

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I**



**ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE PROTEÍNAS REGULADORAS  
DE GTPASAS DE LA SUPERFAMILIA RAS MEDIANTE  
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR:

**Ernesto Arias Palomo**

BAJO LA DIRECCIÓN DE:  
**Óscar Llorca Blanco**

**Madrid**

Universidad Complutense de Madrid

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I  
Facultad de Ciencias Químicas



**Análisis estructural de proteínas reguladoras  
de GTPasas de la superfamilia Ras mediante  
microscopía electrónica**

Tesis Doctoral



Ernesto Arias Palomo

Madrid, 2008

Universidad Complutense de Madrid

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I  
Facultad de Ciencias Químicas



Memoria presentada para optar  
al grado de Doctor por

**Ernesto Arias Palomo**

Esta tesis ha sido realizada en el Centro de Investigaciones  
Biológicas (CSIC) bajo la dirección del Dr. Óscar Llorca Blanco





# Índice

1. Introducción.....	4
1.1 La superfamilia de GTPasas Ras.....	6
1.2 Factores intercambiadores de nucleótidos.....	10
1.3 El factor intercambiador de nucleótidos Vav3 .....	13
1.4 Syk, función y regulación.....	18
1.5 Epac2, un factor intercambiador de nucleótidos dependiente de cAMP.....	25
1.6 Microscopía electrónica y reconstrucción tridimensional de partículas individuales .....	31
2. Objetivos .....	35
3. Resultados .....	38
3.1 Cambios conformacionales globales regulan la activación del factor intercambiador de nucleótidos Vav3 .....	39
3.2 Estructura 3D de la quinasa Syk resuelta mediante microscopía electrónica de partículas individuales .....	68
3.3 Estructura de Epac2 en complejo con un análogo del AMP cíclico y Rap1B .....	78
Anexo al Capítulo 3.3.....	94
4. Discusión.....	108
4.1 Microscopía electrónica y procesamiento digital de imágenes de especímenes de tamaño pequeño .....	109
4.2 La activación de Vav3 es regulada mediante interacciones intramoleculares .....	110

<i>4.3 La conformación auto-inhibida de Syk es distinta a la de las quinasas de la familia Src y similar a la de Zap-70</i> .....	114
<i>4.4 El cAMP induce la activación de Epac2 mediante el desplazamiento de su región reguladora</i> .....	115
<i>4.5 Epílogo</i> .....	117
<b>5. Conclusiones</b> .....	120
<b>6. Bibliografía</b> .....	123

# Introducción

# 1. Introducción

Todas las células perciben señales de su entorno que modulan procesos como su proliferación, diferenciación, migración o muerte. Estas señales pueden venir de moléculas solubles, de moléculas que conforman la matriz extracelular o a través del contacto directo con otras células, y son recibidas por receptores específicos celulares. La activación de estos receptores inicia multitud de rutas de señalización. Se ha realizado un gran esfuerzo en el estudio de estas rutas para ahondar en el conocimiento de su función celular y porque su mal funcionamiento está ligado a numerosas enfermedades. Gracias a estos trabajos cada vez se tiene más claro que la transducción de la señal no ocurre de manera lineal, desde los receptores hasta sus respuestas celulares específicas, sino que existe una vasta interconexión entre distintas rutas de señalización. Muchas de las moléculas que forman parte de esta densa red son proteínas modulares que poseen una regulación compleja. En el desarrollo de esta tesis se ha estudiado la estructura y regulación de tres de estas proteínas, involucradas en las rutas de señalización de la superfamilia Ras. Se trata de:

- Vav3- Factor intercambiador de nucleótidos (GEF, *Guanine nucleotide exchange factor*) que activa a proteínas pertenecientes a la familia de GTPasas (GTP hidrolasas) Rho.
- Syk (*Spleen tyrosine kinase*)- Proteína tirosín quinasa responsable, entre otras cosas de la fosforilación y activación de Vav.
- Epac2 (*Exchange protein directly activated by cyclic AMP*)- Es un GEF, al igual que Vav3, que intercambia nucleótidos de guanina a proteínas de la familia de GTPasas Ras.

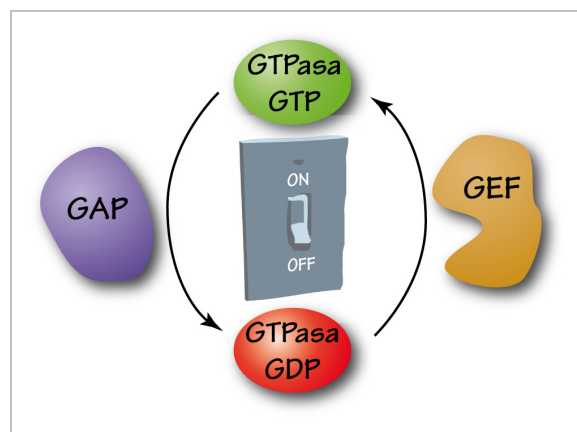
## 1.1 La superfamilia de GTPasas Ras

Las proteínas de la superfamilia Ras, también llamadas GTPasas pequeñas, forman un grupo independiente dentro de las GTP hidrolasas. Actúan como nodos que son activados por rutas de señalización convergentes que se inician debido a distintas señales extracelulares. Una vez activadas, estas proteínas son capaces de regular múltiples cascadas de señalización. En humanos, esta superfamilia de proteínas Ras está compuesta por unos 150 miembros que tienen en común un dominio de unión a GTP (Bourne et al., 1990; Wennerberg et al., 2005). Se puede dividir en al menos cinco familias atendiendo a la similitud de su secuencia y su función:

- Ras (*Ras sarcoma*). Involucrada en regulación de la expresión génica, apoptosis, proliferación, diferenciación y morfología celular (Takai et al., 2001).
- Rho (*Ras homologous*). Participan en la reorganización de los filamentos de actina, regulación del ciclo celular y de la expresión génica (Etienne-Manneville y Hall, 2002).
- Rab (*Ras-like proteins in brain*). Controlan el transporte vesicular y el tráfico de proteínas entre distintos orgánulos (Zerial y McBride, 2001).
- Arf (*ADP-ribosylation factor*). Regulan el tráfico vesicular (Memon, 2004).
- Ran (*Ras-like nuclear*). Implicadas en el transporte nucleocitoplasmático de RNA y proteínas (Weis, 2003).

### Ciclo de regulación

A estas GTPasas también se les denomina interruptores moleculares debido a que oscilan entre dos estados, activo e inactivo, en función de si están unidas a GTP o a GDP respectivamente (Vetter y Wittinghofer, 2001). El paso de un estado a otro se produce de manera muy lenta, por lo que necesitan ser catalizados por otras proteínas. Los GEFs (*Guanine nucleotide exchange factors*) favorecen el intercambio de GDP por GTP, activando a la GTPasa, mientras que los GAPs (*GTPase activating proteins*) estimulan su actividad hidrolasa intrínseca, provocando su inactivación (Bos et



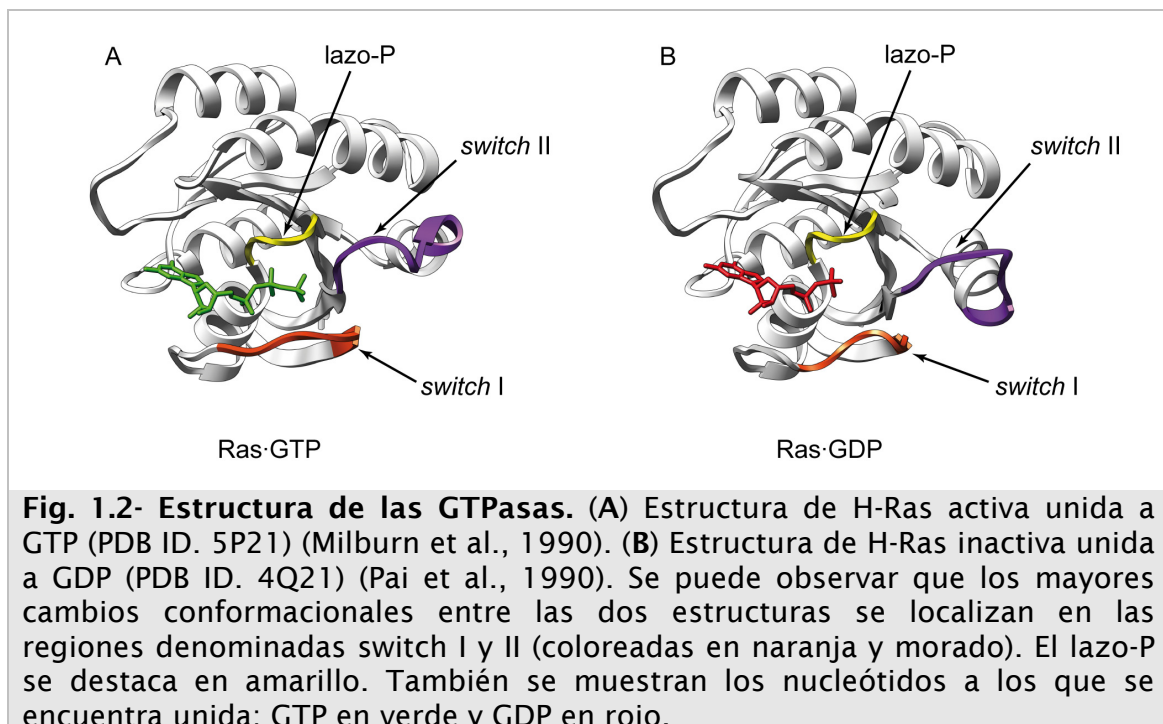
**Fig. 1.1- Ciclo de las GTPasas.** Las GTPasas oscilan entre dos estados: activo (coloreado en verde) e inactivo (en rojo) dependiendo si están unidas a GTP o a GDP respectivamente. Los GEFs catalizan el intercambio de nucleótido produciendo la activación y las GAPs estimulan la hidrólisis de GTP a GDP induciendo la inactivación.

al., 2007) (**Fig. 1.1**). Algunas GTPasas como Rho y Rab son reguladas adicionalmente por un tercer tipo de proteínas, los GDIs (*Guanine nucleotide dissociation inhibitors*), que enmascaran los grupos isoprenilo y retienen a las proteínas inactivas en el citosol (Olofsson, 1999; DerMardirossian y Bokoch, 2005).

### Estructura de las GTPasas de la superfamilia Ras

Las GTPasas Ras son proteínas monoméricas de pequeño tamaño, alrededor de 20 kDa. Los distintos miembros de la familia comparten entre un 30 y un 50 % de identidad en la secuencia, y todas ellas poseen el motivo consenso responsable de la unión e hidrólisis del GTP (Valencia et al., 1991). Las mayores diferencias entre la estructura activa e inactiva se localizan en unas regiones denominadas *switch I* y *switch II* que envuelven al fosfato  $\gamma$  del GTP (Jurnak, 1985; la Cour et al., 1985) (**Fig 1.2**). Los cambios conformacionales que ocurren en la región *switch I* son especialmente relevantes para la unión de los efectores, ya que provoca que la estructura activa tenga una alta afinidad por ellos (Bishop y Hall, 2000; Repasky et al., 2004). Otra zona a destacar es la denominada lazo-P que interacciona con los fosfatos  $\alpha$  y  $\beta$  (**Fig 1.2**).

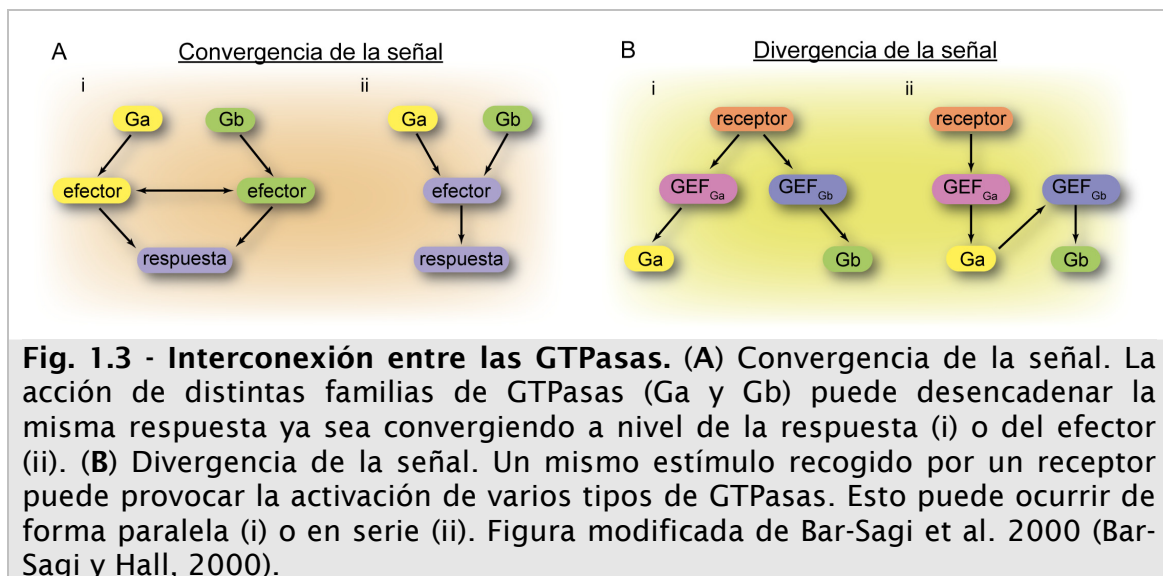
Una característica importante de la mayoría de estas proteínas es que son modificadas post-traduccionalmente por lípidos (Casey et al., 1989). Estas modificaciones son esenciales para favorecer la asociación con la membrana y para determinar su localización subcelular. Algunas enzimas que llevan a cabo esta función son dianas de tratamientos antitumorales (Winter-Vann y Casey, 2005).



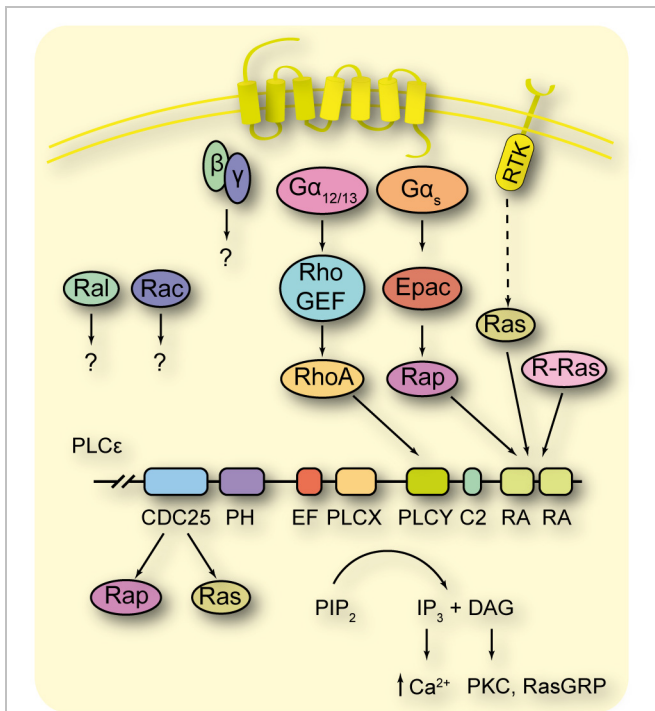
## Las rutas de señalización controladas por distintas familias de GTPasas están interconectadas

Recientemente se ha observado que existe una rica y compleja interconexión entre los distintos miembros de la superfamilia Ras (Mitin et al., 2005), produciéndose un diálogo fluido en diversos puntos a lo largo de las rutas de señalización en las que están implicadas estas GTPasas. Los mecanismos moleculares que median esta interconexión se pueden clasificar en dos grupos (Bar-Sagi y Hall, 2000) (**Fig. 1.3**):

- Convergencia de la señal: Las señales surgidas a partir de distintas GTPasas pueden converger en los mismos efectores (**Fig. 1.3A**), como ocurre en el caso de la cascada de la ERK MAP quinasa, que es activada tanto por Ras como por Rac (Frost et al., 1996; King et al., 1998; Chaudhary et al., 2000). Otro ejemplo que ilustra la complejidad de este tipo de interconexión es el de la fosfolipasa PLC $\epsilon$  (Seifert et al., 2004) (**Fig. 1.4**). Su actividad se regula, a través de su dominio RA, por varias moléculas incluidas: H-Ras (Kelley et al., 2001), TC21/R-Ras2 (Murphy et al., 2002), Rap1A y Rap 2B (Song et al., 2002). Otras GTPasas pequeñas (RalA, RhoA y Rac1), así como las GTPasas heterotriméricas G $\alpha_{12}$ , G $\alpha_s$  y G $\beta\gamma$ , estimulan la actividad de la fosfolipasa PLC $\epsilon$  de una manera independiente de su dominio RA (Lopez et al., 2001; Wing et al., 2001; Kelley et al., 2004).



