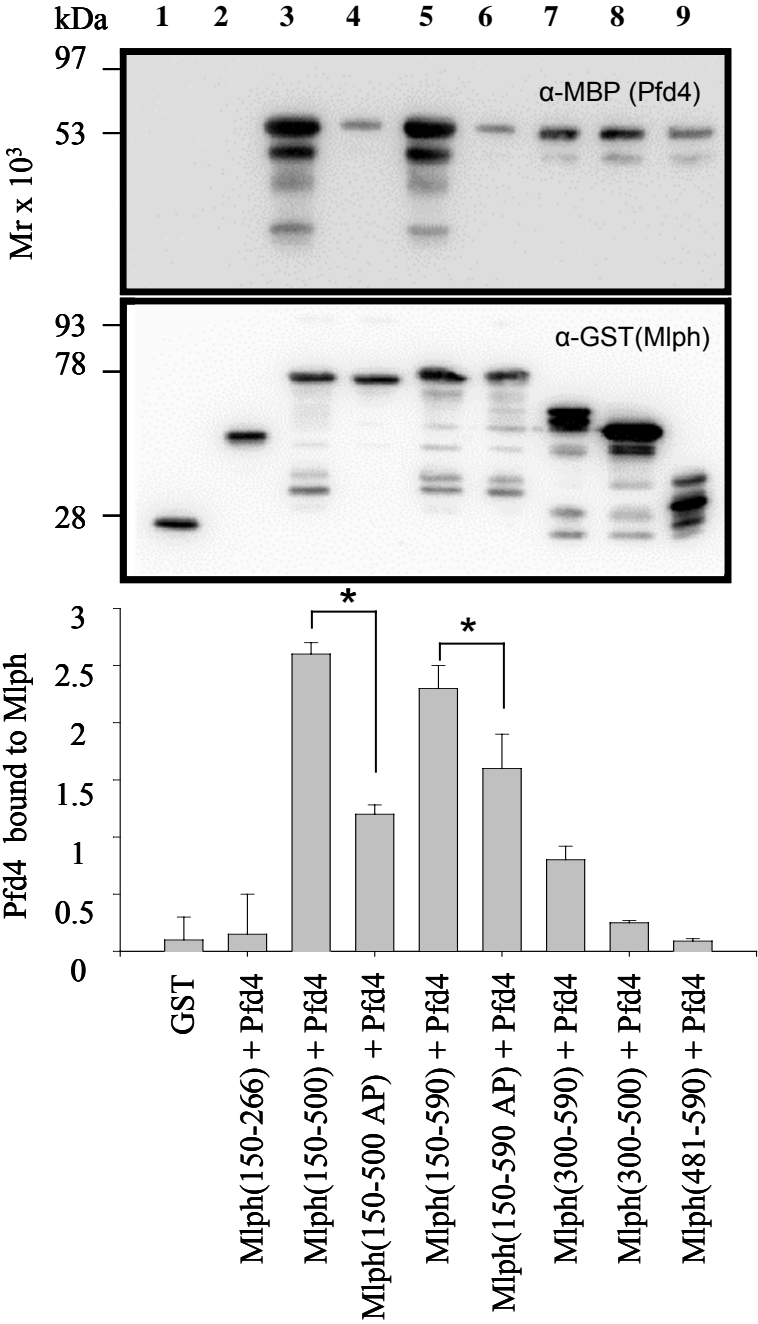


Figure 4

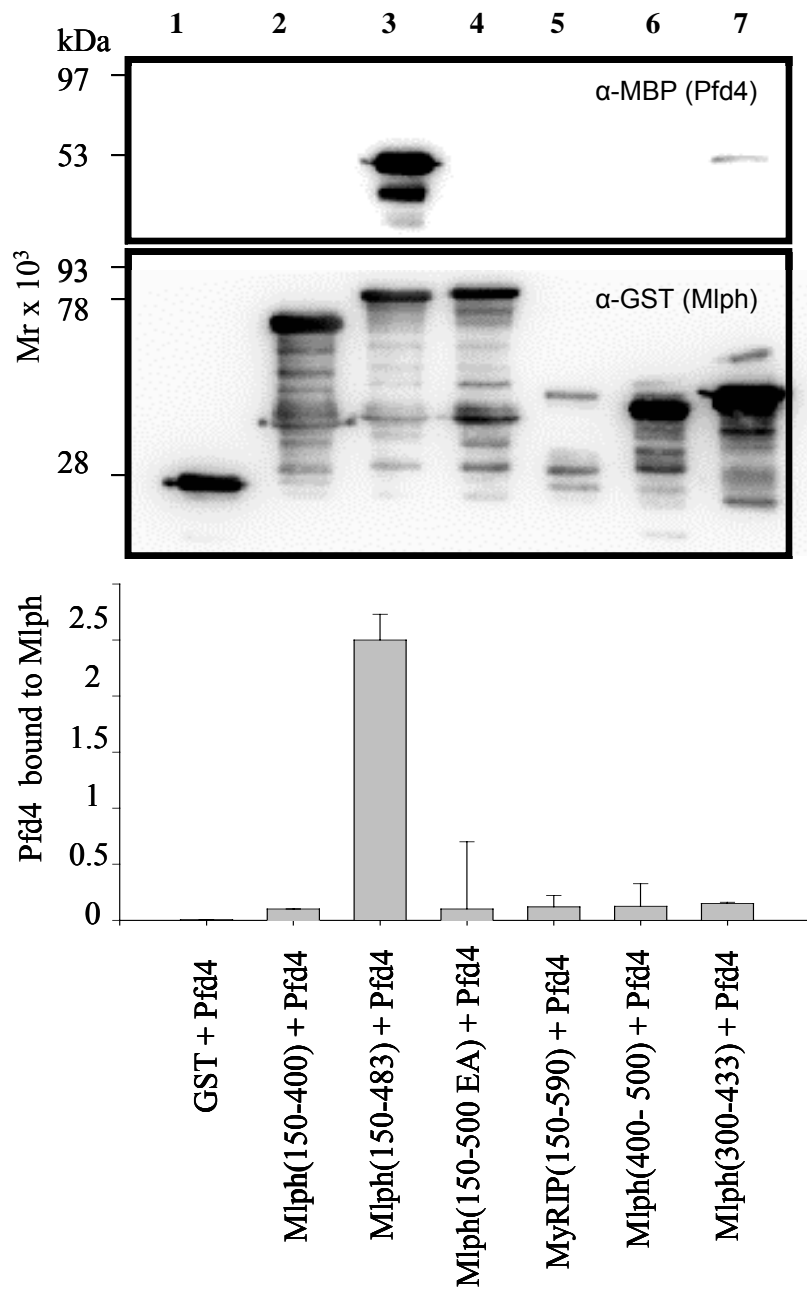