- Divergencia de la señal: Una misma señal puede dar lugar a la activación simultánea de varias GTPasas pertenecientes a distintas familias (**Fig. 1.3B**). En este caso el papel de los GEFs es determinante, como refleja el hecho de que exista un mayor número de estos que de GTPasas. Esto permite que una misma señal active a distintas GTPasas dependiendo del tipo celular y del contexto biológico. Un ejemplo de activación paralela (**Fig. 1.3B**, i) es la activación simultánea de Ras y de Rac de forma independiente descrita en varios casos, como al adicionar insulina a un cultivo de fibroblastos (Ridley et al., 1992), tras la



**Fig. 1.4- Activación de PLCε.** La activación de PLCε es un claro ejemplo de la convergencia de la acción de varias GTPasas sobre un mismo efector. Figura modificada de Mitin et al. 2005 (Mitin et al., 2005).

estimulación del FCεRI en mastocitos (Turner et al., 1998) o del TCR (*T cell receptor*) en linfocitos (Holsinger et al., 1998). Una de las formas en la que ocurre esta activación paralela es mediante la asociación de varios GEFs a un receptor. Siguiendo con el último ejemplo, en linfocitos, Sos (un GEF de Ras) y Vav (un GEF de Rac), se asocian al TCR gracias a ZAP-70, una tirosín quinasa de la familia Syk (Salojin et al., 2000). Adicionalmente Syk está involucrada en la activación y asociación de los complejos multiprotéicos que se forman tras la adhesión de las integrinas a moléculas de la matriz extracelular (Miranti et al., 1998), suceso

que también induce la activación simultánea de Ras y de Rac (Schlaepfer et al., 1994; Clark et al., 1998; Price et al., 1998). Las GTPasas también pueden activarse en serie, de manera que la acción de una de ellas puede desencadenar la acción de otra (Fig. 1.3B, ii). Esta activación puede ocurrir dentro de la misma familia de GTPasas, como en el caso de Rho; Cdc 42 es un potente activador de Rac, mientras que se ha descrito que Rac puede activar o inhibir a Rho (Ridley et al., 1992; Nobes y Hall, 1995; Sander et al., 1998). Estas interacciones pueden aparecer entre miembros de distintas familias de GTPasas. En este tipo de interconexión los GEFs son también actores fundamentales. Dos ejemplos paradigmáticos son los de Sos y Ras-GRF, dos GEFs que tienen la capacidad de intercambiar nucleótidos tanto a GTPasas de la familia Ras como de la familia Rho (Fan et al., 1998; Nimnual et al., 1998). Otro ejemplo de activación en serie lo vemos en Ras-GTP, que es capaz de unir y localizar a Epac2 (GEF de Rap) en la membrana plasmática restringiendo espacialmente su actividad (Li et al., 2006). También se han descrito conexiones entre las familias de GTPasas Rap y Rho tras la adhesión mediada por integrinas a la matriz extracelular. Esta unión desemboca en la activación de Rap (Bos, 2005; Kooistra et al., 2007), y Rap-GTP es capaz de interactuar con Vav2 localizándolo en las zonas de adhesión celular. Vav2, a su vez, actúa sobre Rac1 induciendo la reestructuración de los filamentos de actina. De esta manera Rap1 promueve la migración celular localizando determinados GEFs de la

familia Rho en los sitios donde debe producirse la formación de lamelipodios (Arthur et al., 2004).

En resumen, cada vez parece más claro que para comprender una determinada respuesta celular en la que estén implicadas estas GTPasas, no deben pasarse por alto las interacciones que se producen entre sus distintos miembros. Los GEFs se han revelado como unos de los principales responsables de esta interconexión, actuando como reguladores, efectores e integrando las rutas de señalización de esta superfamilia de proteínas.

## 1.2 Factores intercambiadores de nucleótidos (GEFs)

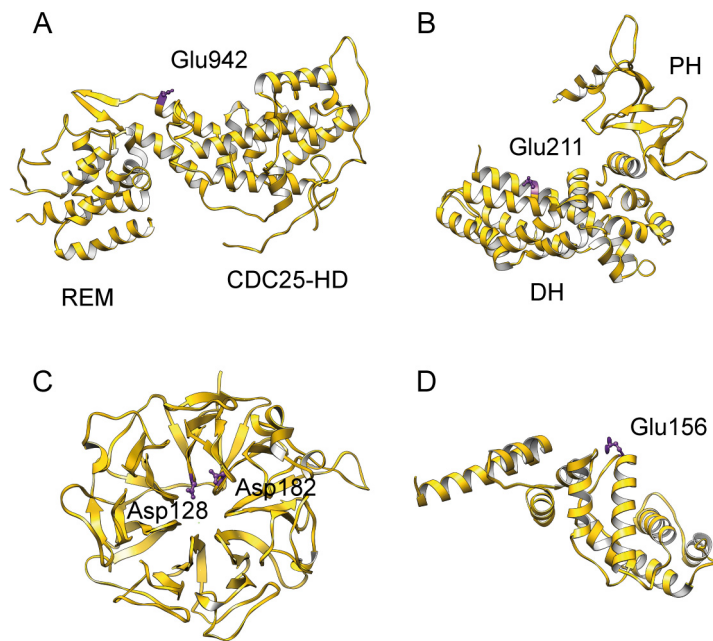
La afinidad de la mayoría de las GTPasas pequeñas por el GTP o por el GDP está en el rango de nanomolar a picomolar, esto hace que la media de tiempo que tarda un nucleótido en disociarse sea de una o más horas. Los GEFs son los responsables de catalizar esta reacción de manera que la respuesta biológica se produzca en pocos minutos (Vetter y Wittinghofer, 2001).

### Los dominios GEFs se agrupan en familias estructuralmente no relacionadas

El gran número existente de GTPasas requiere una multitud de GEFs para asegurar la especificidad en las rutas de señalización. Existen varias familias de dominios GEFs con secuencias y estructuras completamente distintas (Cherfils y Chardin, 1999) (**Fig. 1.5**). Así, los dominios CDC25-HD (*CDC25 homology domain*) actúan conjuntamente con un dominio REM (*Ras exchange motif*) para intercambiar nucleótidos a la familia Ras (**Fig. 1.5A**). Los GEFs que regulan a la familia Rho contienen un dominio DH (*Dbl homology*) y un dominio PH (*Pleckstrin homology*) en tandem (**Fig. 1.5B**), aunque recientemente se ha encontrado otro dominio no relacionado con los anteriores en las proteínas DOCK. Los miembros de la familia Arf son activados por proteínas que contienen un dominio Sec7 (**Fig. 1.5C**). Ran interacciona con proteínas que posean un dominio propulsor- $\beta$  como el presente en RCC1 (**Fig. 1.5D**). Por último, hay varios dominios intercambiadores de la familia Rab: Vps9, Sec2 y Mss4-like. Cada familia de GEF actúa sobre una familia específica de GTPasas y no existe reactividad cruzada con las otras familias.

### Regulación y naturaleza modular de los GEFs

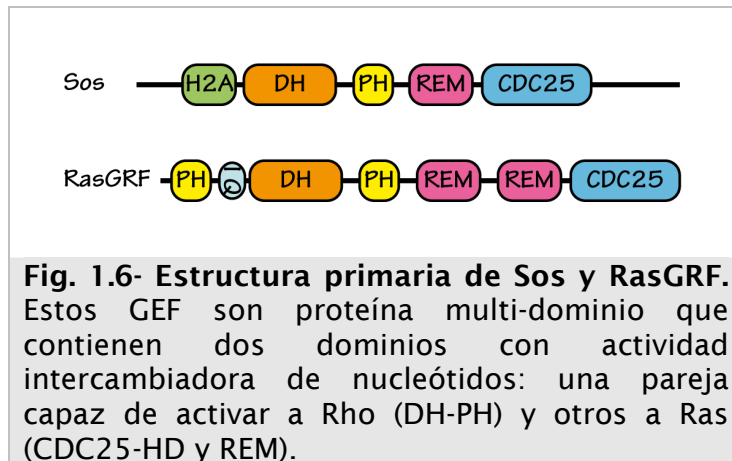
Puesto que los GEFs activan a las GTPasas, la actividad de estos se encuentra, a su vez, específicamente regulada mediante distintos mecanismos: interacción proteína-proteína o proteína-lípido, unión a segundos mensajeros y modificación post-traducciona. Estas



**Fig. 1.5- Estructura de dominios GEFs.** Los dominios GEFs, representados aquí en color amarillo, pueden tener estructuras muy distintas. Se han destacado las cadenas laterales en color morado de algunos residuos críticos para la catálisis que comparten su naturaleza ácida. (A) Estructura del tandem REM-CDC25-HD de Sos (PDB ID. 1BKD), (Boriack-Sjodin et al., 1998). (B) Dominios DH-PH de Sos (PDB ID. 1DBH), (Soisson et al., 1998). (C) Estructura del tipo propulsor- $\beta$  de RCC1 (PDB ID. 1A12), (Renault et al., 1998). (D) Dominio Sec7 de ARNO (PDB ID. 1PBV), (Cherfils et al., 1998). Figura modificada de Cherfils et al. 1999 (Cherfils y Chardin, 1999).

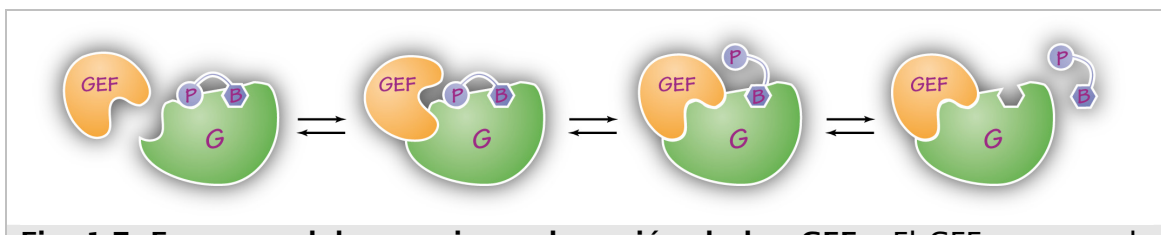
interacciones y modificaciones inducen uno o más de los siguientes cambios: translocación a un compartimento celular específico donde se localiza la GTPasa, liberación de la auto-inhibición producida por un dominio contiguo o la inducción de cambios alostéricos en el dominio catalítico.

Los GEFs normalmente son proteínas multi-dominio que pueden estar formadas por varios tipos de dominios distintos, muchos de ellos presentes de manera habitual en distintas proteínas relacionadas con señalización intracelular. Es frecuente encontrar dominios implicados en la interacción con lípidos o con otras proteínas, que sirven para la localización espacial de las señales o como andamiaje para la formación de complejos proteicos. En algunos casos se da la coexistencia de distintos dominios GEF o GAP en la misma proteína, siendo esta una de las formas de conectar distintas rutas de señalización. Se mencionó el ejemplo de Sos y RasGRF en la introducción de las GTPasas (Bar-Sagi y Hall, 2000). Estos GEFs, que poseen una regulación muy compleja, contienen, entre otros, los dominios capaces de activar a Ras (CDC25-HD y REM) y a Rho (DH-PH) (Fig. 1.6), produciendo la conexión entre las rutas de señalización reguladas por estas GTPasas (Fan et al., 1998; Nimnual et al., 1998).



### Mecanismo general de la función activadora de los GEFs

Se han realizado varios estudios que permitan concluir que el mecanismo de acción de los GEFs es muy parecido en todos ellos a pesar de que sus estructuras son muy diferentes (Boriack-Sjodin et al., 1998; Goldberg, 1998; Worthylake et al., 2000; Renault et al., 2001; Itzen et al., 2006). Los GEFs deforman la estructura del *switch* I, del *switch* II y del lazo P (Fig. 1.2) perturbando el sitio de unión de los fosfatos, dejando la región de unión de la base prácticamente sin alterar. Como consecuencia, los grupos fosfato son liberados en primer lugar tras la interacción con el GEF, mientras que la base es lo primero que se une cuando el nucleótido comienza a desplazar al GEF (Bos et al., 2007) (Fig. 1.7). La afinidad de las GTPasas por el GTP y el GDP es bastante similar y los GEFs no favorecen específicamente la unión de ninguno de los dos. La razón por la que en condiciones fisiológicas el GTP desplaza al GDP, produciendo así la activación de la proteína, es que en el citoplasma la concentración de GTP es unas diez veces superior a la del GDP.



**Fig. 1.7- Esquema del mecanismo de acción de los GEFs.** El GEF se une a la GTPasa formando un complejo ternario. Esta interacción desestabiliza el sitio de unión de los grupos fosfato del nucleótido provocando su liberación. La reacción es completamente reversible, siendo la base nitrogenada la región del nucleótido que antes se une a la GTPasa. La unión del nuevo nucleótido produce el desplazamiento del GEF. Figura modificada de Bos, 2007 (Bos et al., 2007).

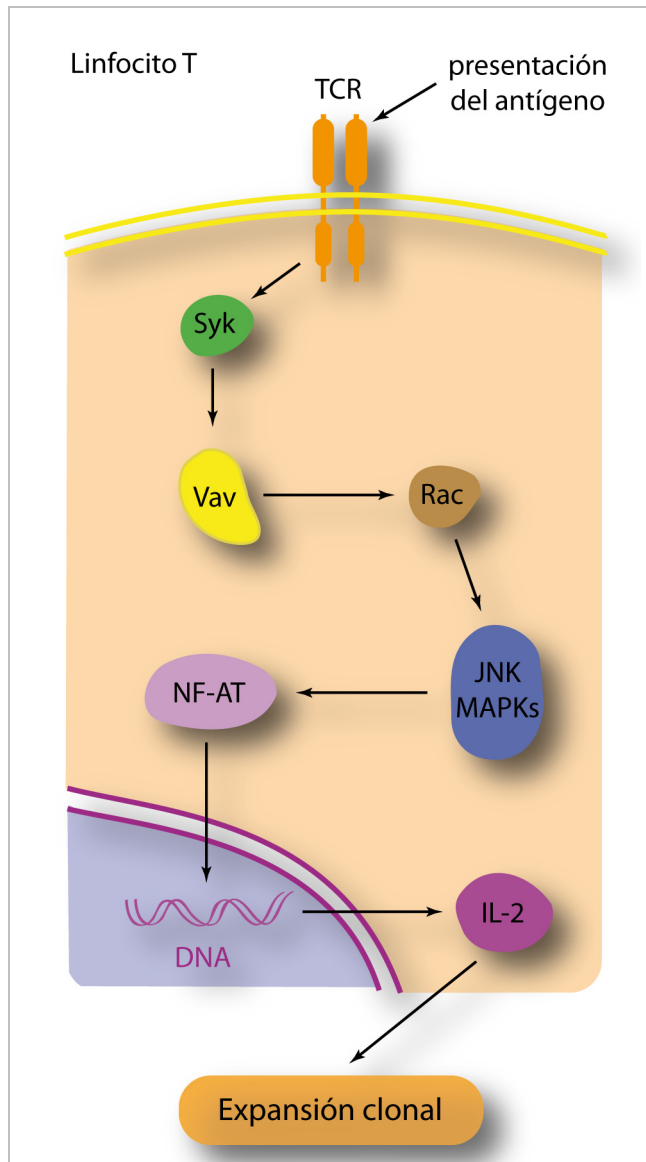
### 1.3 El factor intercambiador de nucleótidos Vav3

En 1989, Shulamit Katzav trabajaba en el laboratorio de Mariano Barbacid investigando la presencia de oncogenes en tumores, cuando identificó la existencia de un nuevo oncogén al que se bautizó con el nombre de la sexta letra del alfabeto hebreo, Vav (ו), por ser el sexto oncogén descubierto en dicho laboratorio (Katzav et al., 1989). Desde entonces se han encontrado representantes de Vav desde nematodos a mamíferos. En vertebrados, la familia Vav está formada por tres miembros: Vav1, Vav2 y Vav3. Vav1 se expresa preferentemente células hematopoyéticas, mientras que Vav2 y Vav3 muestran un patrón de expresión más amplio (Katzav et al., 1989; Movilla y Bustelo, 1999). El presente estudio se ha llevado a cabo con Vav3 debido a que en su purificación se obtenía un mayor rendimiento y a que mostraba una mayor estabilidad que los otros miembros de la familia, si bien las tres proteínas poseen una secuencia muy similar.

#### **Función bioquímica y biológica.**

Las proteínas Vav pertenecen a la familia de GEFs Dbl, que actúan sobre miembros de la familia de GTPasas Rho (Crespo et al., 1997; Schuebel et al., 1998; Movilla y Bustelo, 1999; Zheng, 2001), aunque se ha descrito que la acción de Vav es capaz de activar otras rutas de señalización como la de Ras (Caloca et al., 2003; Zugaza et al., 2004) y la regulada por Rap (Caloca et al., 2004). Vav está involucrada en la remodelación del citoesqueleto y en oncogénesis (Bustelo, 2000), como pone de manifiesto el hecho de que Vav1 se encuentre sobreexpresada en la mayoría de las células pancreáticas tumorales debido a la desmetilación de su promotor (Fernandez-Zapico et al., 2005). Cabe destacar el papel que desempeña esta proteína en el sistema inmune, ya que la eliminación de su gen afecta seriamente al correcto desarrollo de este sistema de defensa y provoca que los linfocitos B y T no respondan a las agresiones con una respuesta apropiada (Bustelo, 2000). Estudiando estos tipos de celulares, los grupos de Tybulewicz y Orkin observaron que era la proliferación de los linfocitos T lo que se veía afectado por la eliminación de Vav, y que ello era debido a la ausencia de secreción de interleucina 2, molécula esencial para que se produzca la proliferación de estas células. Estos autores conseguían que las células volvieran a tener niveles de proliferación normales añadiendo interleucina 2 exógena al medio de cultivo (Tarakhovsky et al., 1995), de donde se desprende que la ausencia de Vav afecta a una ruta muy específica, la que va desde el receptor antigénico de las células T (TCR) hasta la síntesis y secreción de interleucina 2 (**Fig. 1.8**).

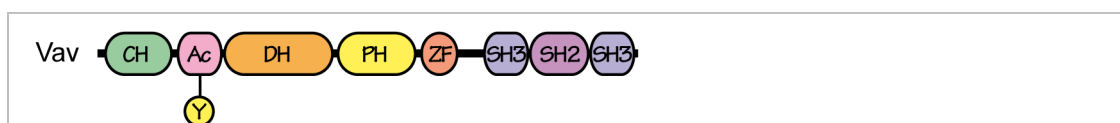
En el caso concreto de Vav3 se ha visto que sus niveles de expresión varían en cada momento del ciclo celular y que si se sobreexpresa se produce un bloqueo en la citoquinesis que conduce a la aparición de células multinucleadas (Fujikawa et al., 2002). También se ha relacionado con la osteoporosis a partir de la observación de que los osteoclastos deficientes en Vav3 ven menguada su capacidad de reabsorción ósea, lo que ha llevado a proponer a Vav3 como una diana potencial frente a esta dolencia (Faccio et al., 2005). Experimentos practicados con ratones deficientes en Vav3 revelaron que estos sufrían taquicardias, hipertensión y una remodelación masiva de su sistema cardiovascular, además de hiperactividad en las neuronas del sistema simpático. Todos estos factores desembocan en una pérdida progresiva de la homeostasis cardiovascular y renal (Sauzeau et al., 2006). Otros datos han mostrado que la expresión de Vav3 se incrementa durante la progresión de algunos cánceres de próstata (Dong et al., 2006; Lyons y Burnstein, 2006), relacionándola con tumorigénesis, y muy recientemente se ha descrito que se encuentra sobreexpresada en el 81 % de los cánceres de mama humanos (Lee et al., 2008b).



**Fig. 1.8- Cascada de señalización que desemboca en la producción de interleucina 2 (IL-2).** Cuando se presenta un antígeno correctamente al TCR, quinasas de la familia Src se encargan de fosforilar los motivos ITAMs (*Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*) presentes en el receptor, a los que se unen quinasas de la familia Syk. Esta proteínas fosforilan a Vav, lo que conduce a su activación y, por consiguiente, la de Rac1. Esta GTPasa desencadena la activación de la cascada de las quinasas JNK-MAPKs provocando la activación del factor de transcripción NF-AT que estimula la síntesis de interleucina 2. Posteriormente la interleucina 2 es secretada al medio provocando la proliferación de los linfocitos T.

## Estructura primaria de la familia de proteínas Vav

Las proteínas Vav poseen una masa molecular que oscila en torno a los 97 kDa y están formadas por ocho dominios (Tybulewicz, 2005) (**Fig. 1.9**). Los cinco primeros se han relacionado con la actividad intercambiadora de nucleótidos, mientras que a los tres últimos se les ha asignado la función de unión a otras proteínas (Tybulewicz et al., 2003). Se ha apuntado al primer dominio de Vav, el dominio CH (*Calponin homology*), como uno de los actores que participan en la auto-inhibición de la proteína debido a que su delección conlleva un aumento en la actividad (Zugaza et al., 2002). Seguidamente se encuentra la región ácida (Ac) que también contribuye a la auto-inhibición de la proteína, como se verá posteriormente, y que contiene una serie de tirosinas importantes para su regulación (Aghazadeh et al., 2000). A continuación se localiza el tandem DH-PH, característico de los GEFs de la familia Rho pertenecientes a la familia Dbl, cuya función es unirse a las GTPasas Rho/Rac y acelerar el intercambio de nucleótidos (Crespo et al., 1997; Han et al., 1997). Existen varias estructuras de dominios DH aislados como el de Trio (Liu et al., 1998) y Cool/PIX (Aghazadeh et al., 1998), que muestran un dominio alargado formado por un haz de hélices  $\alpha$  (**Fig. 1.5B**). Los dominios DH contienen tres regiones altamente conservadas (CR1, CR2 y CR3), que son las principales responsables de la unión y activación de la GTPasa, como evidencian las mutaciones producidas en estas regiones que ponen en compromiso la actividad catalítica. El hecho de que el dominio PH suceda siempre al dominio DH sugiere que este dominio PH realice la misma función en el contexto del tandem DH-PH, sin embargo se le han atribuido diversos papeles a estos dominios PH dependiendo del intercambiador de nucleótidos estudiado (Rossmann et al., 2005). En algunos GEFs interacciona directamente con la GTPasa y ayuda a realizar la catálisis, pero esto no ocurre en todos los casos. También se ha descrito que su función puede ser la de localizar subcelularmente a la proteína o regular su actividad gracias a la capacidad que tienen estos dominios de unir fosfolípidos (Hoffman y Cerione, 2002). En lo que concierne a Vav existe cierta controversia en este punto. Se han realizado estudios con Vav1 que describen que el fosfatidilinositol (3,4)-bi-fosfato (PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>) y el PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> estimulan la actividad, y que el PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> la inhibe (Han et al., 1998; Das et al., 2000), sin embargo, otros autores defienden que la actividad de Vav es independiente de la unión a lípidos (Zugaza et al., 2002). También se han resuelto varias estructuras de pares de dominios DH-PH,

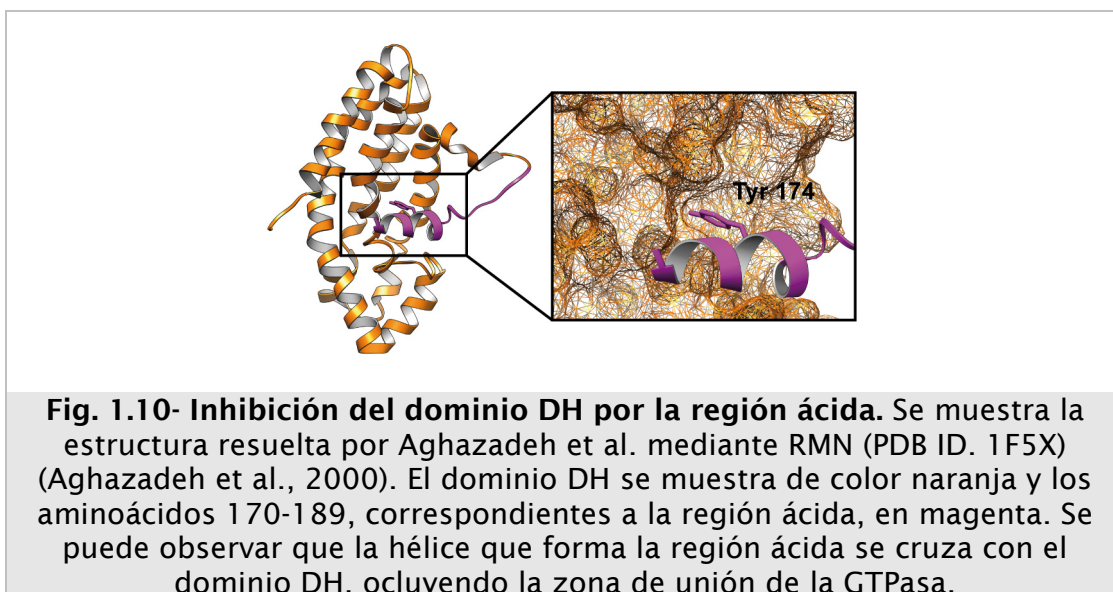


**Fig. 1.9- Estructura primaria de las proteínas Vav.** Los colores de los dominios son los mismos que los utilizados en el apartado 1 de Resultados. Se indica con una Y la localización de la principal tirosina que es fosforilada por Syk y que controla la activación de Vav.

algunos de ellos co-cristalizados con una GTPasa, como los de las proteínas: Sos (Soisson et al., 1998), Tiam1 (Worthylake et al., 2000) o Dbs (Snyder et al., 2002) entre otras. De todas estas estructuras se puede extraer que la orientación relativa de los dominios DH-PH puede variar en gran medida, así como el papel que desempeña el dominio PH en la catálisis. Los dominios ZF (*Zinc finger*) están presentes en múltiples proteínas de señalización. Se pueden dividir en dominios típicos, que se unen a lípidos, y dominios atípicos, que han perdido la capacidad de interactuar con ellos y lo hacen en cambio con otras proteínas (Colon-Gonzalez y Kazanietz, 2006). El dominio ZF de Vav pertenece a los dominios atípicos, lo que concuerda con su incapacidad de unir ésteres de forbol (Kazanietz et al., 1994). Se ha propuesto que tenga un papel en la actividad catalítica, ya que se ha observado que mutaciones en este dominio reducen la actividad de Vav (Booden et al., 2002; Zugaza et al., 2002; Heo et al., 2005). Por último encontramos la región C-terminal de Vav, que consiste en un dominio SH2 (*Src homology 2*) flanqueado por dos dominios SH3 (*Src homology 3*), que cumple una función adaptadora y de localización. Los dominios SH2 se unen péptidos que contengan una tirosina fosforilada mientras que los SH3 interactúan con regiones ricas en prolina. Esta zona C-terminal es la responsable de la interacción con otras proteínas implicadas en señalización celular como Grb2 (Ye y Baltimore, 1994), hnRNP-K (Bustelo et al., 1995) y Slp76 (Wu et al., 1996) entre otras.

### Regulación de la actividad de Vav

Las quinasas de la familia Syk y Src son las encargadas de llevar a cabo la fosforilación de la tirosina 174 (Tyr 174 en Vav1, Tyr 172 en Vav2 y Tyr 173 en Vav3), situada en la región ácida (Deckert et al., 1996; Han et al., 1997), que se traduce en la activación de la proteína (Crespo et al., 1997; Lopez-Lago et al., 2000). El el año 2000,



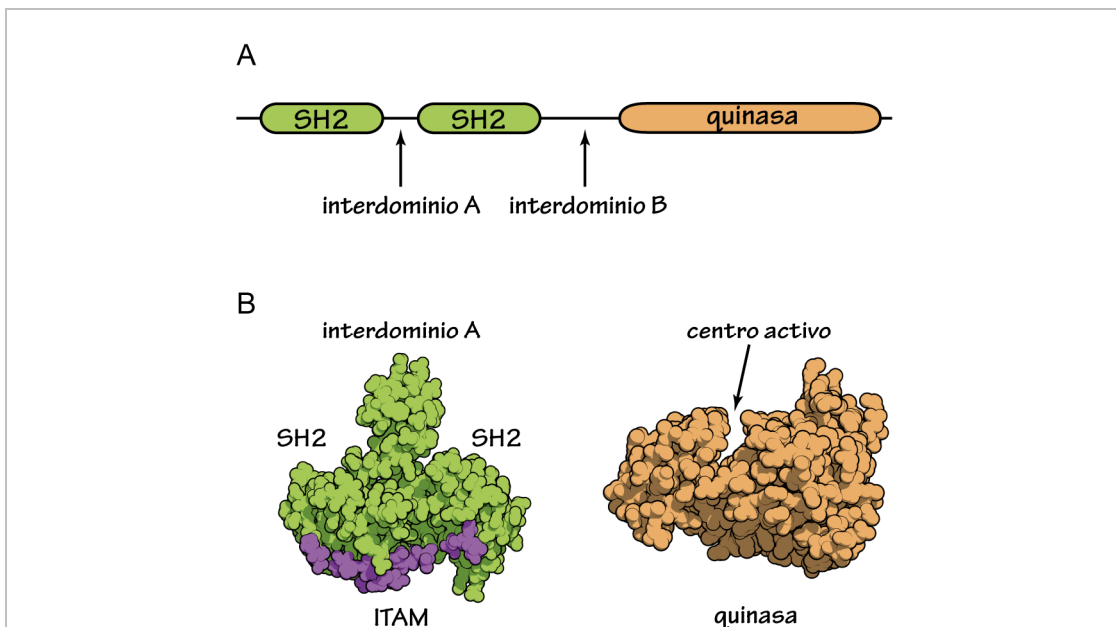
Aghazadeh publicó un trabajo fundamental en el que mostraba la estructura del dominio DH de Vav1, incluyendo los aminoácidos 170-189 de la región ácida, resuelta mediante RMN (Aghazadeh et al., 2000) (**Fig. 1.10**). En dicha estructura se puede observar que la tirosina 174 se sitúa en una hélice  $\alpha$  que enmascara el sitio de unión del dominio DH a la GTPasa substrato. La fosforilación de esta tirosina conduce a la pérdida de estructura y a la disociación de esta hélice del dominio DH, dando fin a la auto-inhibición. Este mecanismo de regulación se ve alterado cuando se eliminan los dominios amino-terminales de Vav, incluso cuando se conserva la región ácida intacta como en el caso del mutante  $\Delta 1-144$ . Estas mutaciones generan proteínas altamente oncogénicas cuyas actividades son independientes de fosforilación (Schuebel et al., 1998; Lopez-Lago et al., 2000; Zugaza et al., 2002), lo que parece indicar que la regulación de la activación del dominio catalítico en el contexto de la proteína completa es más compleja y que requiere la participación del dominio CH.

## 1.4 Syk, función y regulación

Las proteínas quinasas controlan multitud de respuestas celulares fosforilando a proteínas involucradas en expresión génica, metabolismo, crecimiento celular, diferenciación y apoptosis. Existen 518 secuencias de quinasas codificadas en el genoma humano (1,7 %), de las cuales se espera que 430 sean catalíticamente activas (Manning et al., 2002; Hanks, 2003). El subgrupo que cuenta con el mayor número de representantes, formado por 90 miembros, es el de las proteínas tirosín quinasas (Manning et al., 2002). Syk (*Spleen tyrosine kinase*), junto con Zap-70 (*Zeta (ζ) activated protein of 70 kDa*), constituyen una familia de tirosín quinasas que se caracteriza por poseer dos dominios SH2 (*Src homology 2*) adyacentes precediendo al dominio quinasa (Fig. 1.11 y del capítulo 2 de resultados Fig. 1A). Syk se detectó inicialmente como un fragmento proteolítico de 40 kDa derivado de una tirosín quinasa (p72) presente en bazo, timo y plumón (Zioncheck et al., 1988), y fue clonada por vez primera por Taniguchi en 1991 a partir de bazo porcino (Taniguchi et al., 1991).

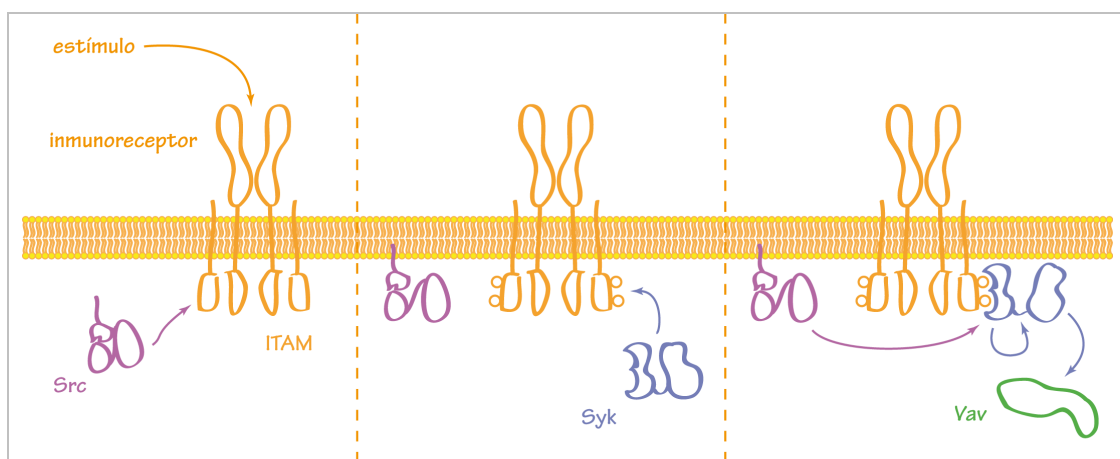
### Función biológica de Syk

El papel que la proteína Syk desempeña en las células del sistema inmune ha sido ampliamente estudiado (Sada et al., 2001), y la secuencia de eventos que conducen a la activación de Vav está bien establecida (Fig. 1.12). La estimulación de los receptores celulares (TCR,



**Fig. 1.11- Dominios de Syk.** (A) Estructura primaria de Syk. (B) Estructura terciaria de los dominios SH2 y el interdominio A unidos a un péptido ITAM difosforilado (en morado) (PDB ID. 1A81) (Futterer et al., 1998), y del dominio quinasa de Syk (PDB ID. 1XBA) (Atwell et al., 2004) resueltos mediante cristalografía y difracción de rayos X.

BCR y FcRs) produce la activación de quinasas pertenecientes a la familia Src, que fosforilan los motivos ITAM (*Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*) presentes en estos inmunoreceptores. Estos motivos se caracterizan por la presencia de dos tirosinas contenidas en una secuencia consenso: YxxI/Lx<sub>(6-12)</sub>YxxI/L (Underhill y Goodridge, 2007). Syk es ahora capaz de unirse a estos receptores doblemente fosforilados gracias a sus dominios SH2. Esta unión provoca la activación de Syk, ya sea por autofosforilación o por la acción de otras quinasas, lo que conduce a la fosforilación de sus dianas, entre las que se encuentra Vav (Chu et al., 1998). Vav necesita unirse directamente a esta quinasa, y lo hace a través de la interacción de su dominio SH2 con una tirosina fosforilada situada en la región que se localiza entre el dominio SH2 C-terminal y el quinasa de Syk, denominada interdominio B. La mutación de este residuo impide la asociación de Vav y su consecuente fosforilación (Deckert et al., 1996). La relación entre estas dos proteínas fuera del contexto de los inmunoreceptores también ha sido documentada. Syk es activada por la agrupación de integrinas que se produce tras la adhesión celular, y se ha revelado que algunas de las funciones que lleva a cabo las hace junto con Vav. Cuando se introdujo a las proteínas Vav se señaló que Vav3 es importante en la reabsorción ósea mediada por los osteoclastos. En ese mismo trabajo se destaca a Syk como el principal regulador de Vav3 en estas células. Miranti y colaboradores mostraron que estas dos proteínas causan la activación de JNK, ERK2, Akt y Cbl en células hematopoyéticas (Miranti et al., 1998), y también se ha observado en neutrófilos que la mutación de Vav1 y Vav3 compromete la migración celular que se desencadena en respuesta al estímulo de la integrina  $\beta 2$  (Gakidis et al., 2004; Schymeinsky et al., 2006).