Figure 5

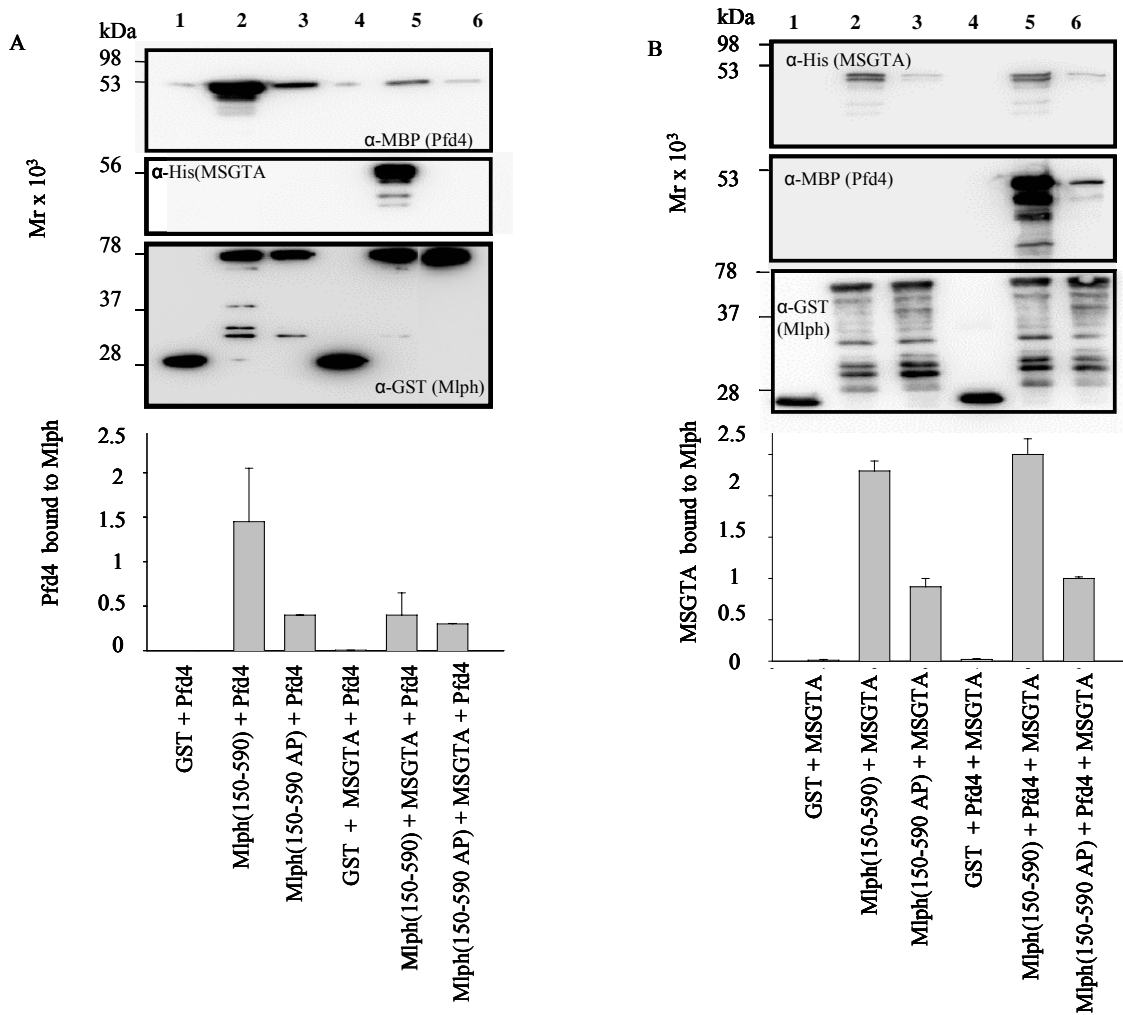