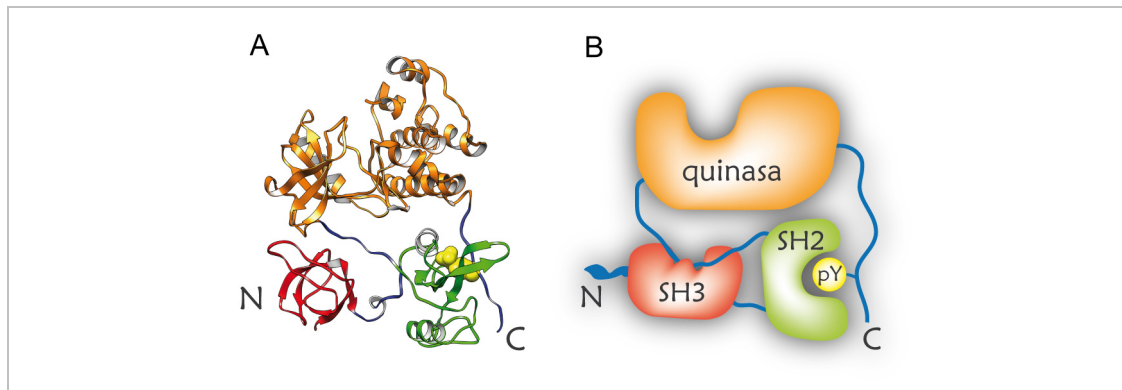
**Fig. 1.12- Activación de Syk y Vav.** La presentación de un estímulo adecuado conduce a la agrupación de los inmunoreceptores y a la activación de las quinasas de la familia Src. Estas proteínas son las responsables de fosforilar las secuencias ITAM de los receptores a las que se une Syk. En este momento, Syk puede ser fosforilada por las quinasas Src o por sí misma, completando su activación. Una vez activa, Syk se encarga de fosforilar a múltiples dianas entre las que se encuentra Vav.

Los primeros indicios de que Syk podía desempeñar alguna función fuera del sistema inmune vinieron con la observación de que los embriones de ratones homocigotos en mutaciones de esta proteína sufrían graves hemorragias y morían perinatalmente (Cheng et al., 1995; Turner et al., 1995). Abtahian y colaboradores se percataron de que estas hemorragias se producían porque los sistemas linfático y vascular no se diferenciaban correctamente durante el desarrollo (Abtahian et al., 2003). Desde entonces se ha descrito la expresión de Syk en múltiples tipos celulares: células epiteliales (Coopman et al., 2000), fibroblastos (Yamada et al., 2001), células del epitelio vascular (Inatome et al., 2001), hepatocitos (Tsuchida et al., 2000) y melanocitos (Hoeller et al., 2005). El rápido aumento del número de tipos celulares en los que se ha detectado la expresión de esta tirosín quinasa se ha visto acompañado por un incremento similar en el número de nuevas actividades descritas, como el control de la proliferación y de la división celular (Coopman et al., 2000), de la expresión génica (Wang et al., 2005) o de la diferenciación celular (Tsujimura et al., 2001) entre otras. Se ha relacionado a Syk con varias dolencias. Merece la pena subrayar su papel como supresor de tumores, cosa sorprendente en una tirosín quinasa. El primer caso fue descrito en cáncer de mama. Coopman y colaboradores detectaron la presencia de Syk en células sanas, sin embargo, en células tumorales sus niveles de expresión eran mucho menores. Además, la transfección de Syk a estas células tumorales reducía en gran medida el crecimiento y la metástasis del tumor (Coopman et al., 2000). También se ha observado una expresión anómala de Syk en cáncer gástrico (Wang et al., 2004), leucemia (Goodman et al., 2001) y melanomas (Hoeller et al., 2005). Pero Syk no sólo está implicada en cáncer sino que también lo está con otras afecciones como la artritis reumatoide (Bajpai et al., 2008), la alergia y el asma (Ulanova et al., 2005). Por tanto no es de extrañar que se estén realizando muchos esfuerzos para encontrar drogas que modifiquen la actividad de esta proteína (Hisamichi et al., 2005; Braselmann et al., 2006; Matsubara et al., 2006; Hirabayashi et al., 2008). Un ejemplo curioso descubierto recientemente es que la curcumina, un componente del curry, inhibe a Syk, suprimiendo la respuesta alérgica al impedir la activación de los mastocitos (Lee et al., 2008a).

## **Estructura y regulación de Syk**

Las secuencias de Syk y Zap-70 son muy parecidas aunque existen diferencias importantes. Se caracterizan por tener dos dominios SH2, comunes a muchas proteínas de señalización como se vio en el caso de Vav, separados por una zona denominada interdominio A (**Fig. 1.11** y del capítulo 2 de resultados **Fig. 1A**). Encontramos varias diferencias entre los dominios SH2 de Syk y Zap-70. En el caso de Syk sus dominios SH2 se unen a un motivo ITAM doblemente fosforilado, comportándose cada dominio como un modulo independiente (Futterer et al., 1998). Sin embargo Zap-70 necesita los dos dominios para unirse a una sola

tirosina fosforilada (Folmer et al., 2002). Adicionalmente se ha descrito que existe una flexibilidad conformacional entre los dominios SH2 de Syk que no se ha visto en Zap-70 (Futterer et al., 1998). El interdominio A adopta una estructura helicoidal y es clave en la regulación y función de la proteína como pone de manifiesto el que su delección provoque que no se produzca una respuesta adecuada tras la estimulación del BCR (Adachi et al., 2007). Recientemente se ha descrito que la fosforilación de la tirosina 130, situada en este dominio, provoca un cambio conformacional entre los dos dominios SH2 que imposibilita el reconocimiento simultáneo de las dos tirosinas fosforiladas presentes en los motivos ITAM (Zhang et al., 2008b). El interdominio B separa el tandem de dominios SH2 del quinasa. En el caso de Syk aparece una inserción de 23 aminoácidos que no se observa en Zap-70 y que es una de las mayores diferencias entre las dos proteínas. Esta diferencia correlaciona con una mayor afinidad de Syk por los motivos ITAM y con una transmisión de la señal desde los receptores más eficiente (Latour et al., 1998). En esta región reside la tirosina 342 que Deckert y colaboradores describieron como la responsable de la interacción con Vav, mediante la técnica de doble híbrido de levadura. Vav se une directamente a Syk por medio de su dominio SH2. Mutaciones en esta tirosina impiden que se produzca la unión y la consiguiente fosforilación de Vav (Deckert et al., 1996). Se ha resuelto la estructura del dominio SH2 de la PLC $\gamma$  unido a un péptido difosforilado de Syk por RMN (Groesch et al., 2006). El péptido pertenece a la región del interdominio B que contiene las tirosinas 342 y 346 fosforiladas. En este trabajo los autores describen que en el dominio SH2 de la PLC $\gamma$  se crean dos sitios de unión para tirosinas fosforiladas y que podría ocurrir lo mismo en el caso de Vav, siendo ésta una manera fina de modular la señalización. En la región C-terminal se dispone el dominio quinasa formado por dos lóbulos (**Fig. 1.11** y del capítulo 2 de resultados **Fig. 1A**), el lóbulo N-terminal que contiene cinco hebras  $\beta$  y una hélice  $\alpha$ , y un lóbulo C-terminal de mayor tamaño formado mayoritariamente por hélices  $\alpha$  (Atwell et al., 2004). Entre los dos lóbulos se forma una oquedad donde se aloja el ATP. Esta región bisagra confiere cierta flexibilidad necesaria para la catálisis y muy importante en la regulación (Huse y Kuriyan, 2002). Adicionalmente, en la proteína analizada en este trabajo nos encontramos en el extremo N-terminal la proteína de fusión GST (Glutación-S-Transferasa). Esta proteína de fusión fue utilizada por nuestros colaboradores para purificar Syk de células de insecto y no fue proteolizada al término de la purificación. El motivo por el que no se escindió fue el de incrementar la masa molecular de la proteína para favorecer su observación al microscopio electrónico y su posterior procesamiento (incrementa la masa molecular de 72 a 95 kDa). En trabajos realizados por otros autores se ha descrito que la presencia de esta proteína de fusión no altera ni la actividad biológica ni su capacidad de autofosforilación (Furlong et al., 1997; Yamamoto et al., 2003).

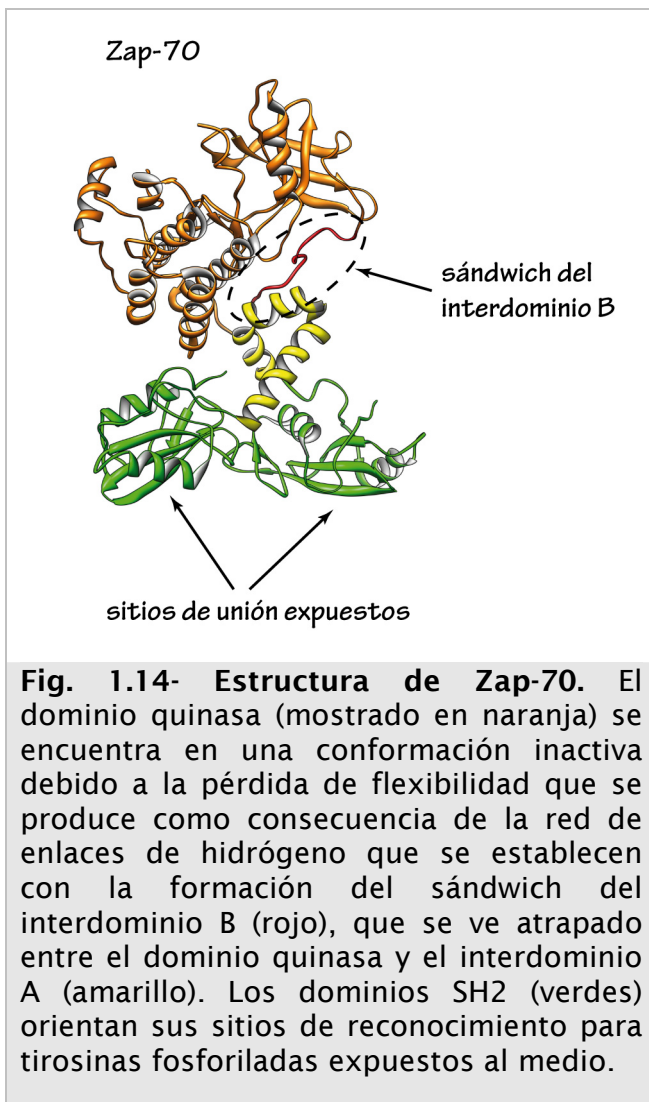


**Fig. 1.13- Regulación de la familia de tirosín quinasas Src.** (A) Estructura de la tirosín quinasa Src (PDB ID. 1FMK) (Xu et al., 1997). El dominio SH3 ha sido coloreado en rojo, el SH2 en verde, el quinasa en naranja y la tirosina fosforilada en amarillo. (B) Esquema de la estructura inhibida de Src. El código de colores es el mismo que el de A. El dominio SH3 se une a la región que conecta el dominio SH2 con el quinasa, mientras que el SH2 se une a una tirosina del extremo C-terminal cuando se encuentra fosforilada. Estas interacciones incrementan la rigidez del dominio quinasa, impidiendo que se produzca la catálisis.

Poco se conocía de la regulación, a nivel estructural, de la familia de tirosín quinasas Syk y de qué papel desempeñan los dominios SH2. Una posibilidad es que se comportase como la quinasa FAK (*Focal adhesion kinase*), en la que el dominio FERM impide el acceso del sustrato al sitio activo (Lietha et al., 2007). Otra opción sería que se produjera una inhibición análoga a la de Src, que a diferencia de Syk, no contiene dos dominios SH2 sino que un dominio SH3 y un dominio SH2 son los que acompañan al dominio quinasa. En estas proteínas los dominios reguladores vuelven sus sitios de unión hacia el dominio quinasa y reconocen dianas intramoleculares. Concretamente el dominio SH3 se une a una secuencia contenida en el lazo que conecta el dominio SH2 con el quinasa, mientras que el dominio SH2 se une a una tirosina que se encuentra en el extremo C-terminal de la proteína (Fig. 1.13). Estos dominios no ocluyen el centro activo sino que provocan un aumento de la rigidez en el dominio quinasa que son incompatibles con la catálisis (Boggon y Eck, 2004). Las proteínas tirosín quinasas de la familia Abl, y probablemente de la familia Tec también, adoptan una conformación muy similar a la de Src (Nagar et al., 2003).

### Estructura de Zap-70, una tirosín quinasa de la misma familia que Syk

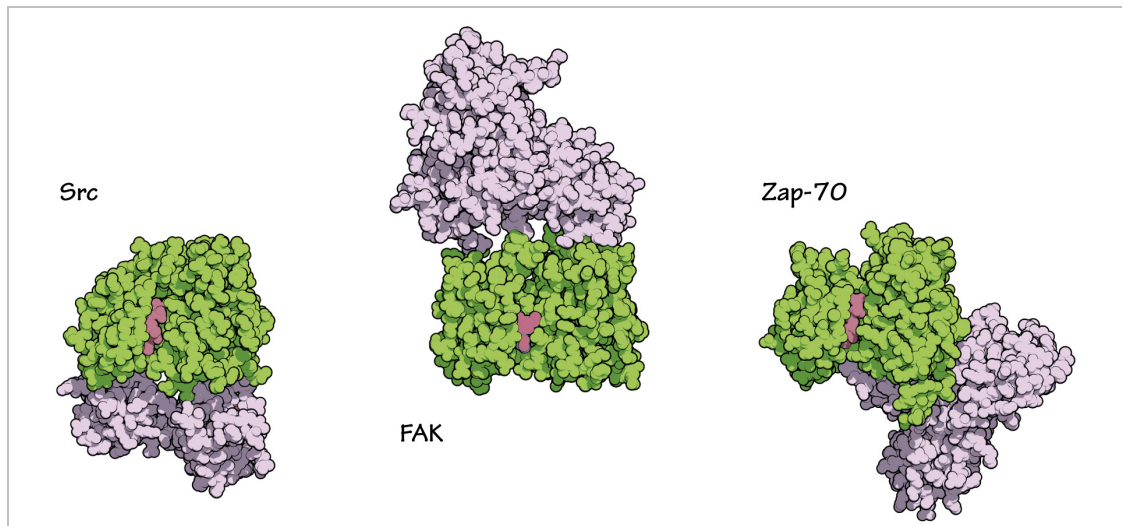
Durante el periodo en el que se redactaba el segundo capítulo de resultados apareció un trabajo, realizado en el laboratorio de John Kuriyan, en el que describían la estructura de Zap-70 en su conformación inactiva mediante cristalografía y difracción de rayos X (Deindl et al., 2007) (Fig. 1.14). Observaron que el mecanismo de auto-inhibición era distinto al descrito para otras quinasas, como el caso de FAK y Src (Fig. 1.15). La inhibición de Zap-70 se debe a un complejo



**Fig. 1.14- Estructura de Zap-70.** El dominio quinasa (mostrado en naranja) se encuentra en una conformación inactiva debido a la pérdida de flexibilidad que se produce como consecuencia de la red de enlaces de hidrógeno que se establecen con la formación del sándwich del interdominio B (rojo), que se ve atrapado entre el dominio quinasa y el interdominio A (amarillo). Los dominios SH2 (verdes) orientan sus sitios de reconocimiento para tirosinas fosforiladas expuestos al medio.

entramado de interacciones hidrofóbicas que se dan entre residuos de la parte opuesta al centro activo del dominio quinasa, del interdominio B y del interdominio A (Fig. 1.14). Los autores afirman que al producirse lo que denominan el sándwich del interdominio B, se genera una red de puentes de hidrógeno que incrementa la rigidez existente entre los dos lóbulos del dominio quinasa y los dispone en una conformación que es incompatible con la catálisis. Este aumento de la rigidez del dominio quinasa, producido por interacciones intramoleculares, recuerda a la regulación que hemos comentado anteriormente de las quinasas Src, pero con una diferencia importante, en el caso de Src los sitios de unión de los dominios reguladores se encuentran ocupados mediando las

interacciones intramoleculares responsables de la inhibición (Fig. 1.13), mientras que en el caso de Zap-70 los sitios de unión de los dominios SH2 se encuentran libres, expuestos al disolvente. Es importante recalcar que aunque tengan esta potencial accesibilidad, la conformación que adoptan los dominios SH2 en la estructura inactiva no es compatible con la unión de un motivo ITAM doblemente fosforilado, lo que hace pensar que la unión a estos péptidos, situados en los inmunoreceptores, sea el primer paso en la activación de estas quinasas. Esta unión provocaría un cambio conformacional que desestabilizaría las interacciones hidrofóbicas mencionadas anteriormente, permitiendo la exposición y fosforilación de las tirosinas necesarias para completar la activación de la proteína (Deindl et al., 2007).

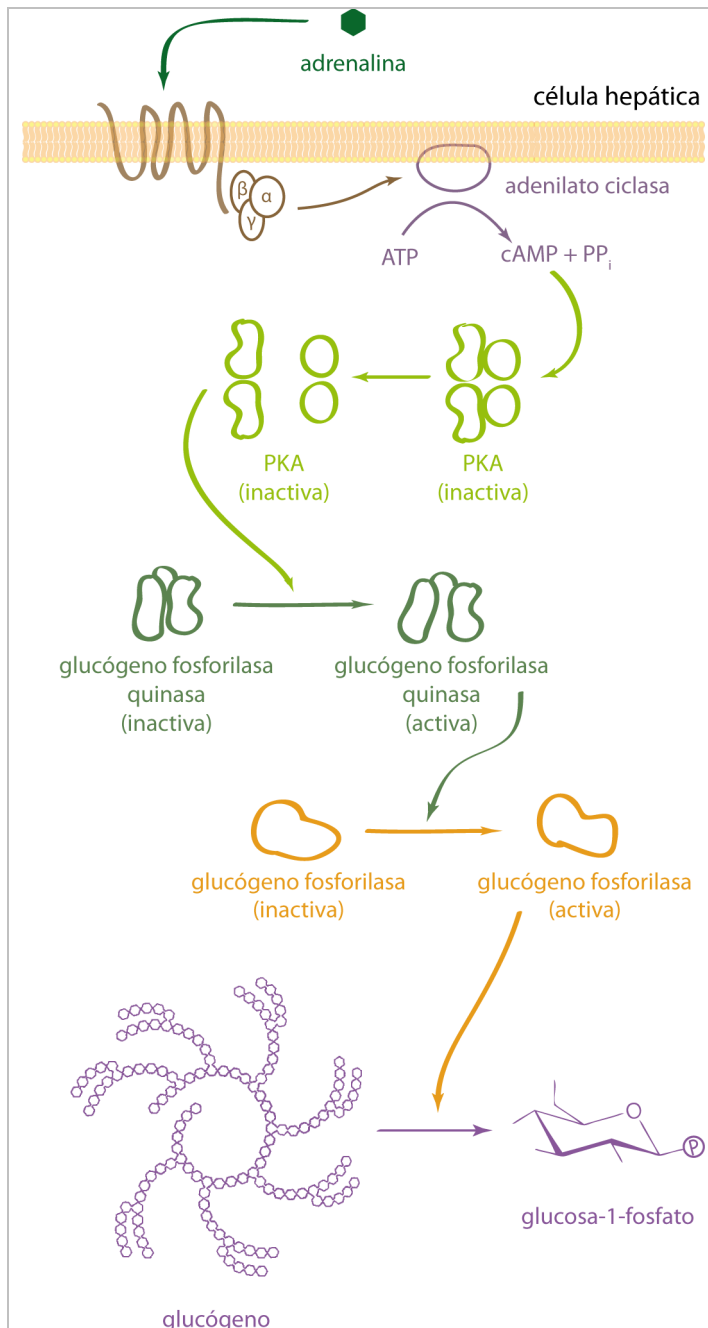


**Fig. 1.15- Regulación de las quinasas Src, FAK y Zap-70.** Estructuras de las quinasas Src (PDB ID. 2SRC) (Xu et al., 1999), FAK (PDB ID. 2JOJ) (Lietha et al., 2007) y Zap-70 (PDB ID. 2OZO) (Deindl et al., 2007). Al dominio quinasa de todas las proteínas se le ha dado un color verde. En color morado se indica el centro activo. Los dominios quinasas han sido dispuestos en la misma orientación para comparar las distintas posiciones que ocupan sus respectivos dominios reguladores (de color lila). En el caso de Src y Zap-70 estos dominios interaccionan con la parte posterior del dominio quinasa, y es la rigidez que produce esta unión la causa de la inhibición. Sin embargo, la inhibición de FAK es consecuencia del bloqueo estérico del centro activo.

## 1.5 Epac2, un factor intercambiador de nucleótidos cíclicos dependiente de cAMP

### El descubrimiento del cAMP

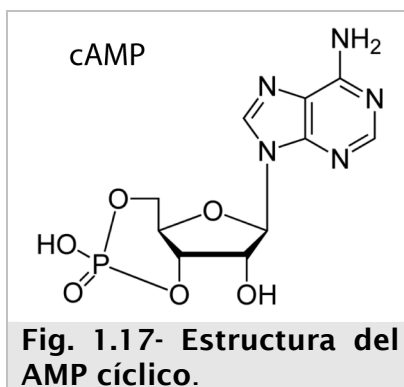
Hace más de cincuenta años, Rall, Sutherland y Berthet conseguían aislar un factor activo, que más tarde resultaría ser el cAMP, y proponían el nuevo concepto de mensajero secundario (Berthet et al., 1957). Este descubrimiento llevó a Sutherland a ganar el premio Nobel en 1971. Ahora es de sobra conocido que la estimulación de células hepáticas con adrenalina conlleva la producción de cAMP por la adenilato ciclasa y la consiguiente activación de PKA (*Protein kinase A*) (Fig. 1.16). PKA fosforila a la glucógeno fosforilasa quinasa, que a su vez activa a la glucógeno fosforilasa, que cataliza la hidrólisis del glucógeno a glucosa-1-fosfato (Fig. 1.16). Hace cincuenta años sólo se sabía que la adrenalina activaba, de alguna manera, a la glucógeno fosforilasa. En el trabajo mencionado anteriormente,



**Fig. 1.16- Glucogenolisis.** La acción de la adrenalina sobre las células hepáticas estimula la producción de cAMP por la adenilato ciclasa. Este segundo mensajero activa a PKA iniciando una cascada de señalización que termina con la degradación del glucógeno para producir glucosa.

Sutherland y colaboradores llevaron a cabo el siguiente experimento. Separaban los homogeneizados de hígado en dos fracciones: una soluble que contenía PKA, glucógeno fosforilasa quinasa y glucógeno fosforilasa, y una fracción insoluble que contenía la adenilato ciclasa. Se dieron cuenta

de que tras la estimulación con adrenalina de la fracción insoluble, incluso hirviéndola después (eliminando así cualquier actividad enzimática), esta era capaz de activar a la glucógeno fosforilasa. Describieron la existencia de un factor que purificaron parcialmente, pero no fue hasta dos años más tarde que Lipkin y colaboradores identificaron a este factor como el cAMP (Lipkin et al., 1959) (**Fig. 1.17**). La diana específica sobre la que actúa el cAMP fue una incógnita hasta 1968, año en que Krebs y colaboradores describieron y purificaron la proteína quinasa dependiente de cAMP, PKA (Walsh et al., 1968). Desde entonces se ha creído que PKA era la principal mediadora de la respuesta inducida por cAMP.



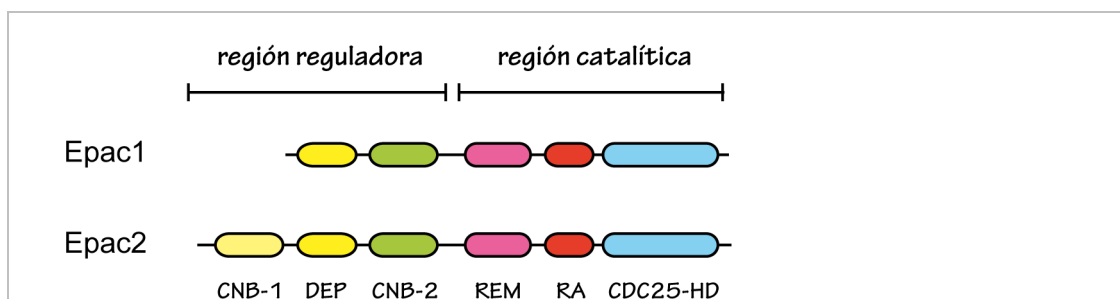
### Las proteínas Epac son activadas por cAMP

La prevalencia de PKA en la señalización mediada por cAMP se tambaleó cuando en el laboratorio de J. L. Bos se dieron cuenta de que la activación de la GTPasa Rap1, inducida por cAMP, era independiente de la inhibición de PKA (de Rooij et al., 1998). Realizaron búsquedas en bases de datos en las que encontraron posibles dominios de unión a cAMP. La proteína Epac1 contiene simultáneamente un posible dominio de unión a cAMP y un posible dominio de intercambio de nucleótidos (de Rooij et al., 1998). Mediante análisis bioquímicos posteriores demostraron que esta proteína era un intercambiador de nucleótidos regulado por cAMP y que activaba tanto a Rap1 como a Rap2 (de Rooij et al., 1998; de Rooij et al., 2000). Poco después describieron otra proteína similar a la que denominaron Epac2, que es la proteína de la familia sobre la que se ha trabajado en esta tesis (de Rooij et al., 2000). Las GTPasas Rap son los homólogos más cercanos a las proteínas Ras. Rap1 se describió inicialmente como una proteína que podía revertir los efectos que tenía la oncoproteína K-Ras en la célula (Kitayama et al., 1989). En un principio se pensaba que intervenía secuestrando a algunos efectores de K-Ras, pero se ha visto que no es así y que actúa por vías independientes. Estas GTPasas relacionan a las proteínas Epac con múltiples procesos como la adhesión celular mediada por integrinas (Bos, 2005), la regulación de la PLC $\epsilon$  (Schmidt et al., 2001), o la remodelación de actina. El nexo de más fuerte entre Rap1 y la remodelación de actina se estableció con el descubrimiento de que Rap1 interacciona directamente con GEFs de Rac, como Tiam y Vav2, provocando su translocación a la protusión celular y favoreciendo así la migración celular mediada por Rac (Arthur et al., 2004). Sin embargo, también se le han atribuido a las proteínas Epac funciones en las que se desconoce si son realizadas a través de las GTPasas Rap, como la regulación de PKB en células del tiroides (Mei et al., 2002). Otro ejemplo

en el que no se conoce si las proteínas Rap juegan algún papel es en la función que Epac2 desempeña en el páncreas. Los primeros estudios que hicieron pensar que Epac2 estaba involucrada en la secreción de insulina vinieron de experimentos con células  $\beta$  pancreáticas (Ozaki et al., 2000; Kashima et al., 2001). Las células mutantes, en las que Epac2 no puede unir cAMP, eran incapaces de secretar insulina tras la estimulación con forskolina o GLP-1 (*Glucagon-like peptide 1*). Parece ser que Epac2 interacciona con la proteína Rim2 y que es este complejo el que regula la exocitosis de insulina (Kashima et al., 2001). Adicionalmente, Epac2 podría estar involucrada en el control de otro punto en la secreción de insulina regulando los canales sensibles a Ryanodina, controlando así la liberación de calcio de las cisternas intracelulares (Kang et al., 2003; Tsuboi et al., 2003). Más recientemente se ha observado que el cAMP está relacionado con el acúmulo y la exocitosis de vesículas cargadas de neurotransmisores en la membrana presináptica. Si bien PKA controla gran parte del proceso, se cree que las proteínas Epac también están implicadas (Sakaba y Neher, 2003; Kaneko y Takahashi, 2004; Zhong y Zucker, 2005).

### Estructura primaria de los intercambiadores de nucleótidos activados por cAMP

Dentro de los GEFs activados por cAMP nos encontramos a Epac1 y a su pariente cercano Epac2. La secuencia de estas proteínas se puede dividir en dos zonas, la denominada región reguladora (RR), que está formada por un dominio DEP (*Dishevelled, Egl-10, Pleckstrin*) y un dominio de unión a cAMP (CNB), y la región catalítica (RC) que contiene a los dominios REM (*Ras-exchange motif*), RA (*Ras association*) y CDC25-HD (*CDC25 homology domain*). (Fig. 1.18). La principal diferencia, en lo referente a estructura primaria, entre Epac1 y Epac2 es que la última posee un dominio adicional N-terminal de unión a cAMP (CNB-1) (de Rooij et al., 2000) (Fig. 1.18). No se conoce su función pero se sabe que no es necesario para la regulación de Epac2 por cAMP (de Rooij et al., 2000). Este primer dominio une cAMP con menos afinidad

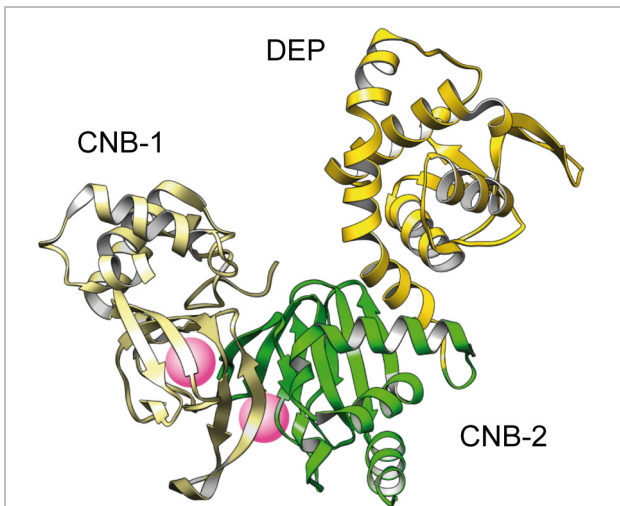


**Fig. 1.18- Estructura primaria de Epac.** Se muestra un esquema de la organización en dominios de Epac y de Epac2 (en la que puede verse el dominio adicional de unión a cAMP, CNB-1). Se indican las zonas pertenecientes a la región reguladora y a la catalítica.

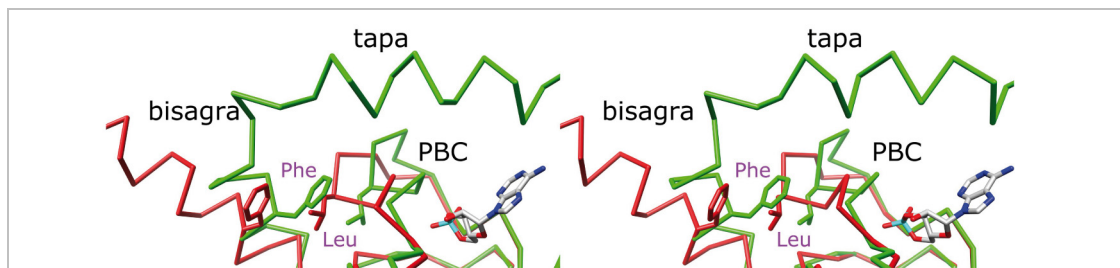
que el dominio CNB de Epac1 y el dominio CNB-2 de Epac2, los cuales, "in vitro", muestran una Kd de 1-5  $\mu\text{M}$  y se llega al valor medio de su máxima actividad a una concentración 40  $\mu\text{M}$  de cAMP (de Rooij et al., 2000; Rehmann et al., 2003a). Estas concentraciones son superiores a las necesarias para la activación de PKA, que alcanza el valor medio de su máxima actividad con 1  $\mu\text{M}$ , pero parece que la concentración intracelular de cAMP tras la estimulación de los receptores es suficiente como para activar a las proteínas Epac (Bos, 2003). Como se ha dicho, tanto Epac1 como Epac2 tienen además un dominio DEP que está involucrado en la localización en la membrana. La delección de este dominio no afecta a la regulación de las proteínas, pero provoca que aparezcan mayoritariamente en el citosol (de Rooij et al., 2000). Asimismo, estas proteínas poseen un dominio REM anexo al catalíticamente activo dominio CDC25-HD. Como en el caso de Sos, esta región REM no es necesaria para la catálisis, sino para estabilizar la estructura del CDC25-HD (Boriack-Sjodin et al., 1998), aunque no se puede descartar que tenga funciones adicionales como la unión de proteínas reguladoras (Margarit et al., 2003). Finalmente, Epac2 contiene un dominio RA que le permite interactuar con Ras-GTP, lo que provoca la relocalización subcelular de la proteína (Li et al., 2006).

### Mecanismo de regulación de la actividad de Epac2

La región reguladora de Epac2 se une a la región catalítica e inhibe su actividad. Su eliminación produce una proteína que es constitutivamente activa, sin embargo, basta la sola presencia del dominio CNB-2 para que se produzca una regulación normal dependiente de cAMP. También es conocido que para que se produzca la activación en respuesta al cAMP, es necesario que se produzcan grandes cambios conformacionales (de Rooij et al., 1998; Kawasaki et al., 1998; de Rooij et al., 2000; Ponsioen et al., 2004). En el año 2003 se produjo un avance fundamental en el campo cuando Holger Rehmann y colaboradores determinaron la estructura a resolución atómica de la región reguladora de Epac2 (Rehmann et al., 2003a) (Fig. 1.19). La estructura contiene los dos dominios CNB y el dominio DEP y pone en evidencia que los sitios de unión del nucleótido cíclico se



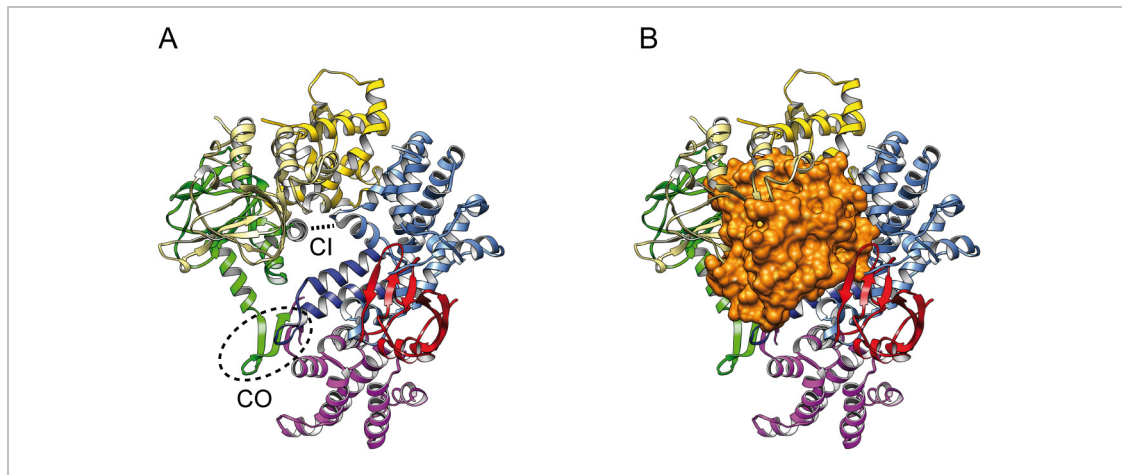
**Fig. 1.19- Estructura de la región reguladora de Epac2.** Se muestra la estructura de los tres primeros dominios de Epac2 resueltos por cristalografía (Rehmann et al., 2003a). Las esferas rosas marcan los sitios de unión del cAMP.