Figure 6

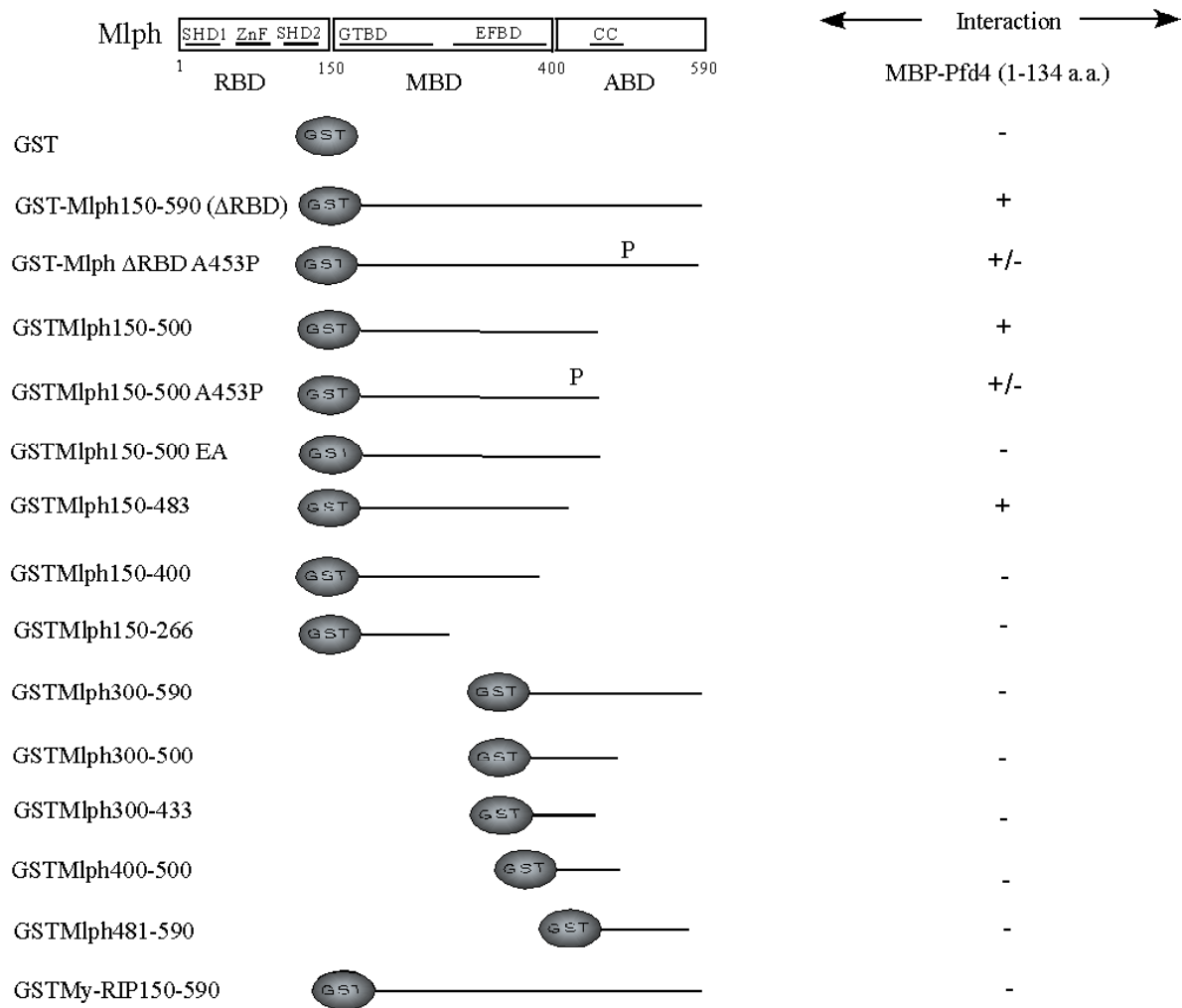


Figure 7