**Fig. 1.20- Modelo de activación inducida por cAMP.** En esta vista en estéreo se compara el bolsillo de unión a cAMP de Epac2 (rojo) (PDB ID. 1O7F) (Rehmann et al., 2003a) en ausencia del ligando con el de PKA II (verde) unido a cAMP (PDB ID. 1CX4) (Diller et al., 2001). Se puede observar que la unión del cAMP provoca un cambio conformacional en el PBC que permite el movimiento de la tapa sobre el cAMP.

encuentran enfrentados y alejados del dominio DEP, indicando que debe ocurrir un cambio conformacional que permita el acceso del ligando. Lo más importante es que esta fue la primera estructura descrita de un dominio de unión a nucleótido cíclico en ausencia de ligando, y por consiguiente, la comparación con otras estructuras resueltas con el cAMP unido permitió definir zonas importantes en la regulación y proponer un modelo de activación general. Se definieron tres zonas: el sitio de unión al fosfato (PBC, del inglés *phosphate binding cassette*), la región bisagra y la tapa (**Fig. 1.20**). La clave del mecanismo de regulación se encuentra en el bloqueo que ejerce una leucina situada en el PBC sobre una fenilalanina perteneciente a la región bisagra. La unión de cAMP provoca un cambio conformacional en el PBC, con el fin de arrojar al nucleótido, que desplaza a la leucina. Este movimiento elimina el bloqueo estérico, permitiendo que la fenilalanina ocupe el espacio liberado. De esta manera, la región bisagra se comba y posiciona a la tapa correctamente, estableciendo interacciones con la base nitrogenada del nucleótido que estabilizan esta conformación (Rehmann et al., 2003a).

Tres años más tarde, Rehmann y colaboradores consiguieron resolver la estructura de la proteína Epac2 completa en su estado inactivo (Rehmann et al., 2006) (**Fig. 1.21A**). En esta estructura se observa que los dominios de la región reguladora guardan una disposición muy similar a la descrita previamente (Rehmann et al., 2003a) y que se encuentran adyacentes a la región catalítica. La orientación relativa entre estas dos regiones se mantiene sobre dos puntos de contacto. A uno de ellos, en el que interaccionan residuos de la parte N-terminal del CNB-2 con otros del CDC25-HD, se le denominó cerrojo iónico (*ionic latch*). La otra zona recibió el nombre de conmutador (*switch board*). En esta región se forma una lámina  $\beta$  en la que participa la tapa del CNB-2 y aminoácidos de los dominios REM y CDC25-HD. El por qué esta estructura es inactiva se hace evidente si se superpone la estructura del complejo Ras-Sos (Boriack-Sjodin et al., 1998) (**Fig. 1.21B**). Los dos dominios de unión a nucleótido cíclico están ocupando gran parte del espacio necesario para la unión del sustrato, provocando la auto-inhibición de Epac2. ¿Qué ocurriría tras la unión del



**Fig. 1.21- Estructura auto-inhibida de Epac2.** (A) Estructura de Epac2 en su conformación inactiva (PDB ID. 2BYV) (Rehmann et al., 2006). Se señalan las regiones del cerrojo iónico (CI) y del conmutador (CO). (B) Se muestra Ras (superficie coloreada en naranja) en la posición que ocuparía el sustrato unido al centro activo. Para ello se han alineado los dominios catalíticos de Epac2 y de Sos (PDB ID. 1BKD) (Boriack-Sjodin et al., 1998). Se puede observar que ambos dominios CNB de Epac2 están ocluyendo el sitio de unión de la GTPasa.

cAMP? Si asumimos que el modelo descrito anteriormente es correcto para esta proteína, la unión del cAMP provocaría un cambio conformacional en la bisagra y la tapa del dominio CNB-2 que se encuentran en la región conmutadora. Este movimiento retiraría a los dominios reguladores de su posición inhibitoria (Rehmann et al., 2006). Para que esto ocurra es necesario que se rompan las interacciones que forman el cerrojo iónico. Si comparamos lo que ocurre en PKA y en los canales iónicos, no resulta descabellado suponer que este cerrojo se pueda romper como consecuencia de la remodelación del dominio CNB-2 inducida por el cAMP (Rehmann et al., 2007). Por consiguiente, parece que la unión del cAMP tiene que provocar grandes cambios conformacionales en la región reguladora para que se libere la auto-inhibición de Epac2.

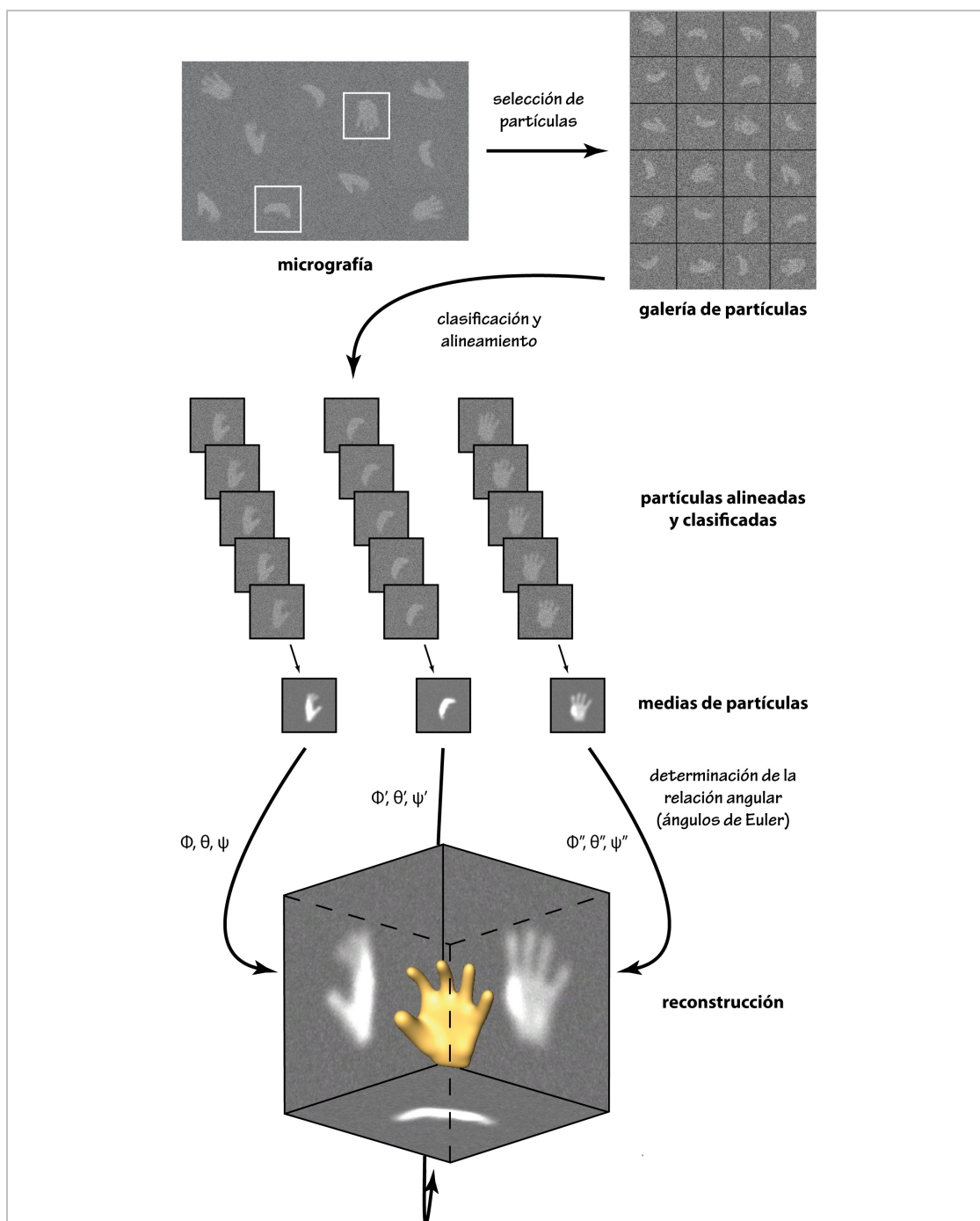
## **1.6 Microscopía electrónica y reconstrucción tridimensional de partículas individuales**

En los últimos años se ha podido apreciar un incremento notable en la cantidad de trabajos publicados en los que se ha empleado la microscopía electrónica y el procesamiento de imágenes para determinar la estructura de macromoléculas (Llorca, 2005). Es una técnica útil porque no compite con otras metodologías más establecidas (por ejemplo cristalografía y RMN), sino que aporta aspectos complementarios. Una de las principales ventajas es que la cantidad de muestra necesaria en microscopía es mucho menor que la requerida en las otras dos técnicas. Esta característica abre el campo al estudio de numerosos complejos macromoleculares cuyas purificaciones suelen ofrecer bajos rendimientos. Hay que añadir que no hay límite superior en el tamaño de las macromoléculas que pueden ser analizadas mediante microscopía electrónica (ME), e incluso en muchos casos una gran masa molecular puede facilitar el trabajo. Una tercera ventaja es que permite lidiar, hasta cierto punto, con muestras heterogéneas. Si bien esto sigue siendo un reto metodológico, se están desarrollando nuevos algoritmos y procedimientos constantemente capaces de resolver la estructura 3D de mezclas de conformaciones presentes en una misma muestra (Burgess et al., 2004; White et al., 2004; Leschziner y Nogales, 2006; Penczek et al., 2006; Scheres et al., 2007; Kastner et al., 2008). El mayor inconveniente que encontramos en esta técnica es que la resolución que se suele alcanzar es baja (15-30 Å). Si bien es cierto que cada vez aparecen más trabajos en los que la resolución que se consigue es media-alta (9-4 Å), estos casos suelen corresponder con muestras que poseen una gran simetría intrínseca y gran tamaño como la chaperona GroEL y algunos virus (Jiang y Ludtke, 2005; Zhang et al., 2008a; Zhou, 2008). Esta diferencia en la resolución obtenida en las estructuras resueltas mediante ME y las de cristalografía y RMN, ha impulsado a muchos grupos a realizar un gran esfuerzo en el desarrollo de metodologías que permitan combinar datos a distinta resolución. La más extendida, y que además ha sido utilizada en esta tesis, es el encaje de estructuras de proteínas o dominios resueltos a resolución atómica, en los mapas de las proteínas o complejos proteicos obtenidos por ME. El objetivo es interpretar los datos de ME a mayor resolución. Para realizar este encaje existen múltiples programas disponibles, como Situs (Wriggers et al., 1999) y ADP\_EM (Garzon et al., 2007).

### **Microscopía electrónica y procesamiento digital de imágenes**

Queda fuera de las pretensiones de la introducción de esta tesis detallar los aspectos técnicos de la microscopía electrónica y del procesamiento de imágenes, temas sobre los que existen excelentes publicaciones (van Heel et al., 2000) (Frank, 2002) (Frank, 2006). Únicamente se repasarán algunos conceptos generales. La idea más importante que hay que tener en cuenta, es que las imágenes tomadas

en el microscopio electrónico son proyecciones de la molécula observada en la dirección del haz de electrones. Estas imágenes integran en 2D toda la información existente en 3D, por lo que según el teorema de Radon (Radon, 1917), con la adecuada combinación de estas proyecciones se puede reconstruir la estructura original (piénsese en la tomografía axial computerizada (TAC) de la práctica médica). Para observar la muestra purificada en el microscopio electrónico hay que protegerla del vacío existente en el interior de la columna y del daño por radiación, para lo que se emplean principalmente dos técnicas de preparación: criomicroscopía (Dubochet et al., 1988) y tinción negativa (Ohi et al., 2004). En la criomicroscopía la muestra se observa embebida en su propio tampón a temperaturas de nitrógeno líquido (aprox.  $-180^{\circ}$  C). De este modo la macromolécula se encuentra en su estado nativo y en casos favorables puede resolverse estructuras a media-alta resolución. La desventaja es que las imágenes obtenidas tienen muy poco contraste, por lo que se requiere que la macromolécula sea de gran tamaño para poder ser analizada con esta técnica (generalmente por encima de los 500 kDa). La tinción negativa sí permite estudiar muestras de menor tamaño. En este caso la muestra se tiñe con sales de metales pesados (el formiato y acetato de uranilo son los más utilizados) para conseguir un mayor contraste. La desventaja de esta técnica es que no se observa directamente la proteína, sino el molde que deja ésta en la capa de tinción (de ahí el nombre del método), de manera que la resolución que se puede alcanzar viene limitada por el tamaño del grano del agente de tinción. Pese a tomar todas estas precauciones en la preparación de la muestra, la cantidad de electrones que la pueden atravesar sin dañarla en exceso es limitada, lo que hace que las imágenes obtenidas tengan una gran cantidad de ruido (**Fig. 1.22**). Esto, junto con otras aberraciones que introduce el microscopio, dificulta el estudio de la estructura de la macromolécula. Para conseguir extraer información de estas imágenes es necesario promediar miles de ellas, ya sea en 2D o en 3D, con el fin de aumentar la relación señal-ruido. Antes es necesario clasificar y alinear las imágenes que correspondan a la misma vista de la macromolécula, para lo que existen una gran cantidad de procedimientos (Frank, 2006) (**Fig. 1.22**). A veces la obtención de unas buenas medias 2D es suficiente para conseguir la información que necesitamos, pero lo más frecuente es que la meta final sea la determinación de la estructura 3D. Como se ha mencionado anteriormente, si combinamos correctamente las proyecciones 2D (ya sean partículas individuales o medias de partículas), determinando su relación angular (ángulos de Euler), podremos resolver la estructura del objeto (**Fig. 1.22**). Esta asignación angular puede conseguirse empleando varios métodos, cuya elección dependerá del comportamiento de la muestra y de la estrategia de procesamiento que se decida seguir (Frank, 2006).



**Fig. 1.22- Esquema del procesamiento de imágenes.** Se ha empleado un mapa artificial de una mano para ilustrar el proceso. Primero se obtienen las micrografías electrónicas en las que pueden observarse distintas proyecciones ruidosas del objeto, correspondientes a las orientaciones que éste adopta sobre el soporte de microscopía (rejilla). Después de seleccionar miles de partículas se procede a su clasificación y alineamiento en grupos que correspondan a la misma orientación. Determinando la relación angular de las partículas de cada grupo o a sus correspondientes medias, se pueden combinar en tres dimensiones para reconstruir el objeto estudiado.



# Objetivos

## 2. Objetivos

El objetivo global de esta tesis es profundizar en el conocimiento de la regulación de un conjunto de proteínas relacionadas con la superfamilia Ras, a través del estudio estructural de las proteínas completas.

Este objetivo se pretende alcanzar mediante los siguientes objetivos parciales:

- Estudiar la estructura del factor intercambiador de nucleótidos Vav3 y los cambios conformacionales que se producen tras su activación fisiológica y oncogénica.
- Determinar la estructura de Syk con el fin de comparar su estado inactivo con el de Zap-70 y las quinasas de la familia Src.
- Descifrar las bases estructurales del mecanismo de activación del factor intercambiador de nucleótidos dependiente de cAMP, Epac2.



# Resultados

## **Capítulo 3.1: Cambios conformacionales globales regulan la activación del factor intercambiador de nucleótidos Vav3**

Óscar Llorca<sup>1,3</sup>, Ernesto Arias-Palomo<sup>1,3</sup>, José L Zugaza<sup>2,3</sup> y Xosé R Bustelo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, España.

<sup>2</sup>Centro de Investigación del Cáncer, Universidad de Salamanca-CSIC, Campus Unamuno, Salamanca, España.

<sup>3</sup>Estos autores han contribuido de igual manera a la realización del trabajo.

La activación de las GTPasas Rho/Rac durante la señalización celular requiere la participación de los factores intercambiadores de nucleótidos de la familia Dbl. A pesar de que la estructura del núcleo catalítico de estos factores ha sido descrita recientemente, los cambios conformacionales que sufren las proteínas completas durante la activación normal y oncogénica siguen siendo desconocidos. En este trabajo se ha utilizado la microscopía electrónica de partículas individuales para resolver la estructura de las formas inactiva (desfosforilada), activa (fosforilada), y constitutivamente activa (mutante con una delección N-terminal) del factor intercambiador de nucleótidos Vav3. Su comparación ha revelado las interacciones intramoleculares que mantienen a Vav3 en su estado inactivo y los cambios conformacionales que experimenta la proteína completa tras su fosforilación. También se describe que la conformación de la proteína fosforilada y del mutante al que se ha delecionado el dominio N-terminal son distintas, lo que indica que la adquisición de una activación constitutiva es estructuralmente más compleja que la mera eliminación de contactos inhibitorios.

# Global conformational rearrangements during the activation of the GDP/GTP exchange factor Vav3

Óscar Llorca<sup>1,3</sup>, Ernesto Arias-Palomo<sup>1,3</sup>,  
José L Zugaza<sup>2,3</sup> and Xosé R Bustelo<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, Spain and

<sup>2</sup>Centro de Investigación del Cáncer, University of Salamanca-CSIC, Campus Unamuno, Salamanca, Spain

**Activation of Rho/Rac GTPases during cell signaling requires the participation of GDP/GTP exchange factors of the Dbl family. Although the structure of the catalytic core of Dbl proteins has been established recently, the molecular changes that the full-length proteins experience during normal or oncogenic conditions of stimulation are still unknown. Here, we have used single-particle electron microscopy to solve the structures of the inactive (unphosphorylated), active (phosphorylated), and constitutively active (N-terminally deleted) versions of the exchange factor Vav3. Comparison of these forms has revealed the interdomain interactions maintaining the inactive Vav3 state and the dynamic changes that the overall Vav3 structure undergoes upon tyrosine phosphorylation. We have also found that the conformations of phosphorylated Vav3 and N-terminally deleted Vav3 are distinct, indicating that the acquisition of constitutive activity by exchange factors is structurally more complex than the mere elimination of inhibitory interactions between structural domains.**

*The EMBO Journal* (2005) **24**, 1330–1340. doi:10.1038/sj.emboj.7600617; Published online 10 March 2005

**Subject Categories:** structural biology; signal transduction

**Keywords:** electron microscopy; GDP–GTP exchange factors; Rac; Vav

## Introduction

A key event during the activation of cells by extracellular stimuli is the transition of Rho/Rac proteins from the inactive (GDP-bound) to the active (GTP-bound) state, a process that leads to the activation of intracellular pathways linked to cytoskeletal change, mitogenesis, and transcriptomal changes (Van Aelst and D'Souza-Schorey, 1997). This activation step is facilitated by guanosine nucleotide exchange factors (GEFs) of the Dbl family, a group of enzymes that catalyze GDP/GTP exchange on Rho/Rac proteins. Dbl proteins are characterized by the presence of a common structural element composed of Dbl-homology (DH) and plekstrin-homol-

ogy (PH) domains (Zheng, 2001). The DH is an  $\approx 200$ -amino-acid-long domain that usually contains all the structural information required for substrate recognition, substrate selectivity, and the catalysis of nucleotide exchange (Zheng, 2001). The PH domain is shorter in length ( $\approx 100$  amino-acid residues) and is always located at the DH C-terminus. PH domains play diverse roles in these GEFs, functioning as phospholipid-dependent regulators of GEF activity, as stabilizers of the DH/GTPase complex, or as localization signals to ensure the compartmentalized action of the GEFs in specific regions of the cell (Hoffman and Cerione, 2002). Interestingly, DH–PH cassettes usually display constitutive enzyme activities when tested independently of the rest of domains present in the GEFs (Zheng, 2001), indicating that the full regulatory complexity of Rho/Rac GEFs cannot be understood unless direct information on the architectural plan of those enzymes outside the DH–PH regions is obtained.

The need for such structural information is well illustrated in the case of Vav proteins, a Dbl family subgroup with roles in signaling pathways activated by tyrosine kinases (Bustelo, 2000; Turner and Billadeau, 2002). In addition to the prototypical DH–PH cassette, the three known mammalian Vav proteins (Vav, Vav2, Vav3) contain calponin-homology (CH), acidic (Ac), zinc-finger (ZF), SH2, and SH3 domains (Figure 1A) (Bustelo, 2000; Turner and Billadeau, 2002). The understanding of these GEFs has improved significantly at the genetic, biochemical, and signaling levels during the last decade. Thus, we now know that Vav proteins become stimulated by direct phosphorylation on a tyrosine residue located in the Ac region (Y<sup>174</sup> in Vav, Y<sup>172</sup> in Vav2, Y<sup>173</sup> in Vav3) (Bustelo, 2002). Moreover, they can become activated oncogenically by mutations deleting their N-terminal regions (Bustelo, 2000). Unlike their wild-type counterparts, these truncated proteins display constitutive, phosphorylation-independent exchange activity (Bustelo, 2002). In contrast to these advances, very fragmentary information is available regarding the intramolecular mechanisms regulating their exchange activity and about their overall architectural structure. A significant step in this direction was the analysis by NMR of the Vav DH domain fused to the last amino acids of the Ac region (residues 170–189). These studies revealed that phosphorylation drives Vav enzyme activation by disrupting an inhibitory loop established by interactions between residue Y<sup>174</sup> and the catalytic site of the DH domain (Aghazadeh *et al*, 2000). However, current experimental evidence suggests that this inhibitory loop, although operational *in vivo*, cannot explain the complete mechanism of regulation of Vav proteins. Thus, it has been shown that the CH region cooperates in the modulation of the on/off states of Vav proteins, probably by interacting with the Vav ZF (Movilla and Bustelo, 1999; Zugaza *et al*, 2002). Consistent with this view, CH-deleted Vav proteins containing an intact Ac region show phosphorylation-independent exchange activity (Movilla and Bustelo, 1999; Zugaza *et al*, 2002). In addition, it has also been proposed that the activity of Vav proteins

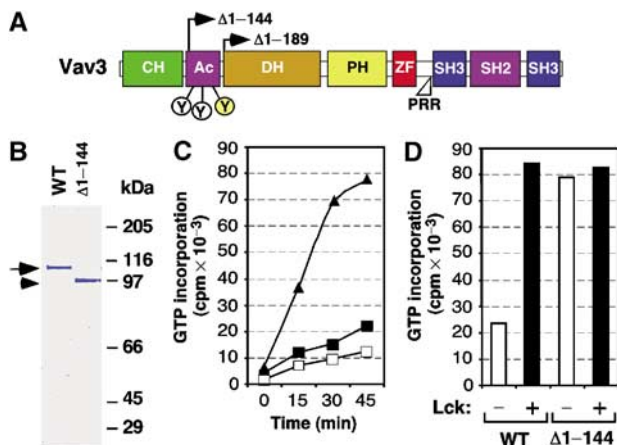
\*Correspondence: Centro de Investigación del Cáncer, University of Salamanca-CSIC, Campus Unamuno, 37007 Salamanca, Spain.

Tel.: +34 923 29 4802; Fax: +34 923 29 4743;

E-mail: xbustelo@usal.es

<sup>3</sup>These authors contributed equally to this work

Received: 17 December 2004; accepted: 7 February 2005; published online: 10 March 2005



**Figure 1** Biochemical purification of Vav3 proteins. (A) Schematic representation of the structure of Vav proteins. Each domain has a color assigned, which is maintained in all figures. Arrows indicate the start site of Vav3 ( $\Delta 1-144$ ) and Vav ( $\Delta 1-189$ ).  $Y^{173}$  is depicted as a yellow circle. Other phosphorylation sites present in the Ac are shown as white circles. PRR, proline-rich region. (B) Analysis by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the samples of Vav3 proteins used in this work. WT, wild type. (C) Exchange activity of unphosphorylated and phosphorylated full-length Vav3 proteins. GDP/GTP exchange reactions with RhoA alone (open boxes) and in the presence of unphosphorylated (closed boxes) or phosphorylated (closed triangles) wild-type Vav3. Exchange values were determined in duplicate after the indicated periods of time using a filter immobilization assay. (D) Phosphorylation-independent exchange activity of Vav3 ( $\Delta 1-144$ ). Wild-type Vav3 (WT) or Vav3 ( $\Delta 1-144$ ) pretreated with (+) or without (-) GST-Lck were subjected to exchange reactions as described above. Exchange values were determined in duplicate after 45 min as in panel C.

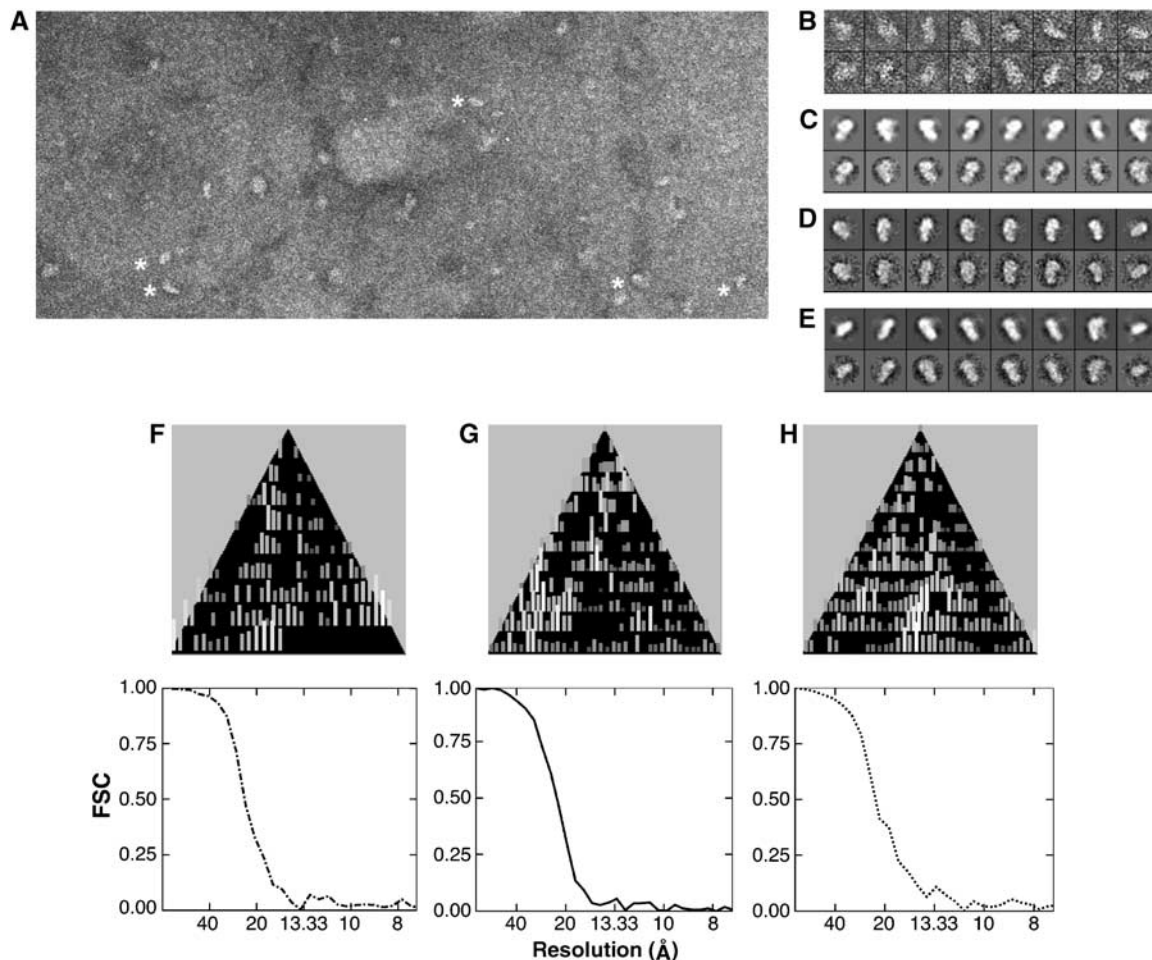
may be regulated outside the inhibitory loop via the binding of phospholipids to the PH region (Han *et al*, 1998). Biochemical evidence suggests that this second regulatory level could be mediated by interactions between the PH and DH regions that are enhanced and eliminated by phosphatidylinositol-biphosphate and -triphosphate, respectively (Das *et al*, 2000). Despite these advances, we lack adequate information on the Vav three-dimensional (3D) structure to understand all these regulatory/functional issues at the structural level. Likewise, other problems that are general to all Dbl family members remain to be addressed structurally in the case of Vav proteins. Those include the 3D spatial distribution of the domains within the full-length molecule, their rearrangement during activation, and whether the orientations of the two domains of the DH-PH cassette are fixed or subjected to dynamic changes during the regulatory GEF cycle. Here, we have used single-particle electron microscopy (EM) coupled to computing tools to peep into the structure of a mammalian Vav protein in the inactive, active, and constitutively active versions. This strategy has given us an unprecedented view of the mechanisms modulating the biological activity of Vav proteins and, in addition, of the rearrangements that the architecture of a Rho/Rac GEF undergoes during its transition to activated states.

## Results

### Protein purification, EM, and image analysis

To date, structural information on Vav proteins and other Rho/Rac GEFs is limited to isolated domains due to difficul-

ties in obtaining large amounts of proteins and crystals for the full-length proteins. Due to this, we have chosen a single-particle EM approach to obtain 3D information on the different functional states of Vav family proteins. This avenue has been facilitated by recent developments in EM techniques that allow to elucidate molecular structures of relatively small proteins that were traditionally out of its scope (Orlova and Saibil, 2004). To perform EM, we selected Vav3 instead of the other Vav family members because this protein can be obtained with higher yields and displays more stable biochemical and catalytic behaviors than the other family counterparts (unpublished observations). Wild-type Vav3 and the Vav3 ( $\Delta 1-144$ ) mutant protein with an N-terminal hexahistidine tag were expressed in insect cells using a baculovirus transduction system. After viral infection, the two proteins were purified to homogeneity by affinity chromatography onto nickel beads (Figure 1B). The phosphorylated version of wild-type Vav3 (from now on, pY-Vav3) was subsequently generated using *in vitro* kinase reactions with glutathione S-transferase (GST)-Lck. After the reaction, the kinase was eliminated by chromatography with a glutathione-coated matrix. As expected (Movilla and Bustelo, 1999), full-length Vav3 was only active when phosphorylated on tyrosine residues (Figure 1C and D). In contrast, Vav3 ( $\Delta 1-144$ ) showed a constitutive, phosphorylation-independent exchange activity (Figure 1D). Aliquots of each preparation were spotted onto EM grids, negatively stained with uranyl acetate, and subjected to EM analysis. This approach allowed us to obtain microscopy fields where single-molecule images could be clearly identified above the background (Figure 2A and data not shown). Single images were extracted without any *a priori* bias (Figure 2B). However, a minor fraction of them was discarded during image processing because they were not consistent with the rest of the data set. The discarded images were extremely large in size, suggesting that they derived from protein aggregates. Selected images for Vav3 (5431 images), pY-Vav3 (3867 images), and Vav3 ( $\Delta 1-144$ ) (4604 images) were processed independently using the EMAN software package (Ludtke *et al*, 1999) (see Supplementary data for further technical details). These particles were classified during 3D refinement into homogeneous averages linked to certain projection angles (Figure 2C-E). There existed a good agreement between final averages and projections, which were then used to build the definitive 3D reconstructions of the three Vav3 states (see below). The data set used to generate each of these volumes was found to be consistent with a unique output solution, revealing the structural homogeneity within each Vav3 state. Many of these averages displayed elongated shapes (Figure 2C-E), suggesting that Vav3 is not organized into a compact globular structure. In agreement to this, the analysis of the Euler angle distribution showed some preference for the elongated side views (Figure 2F-H, upper panels) that distributed along rotations of their longitudinal axis ('rocking of the particle'). Consequently, accurate 3D reconstructions for Vav3 could be obtained from our EM data since no significant missing cone exists in Fourier space, as shown before in the reconstructions of the chaperonin GroEL from side-view images (Ludtke *et al*, 2001). The resolution of the three reconstructions was estimated to be  $\approx 22 \text{ \AA}$  using Fourier shell correlation between two independent volumes and a correlation coefficient cutoff value of 0.5 (Figure 2F-H,



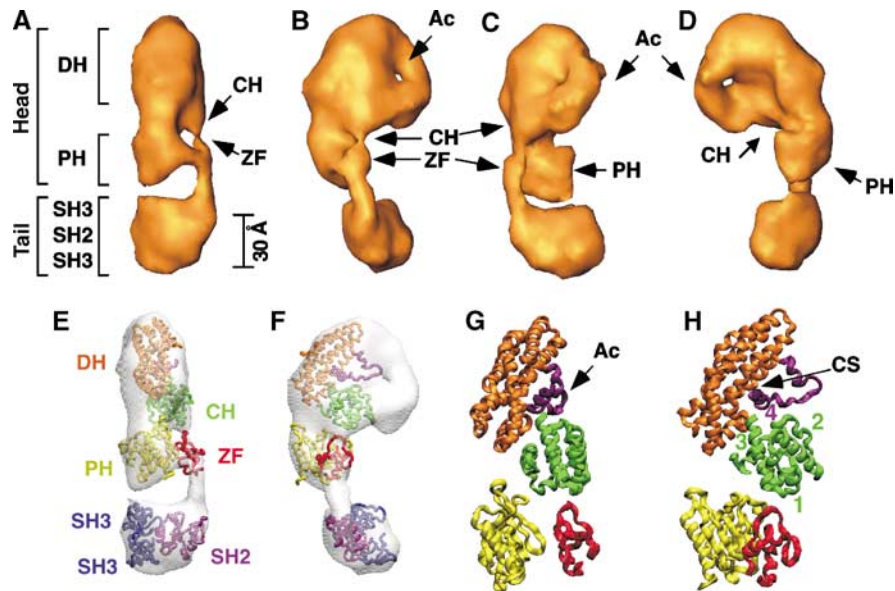
**Figure 2** EM of Vav3, pY-Vav3, and Vav3 ( $\Delta 1-144$ ). (A) Representative field from an electron micrograph of Vav3 ( $\Delta 1-144$ ). Single images can be seen over the background. Some selected molecules have been labeled with white asterisks. (B) A few extracted raw images for Vav3 ( $\Delta 1-144$ ) prior to image processing. (C–E) Collection of selected pairs of projections (top row) and class averages (bottom row) in the final step of the refinement process for Vav3 (C), pY-Vav3 (D), and Vav3 ( $\Delta 1-144$ ) (E). (F–H) Top panels: Euler angle distribution for the class averages in Vav3 (F), pY-Vav3 (G), and Vav3 ( $\Delta 1-144$ ) (H) as provided by EMAN. The triangle has been tilted slightly for better visualization. The brightness and height of each column represent the number of images in each class on a logarithmic scale (more height and brightness imply larger number of images). Lower panels: Plots of Fourier shell correlation (FSC) curves between two independent models for the processing of Vav3 (F), pY-Vav3 (G), and Vav3 ( $\Delta 1-144$ ) (H).

lower panels). The reconstructed volumes for Vav3, pY-Vav3, and Vav3 ( $\Delta 1-144$ ) are shown in Figures 3, 4, and 6, respectively.