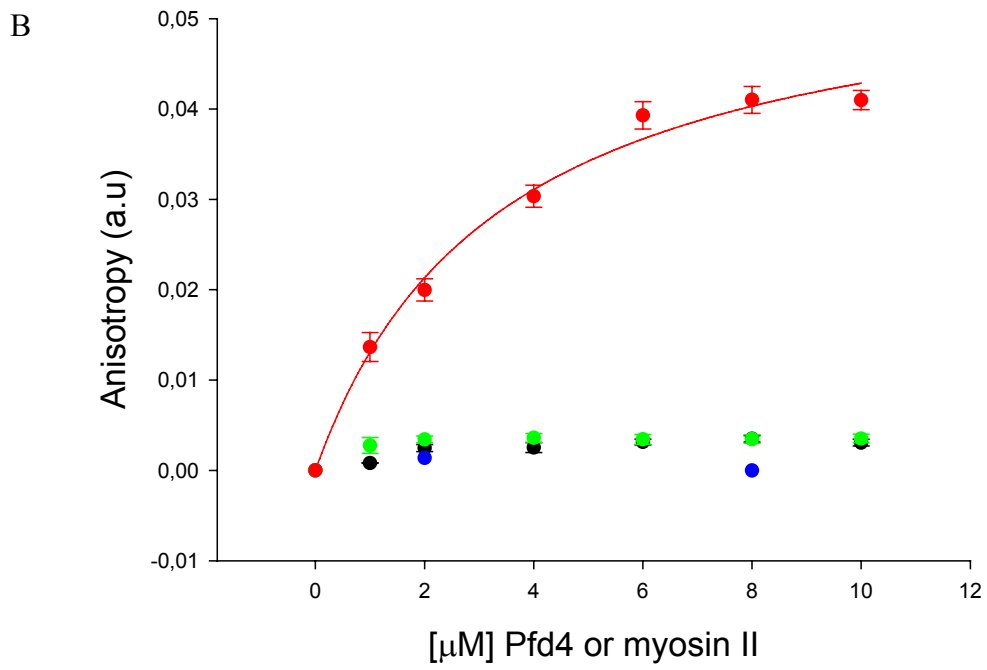
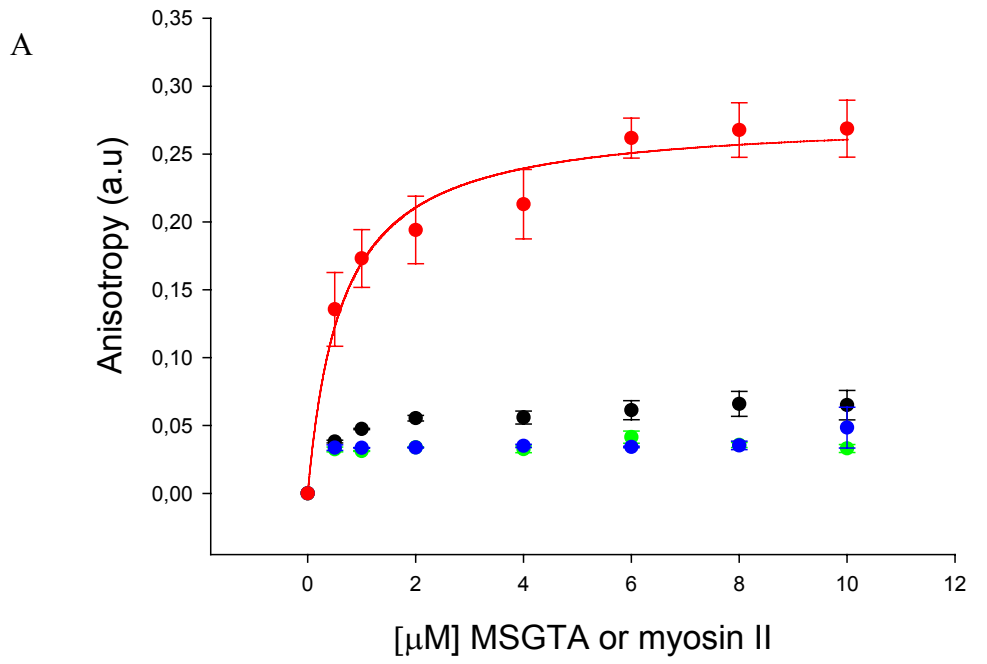


Figure 8

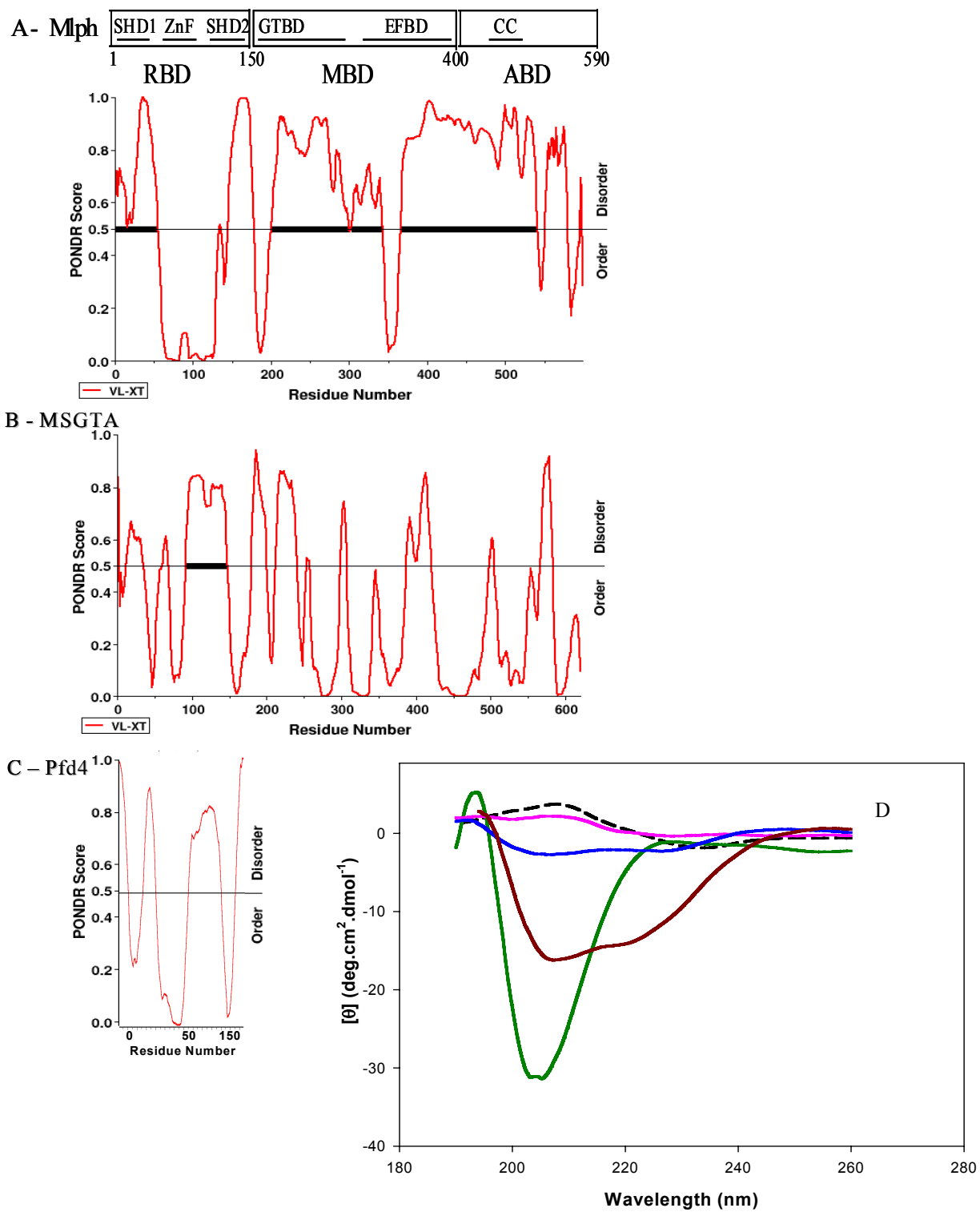


Figure 9

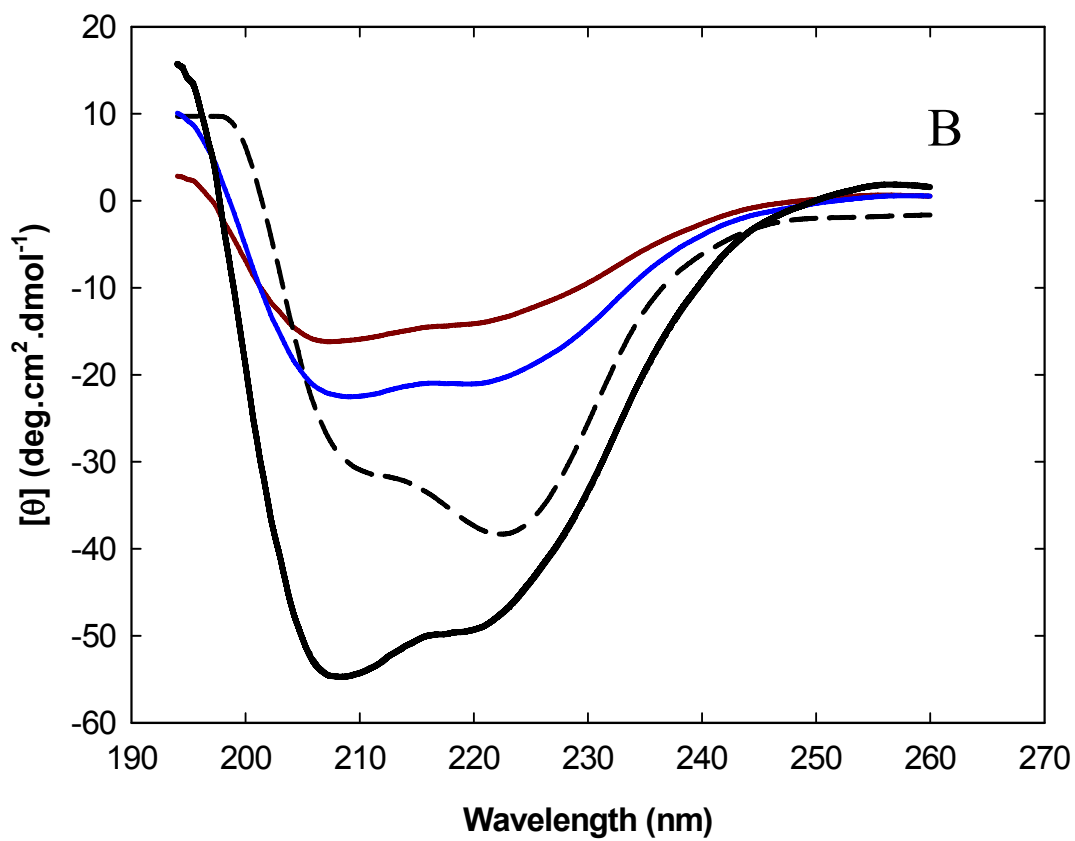
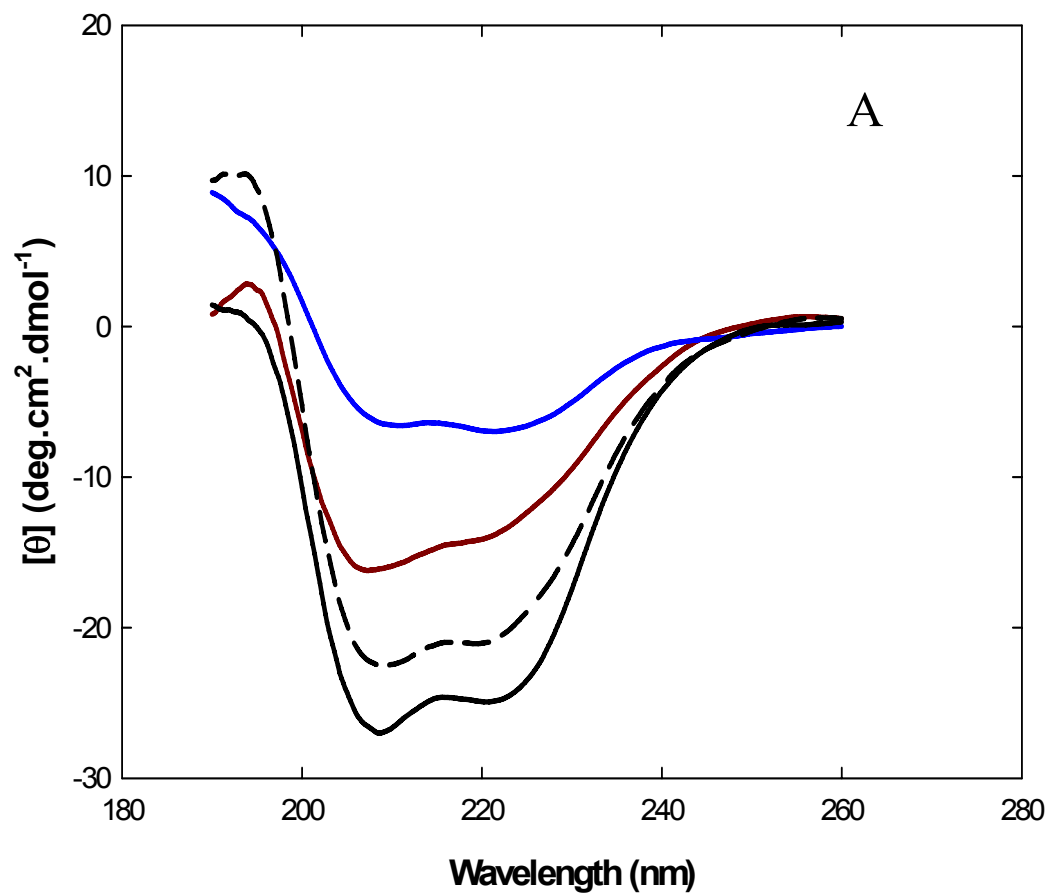
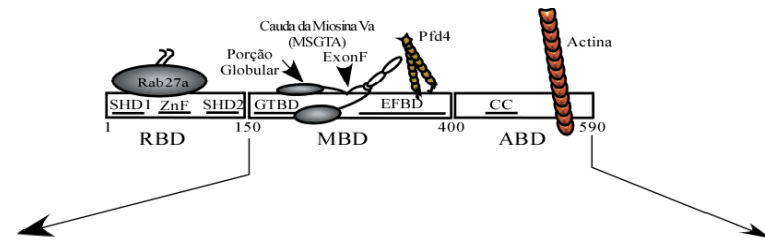


Figure 10



150
SEFSLEEGNG DSEQTDEEDGD LDTEARDQPL

190 200 210 220 230 240
NSKKKKRLLS FRDVF**FEEDS** DHLV**QPCSQT** LGLSSVPESA HSLQSLSGEP YSEDTT**SLEP**

250 260 270 280 290 300
EGLEETGARĀ LGCRPSPEVQ PCSPLPSG**ED** AHAE**LDSPAĀ** SCKSAFGTTĀ MPGTDDV**RGK**

310 320 330 340 350 360
HLPSQYIADV DTS**EDDSIQ** FRAASQHSKR RARTVPETQ**I** LELNKRMSAV EHLLVHLE**NT**

370 380 390 400 410 420
VLPPSAQEPT**** VETHPSADT**E** EETLRRR**LEE** LTSN**ISGSST** SSEDE**TKPDG** TFLGGSPK**VC**

430 440 450 460 470 480
TDTGHMETQE**** RNPRSPGN**PĀ** RPTKSTDEE**L** SEMEDRVAM**T** ASEV**QQAESE** ISD**IESRIAĀ**

490 500 510 520 530 540
LRAAGLTVKF**** SGKPRRKSG**I** PIFLPRVTEK LDR**IPKTPPĀ** DPDDQAKMPK AT**TA**VPSL**LR**

550 560 570 580 590
RKYSPSSQG**V** DSGSEDRKS**V** YRGS**L**TQRNP NRRRG**TARHĪ** FAK**P**VMA**QQP**

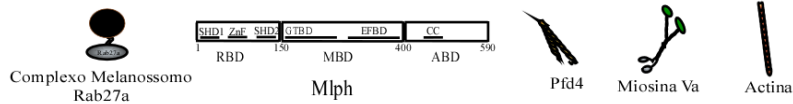
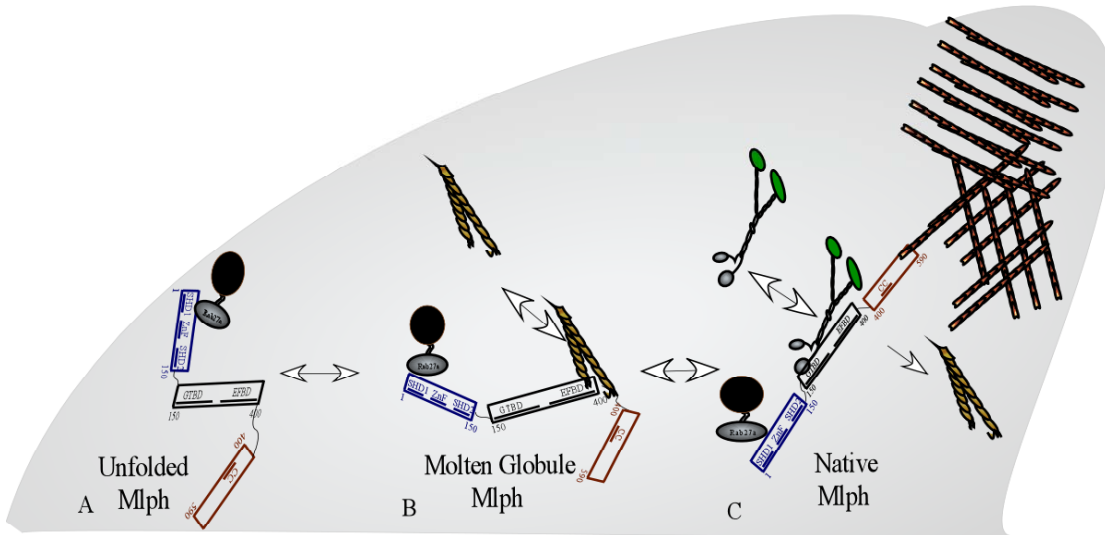


Figure 1. Schematic representation of domain structure of Mlph showing the regions previously shown to be involved in interaction with other proteins. Note that the Pfd4 binding domain (Pfd4BD, 150-483 a.a.) overlaps the myoVa binding domain (MBD, 150-400 a.a.) and the putative coiled-coil (429-468 a.a.) of the actin binding domain.

Figure 2. Yeast two-hybrid β -galactosidase assay to determine the ability of Mlph to interact with Pfd4, and role of the putative coiled-coil region. L40 yeast was transformed with plasmids indicated at left as described in Materials and Methods. Transformed yeast were cultured for 3 days on -His-Leu-Trp plates and transferred to a nitrocellulose membrane. Yeast were lysed by incubation in liquid nitrogen and assayed for β -galactosidase activity. Production of a blue colony indicates interaction between the bait protein (pBTM-Mlph constructs) and prey proteins (pGAD-Pfd4 or pGAD-MSGTA).

Figure 3. Interaction between truncated Mlph proteins and Pfd4. One hundred picomoles of the indicated GST-Mlph protein was incubated with 100 picomoles of MBP-Pfd4 in the presence of glutathione-Sepharose beads as described in Materials and Methods. Bound proteins were pelleted, eluted from the beads, and subjected to immunoblotting using anti-GST and anti-MBP antibodies. The bands were quantified by chemiluminescence using a scanner with Aida software and relative binding (histogram) was calculated by dividing the band intensity of MBP-Pfd4 by the band intensity of GST-Mlph. Experiments were carried out in triplicate. The migration of the molecular-weight standards is indicated to the left of each blot.

Figure 4. Interaction between truncated Mlph proteins and Pfd4. One hundred picomoles of the indicated GST-Mlph or GST-MyRip protein was incubated with 100 picomoles of MBP-Pfd4 in the presence of glutathione-Sepharose beads as described in Materials and Methods. Bound proteins were pelleted, eluted from the beads, and subjected to immunoblotting using anti-GST and anti-MBP antibodies. The bands developed by chemiluminescence were quantified as

described for Figure 3. Experiments were carried out in triplicate. The migration of the molecular-weight standards is indicated to the left of each blot.

Figure 5. (A) Competition experiments between MSGTA and Pfd4 for binding to truncated Mlph proteins. (B) Reverse competition experiments between Pfd4 and MSGTA for binding to truncated Mlph proteins. One hundred picomoles of the indicated GST-Mlph protein was pre- incubated with 100 picomoles of His-MSGTA in the presence of glutathione-Sepharose beads and 30 min later MBP-Pfd4 was added, as described in Materials and Methods. Bound proteins were pelleted, eluted from the beads, and subjected to immunoblotting using anti-GST, anti-His and anti-MBP antibodies. The bands were quantified by chemiluminescence as described for Figure 3. Experiments were carried out in triplicate. The migration of the molecular-weight standards is indicated to the left of each blot.

Figure 6. Summary of interaction of different constructs of GST-Mlph with MBP-Pfd4 in pull-down assays of Figures 3 and 4.

Figure 7. The C-terminal region of Mlph is crucial for recruiting MyoVa and Pfd4. Fluorescein-tagged Mlph (10 μ M) binds to MyoVa (A, red) and Pfd4 (B, red) qualitatively in the same way. Anisotropy measurements show strong interaction of Mlph 150-590 a.a. with and MyoVa (A) or Pfd4 (B). There is no interaction with Mlph 400-590 a.a. (black) Mlph 150-590A453P (green) and Mlph150-590 a.a. does not react with myosin II (blue).

Figure 8. Predictors of Naturally Disordered Regions (*PONDR*) analysis of mouse melanophilin (A). Note that melanophilin contains long (≥ 40 a.a.) segments of predicted disorder, including most of the Pfd4 and myosin Va binding domain (indicated with thick black bars). Exceptions are seen in the N- and C-terminal parts which seem structured. (B) MSGTA and (C) Pfd4 seem to be well structured *in-silico*. (D) Circular dichroism spectra of different GST-Mlph constructs. Mlph150-590 a.a. (brown), Mlph150-400 a.a. (blue) Mlph300-590 a.a. (pink) and Mlph150-590A453P (green). The C-terminus of Mlph alone (Mlph300-590 a.a.) and with a point mutation

A453P (Mlph150-590A453P) loses its native structure. GST has an essentially random structure (dashed black).

Figure 9. CD spectra of different Mlph constructs and their complexes. (A) The spectra of Mlph 150-590 a.a (brown) and MSGTA (blue) alone are compared with the spectrum for the binary complex (black) and with the theoretical spectrum composed of the sum of the other two others (dashed line). The more negative ellipticity of the complex indicates a gain in structure (principally in α -helix). (B) The binary complex formed from the individual constructs Mlph 150-590 a.a (brown) and Pfd4 (blue) is clearly much more structured than either protein alone or the theoretical sum of the two partners (dashed line). Each protein was added to a final concentration of 10 μ M.

Figure 10. (A) Schematic representation of Mlph 1-590 a.a. and the amino acid composition of its central part and C-terminal regions (Mlph Δ RBD). 62 % (Bold residues) of this region is composed of amino acids found in unstructured and unstable proteins regions. (B) Possible role of Pfd4 and the Mlph C-terminal region in melanosome transport (A) Unfolded Mlph binds to Pfd4 with low affinity and high specificity, (B) molten globule Mlph recruits myosin Va and folds into a more compact structure. (C) Structured Mlph is able to bind to actin via its ABD and attach the melanosome at the melanocyte periphery.

Curriculum Vitae

Renato Fernandes de Paulo
Data de Nascimento: 20/04/1979
Naturalidade: Rio de Janeiro

Formação acadêmica/Titulação

- 2005 - 2009 Doutorado em Química Biológica
Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Brasil.
com período sanduíche em Faculty of Medicine - Imperial College
London(Orientador:Miguel Seabra).
Título: Melanofilina, Prefoldina 4 e Miosina Va, parceria para o correto
enovelamento durante o transporte vesicular, *Ano de Obtenção:* 2009.
Orientador: Martha Sorenson.
- 2002 - 2005 Mestrado em Química Biológica
Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Brasil.
Título: Estudo cinético do 2,4 Dinitrofenol em miosina II. Efeitos dos análogos
de ATP e Pi na atividade NTPásica, *Ano de Obtenção:* 2005.
Orientador: Martha. M. Sorenson.
- 1997 - 2001 Graduação em Fisioterapia .
Universidade Estácio de Sá, UNESA, Brasil.

Orientação de estudante

1. Luciana Monnerat de Faria. Papel da Prefoldina no transporte na regulação do transporte de melanossomos.. Início: 2008. Iniciação científica (Graduando em Fisioterapia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro. (Orientador).
2. Ana Pessoa. Prefoldina (PFD4), um novo parceiro da miosina 5a no transporte de melanossomos em melanócitos. Início: 2008. Iniciação científica (Graduando em Fisioterapia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. (Orientador).
3. Moema Rodrigues. Prescrição de atividade física para gestantes. 2005. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Educação Física) - Universidade Federal do Rio de Janeiro. Orientador: Renato Fernandes de Paulo.

Resumos publicados

1. DE PAULO, Renato Fernandes ; HUME, A.N ; PINTO, Verônica Salerno ; Seabra, M.C ; SORENSON, Martha M . Prefoldin 4 (PFD4): A putative new partner of myosin Va (MyoVa) in melanosome transport. In: Biophysical Society 2009, Boston. Biophysical Journal, 2009. v. 96. p. 141a-141a.
2. Redenschi, E.P ; Reynaldo, D. P ; DE PAULO, Renato Fernandes ; D., Castro, ; SORENSON, Martha M . Effects of Methylglyoxal on Skeletal Muscle Myosin and Isolated Myofibrils.. In: XXXVIII Brazilian Biochem. Soc., 2009, Águas de Lindoia.
3. DE PAULO, Renato Fernandes ; HUME, A.N ; SORENSON, Martha M ; Seabra, M.C . The role of Prefoldin 4 in melanosome transport.. In: XXXVII Brazilian Biochem. Soc., 2008, Águas de Lindoia.
4. DE PAULO, Renato Fernandes ; HUME, A.N ; SORENSON, Martha M; Seabra, M.C . The role of melanophilin in the transport of melanosomes. In: International Symposium: Cell Motility, Molecular Motors and the Cytoskel. Rio de Janeiro, Brazil., 2006.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)