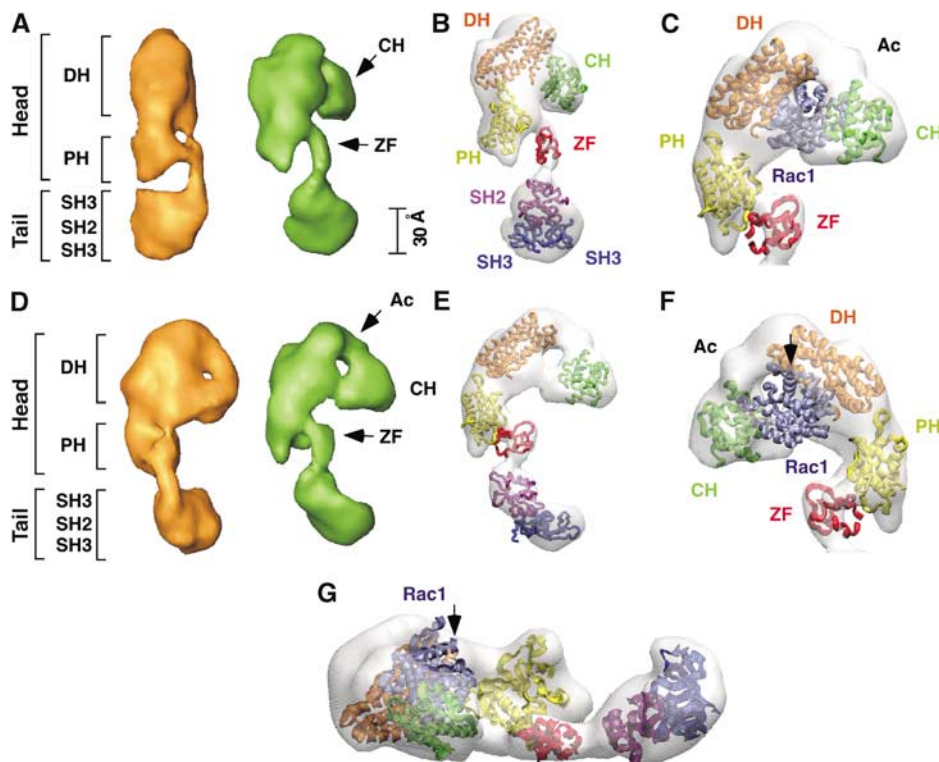
#### Location of domains into EM maps by fitting atomic data

To understand in structural terms the changes occurring during the two types of Vav3 activation, we next used fitting tools to locate each of the eight Vav3 structural domains within the reconstructed volumes. This step, although not providing structures accurate at atomic resolution, is useful to link the changes observed in the EM volumes with movements of specific Vav3 domains. Since we had no atomic structures for Vav3, we decided to use available data from homologous domains of other Vav family members and signaling proteins for this fitting step. The domains selected for inclusion in our study were the calponin CH domain (67% similarity to Vav3), the Vav DH domain with (residues 170–375) or without (residues 189–375) the most distal portion of the Ac region (88% similarity), the Sos1 PH domain (62%

similarity), the protein kinase C (PKC) ZF (58% similarity), and full-length Grb2 (59% similarity). This approach is legitimate because there is a high level of structural conservation within each domain family independently of the proteins they derive from. Consequently, it is unlikely that structural differences between those structures and the corresponding domains of Vav3 will result in significant effects in the accuracy of their location at the resolution level used in our EM maps (22 Å). These structures were accommodated into the Vav3 volumes using SITUS, an unbiased biocomputing technique (Wriggers and Birmanns, 2001). In all cases, the preferred domain orientations obtained were those providing a better continuity of the polypeptide chain among nearby domains (see Supplementary data for further technical details). Selected images for Vav3, pY-Vav3, and Vav3 ( $\Delta 1-144$ ) EM volumes with the fitted domains are shown in Figures 3, 4, and 6, respectively. The accuracy of our fitting strategy was further demonstrated by performing reverse volume reconstructions. Thus, when the atomic structures of the calponin, Vav, Sos1, PKC, and Grb2 domains were



**Figure 3** Structure of inactive Vav3. (A–F) Views of the Vav3 reconstructed volume before (A–D) and after (E, F) fitting the atomic structures of the indicated domains into the EM density (shown as white transparency). (G, H) Close-up of the Vav3 CH–Ac–DH–ZF region without the EM density. The linkers between the CH–DH, DH–PH, and PH–ZF are not included in this representation since no NMR or crystal structures are available for them. CS, catalytic site; 1, CH  $\alpha$ 5– $\alpha$ 6 loop; 2, CH  $\alpha$ 3– $\alpha$ 4 loop; 3, CH  $\alpha$ 6 helix; 4, inhibitory Ac  $\alpha$ -helix.



**Figure 4** Structure of pY-Vav3. (A, B, D, E) Views of the Vav3 volume before (A, D, green color) and after (B, E) fitting the atomic structures of the indicated domains into the EM density. We include in panels A and D the structure of unphosphorylated Vav3 (orange color) to facilitate comparisons of the structures. (C, F, G) Modeling of the putative Vav3/Rac1 complex based on the Vav3 EM data and in the previously described crystal structure of the Tiam1/Rac1 complex. The GTPase is shown in ice blue color. The GTPase  $\alpha$ -helix containing the C-terminal CAAX box is indicated by an arrow.

filtered to the 22 Å resolution in the predicted orientations of our modeling, the volumes obtained were very similar to those derived from EM images (Supplementary Figure S1). Furthermore, when we fitted the atomic models as rigid

bodies into the EM densities using crosscorrelation methods provided by the SITUS CoLoRes command (Wriggers and Birmanns, 2001), we obtained correlations above 0.68, 0.57, and 0.58 for Vav3, pY-Vav3, and Vav3 ( $\Delta$ 1–144), respectively.

This is a good indication of the resemblance of the atomic models and the EM data, especially if we consider that only 85% of the total sequence of Vav3 has been accounted for by the atomic models.

### Structure of inactive, wild-type Vav3

The 3D reconstruction of wild-type Vav3-derived EM images indicated that nonphosphorylated Vav3 is a monomeric, elongated protein composed of a massive head and a triangular tail (Figure 3A–F, Supplementary Video S1). The structure of the Vav3 head is highly complex since it harbors the five most N-terminal domains of this molecule (Figure 1A). A significant part of the head volume could be matched unambiguously using the SITUS program with the NMR structure described for the inhibitory Vav Ac/DH region (Aghazadeh *et al*, 2000) (Figure 3E–H, domain in orange). This result suggests that the autoinhibitory loop described by NMR does occur in the context of full-length Vav proteins in the absence of phosphorylation. The fitting of the CH within the head using the SITUS program also located unambiguously this domain at a side position of the Vav3 volume (Figure 3E–H, domain in green; Supplementary Video S1). The CH is in close proximity to the inhibitory loop of the Ac (residues 170–189) (Aghazadeh *et al*, 2000), the catalytic site and, as previously proposed using biochemical experiments (Zugaza *et al*, 2002), with the position assigned to the Vav3 ZF region (Figure 3F–H, Supplementary Video S1). The mass occupied by the CH disappears in the Vav ( $\Delta$ 1–144) EM volume (see below; Figure 6), further confirming that the computing prediction reflects the actual localization of the CH in this area. At the top of the molecule, the DH and CH regions are interconnected by a well-defined mass that probably corresponds to the proximal region of the Ac domain for which there are no atomic data available (residues 144–170). This segment of the Ac region does not seem to make stable contacts with the DH or the CH, as inferred by the empty space observed in this section of the Vav3 volume (Figure 3B–D, Supplementary Video S1). As a consequence, the Vav3 volume acquires a convex, donut-like shape in this area (Figure 3B–D, Supplementary Video S1).

The PH occupies a region of the Vav3 head with a rough two-fold symmetry at the 22 Å resolution obtained (Figure 3A–H, domain in yellow; Supplementary Video S1). The top SITUS score solution placed the PH in an orientation that allowed connecting its C-terminal end with the ZF and Vav3 tail (Figure 3E–H, Supplementary Video S1). Similar top-ranked solutions were also obtained when this domain was fitted into the EM-derived volumes of pY-Vav3 and Vav3 ( $\Delta$ 1–144) (see below), suggesting that the solution provided represents the most likely orientation of the PH domain within Vav3. However, as a consequence of its intrinsic two-fold symmetry at this resolution, we cannot exclude formally the possible existence of other orientations given as low-ranked solutions by the SITUS program. Notwithstanding this uncertainty, it is clear that the Vav3 PH is placed far away from the DH catalytic site, lacking any stable contacts with the overall DH surface other than the expected connection through the linker region (Figure 3A–H and Supplementary Figure S2A and B). Accordingly, the orientation of the Vav3 PH region relative to the DH domain is different from the structures of previously described DH–PH cassettes, being located in an intermediate position be-

tween the closed conformation of the Sos1 DH–PH structure (in which the PH faces the catalytic domain of the DH) and the opened conformation of the Tiam1 DH–PH region (in which the PH is located at the back of the DH domain) (Supplementary Figure S2, compare panels A and B with C–H) (Soisson *et al*, 1998; Worthylake *et al*, 2000; Rossman *et al*, 2002). The rest of the Vav3 head volume is occupied by a thin but prominent region that is very well fitted by the PKC ZF (Figure 3A–F, domain in red). The ZF makes contacts with the CH  $\alpha$ 5– $\alpha$ 6 loop (Figure 3E–H, Supplementary Video S1). In addition, it is connected to the PH and the tail region by linker regions that have been well resolved in our EM images (Figure 3A–F, Supplementary Video S1). As a result of the conformation of the Vav3 head, the catalytic binding site of the DH domain is buried under a bulky mass composed of the CH and the Ac regions, making it difficult for the protein to interact with the GTPase substrates.

The structure of Vav3 is completed by the tail region containing the most C-terminal SH3–SH2–SH3 domains. The volume of this region fits well with one of the 3D conformations described for Grb2, a protein with a Vav3-like arrangement of SH2/SH3 domains (Maignan *et al*, 1995) (Figure 3E and F, domains in purple and ice blue; Supplementary Video S1). This tail connects to the area occupied by the ZF domain through a short linker of  $\approx$ 15 Å of length that probably corresponds to the highly hydrophilic area present between the ZF and the most N-terminal SH3 domain (Figures 1A and 3A–F). The well-defined structure found by EM for the Vav3 SH3–SH2–SH3 region and the associated linker region indicates that the Vav3 C-terminus acquires a rather rigid structure in solution.

### Structure of tyrosine-phosphorylated Vav3

The examination of the EM structure of pY-Vav3 indicates that it conserves the segregation of structural domains between head and tail regions (Figure 4A and D, Supplementary Video S2). Despite this, pY-Vav3 undergoes significant displacements of structural domains that affect the internal conformation of both head and tail areas. Such changes are quite extensive in the Vav3 head where major reorientations are seen for the CH, Ac, DH, PH, and ZF domains (Figure 4A, B, D, and E). In the case of the CH, Vav3 phosphorylation leads to the disruption of the previously described interactions with the other regions of the Vav3 head. Due to this, the CH is pulled away from both the ZF and the catalytic site (Figure 4D and E, Supplementary Video S2). The orientation of the CH domain within the new position in the pY-Vav EM volume was not totally unambiguous in this case. We selected as the most likely orientation the top score offered by SITUS since it was fully consistent with the expected displacement that the CH would experience from the unphosphorylated position to the phosphorylated one (Figure 4B and E). The catalytic DH region also undergoes a major displacement upon Vav3 phosphorylation. Such movement is revealed because the DH domain can be fitted now into the EM density only if rotated along its longitudinal axis by  $\approx$ 90° with respect to the original position found in inactive Vav3 (compare Figures 3E and F and 4B and E). Such rotation can be easily visualized because the atomic structure of the Vav DH forms an elongated helical bundle arranged in two flat surfaces (Aghazadeh *et al*, 2000). In the inactive Vav3 conformation, one of the flat surfaces containing the catalytic

center is occluded by the CH and the distal Ac region (residues 170–189). However, in pY-Vav, the same flat surface is found facing an empty cavity that is far from the CH domain (Figure 4B and E, Supplementary Video S2). Interestingly, the Vav DH domain cannot be fitted into the pY-Vav3 EM volume unless the inhibitory loop of the Ac region (residues 170–189) is excluded from the analysis (Figure 4D and E, Supplementary Video S2). The displaced Ac loop might remain connected to the CH under these conditions, as inferred from the protruding mass associated to the CH that is still observed by EM (Figure 4D and E, Supplementary Video S2). The rest of the Ac region (residues 144–170) remains well defined as a structure connecting the CH with the top of the Vav3 head (Figure 4C–F, Supplementary Video S2). Taken together, these results indicate that, upon phosphorylation, the catalytic domain of Vav3 undergoes a large rotation along its longitudinal axis that leads to the displacement of the GTPase binding interface away from both the CH and the Ac domain. Another large displacement is observed in the case of the PH region, which becomes now closer to the DH region due to an  $\approx 30^\circ$  rotation (Figure 4B, C, E, and F; Supplementary Figures S2I, J, S3C, and D). As a consequence of the combined movements of the DH and PH domains, these two regions become placed in an orientation similar, although not identical, to the Tiam1 DH–PH structure (Worthylake *et al*, 2000) (Supplementary Figure S2, compare panels E–F and I–J). The PH domain in its new orientation cannot either interfere or collaborate with the binding of the GTPase. Finally, it is observed that the whole Vav3 ZF–SH3–SH2–SH3 module changes its position when compared to the 3D reconstruction of unphosphorylated Vav3 (Figure 4). A movement of this whole area is also observed when the Vav3 CH domain is cleaved off (see below, Figure 6), indicating that such displacement is probably due to the ‘relaxation’ of the molecule after breakage of the CH/ZF interaction rather than being induced by possible phosphorylation events in the Vav3 tail area.

Due to all the changes affecting the positions of the CH, Ac, DH, and ZF regions, the GTPase has now free access to the catalytic region (Supplementary Video S2). This is consistent with our previous observations indicating that pY-Vav3, unlike its unphosphorylated counterpart, can physically interact with nucleotide-free Rho/Rac proteins (Movilla and Bustelo, 1999). We modeled the putative structure of the pY-Vav3/GTPase complex by using the available information of the crystal structure of the Tiam1–Rac1 complex (see Materials and methods). According to this modeling, the Vav3 substrates would sit on a cup-like structure composed of the DH, Ac, and CH regions (Figure 4C, F, and G). In such position, most of the GTPase surface would be hidden away from effector molecules and negative regulators by the surrounding walls of the cup (Figure 4C, F, and G). In addition, the membrane-binding region of the GTPase (CAAX box) would be located perpendicular and away from the cup area (Figure 4F and G, arrow), an orientation that would favor the presentation of the GTPase to the plasma membrane upon GTP loading.

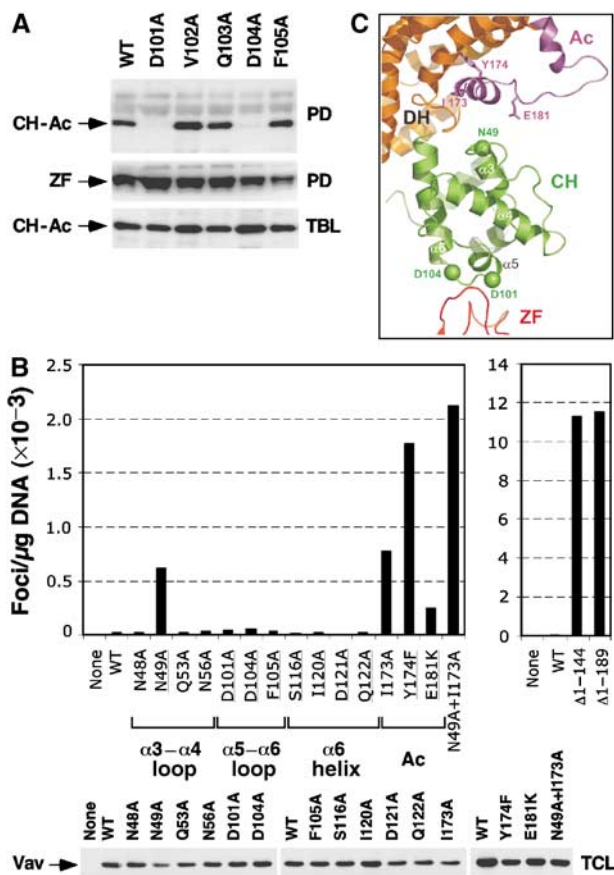
### **Residues involved in the regulation of Vav catalytic activity by tyrosine phosphorylation**

The examination of the structures of Vav3 and pY-Vav3 indicates that the CH domain may establish extensive inter-

actions with the Ac region (via its  $\alpha 3$ – $\alpha 4$  loop), the DH (via its C-terminal  $\alpha 6$  helix) and the ZF (via its  $\alpha 5$ – $\alpha 6$  loop) to stabilize the conformation of the inactive Vav3 state (see Figure 3G and H). Moreover, the displacement of the CH region upon phosphorylation suggests that the disruption of some of those interactions may contribute to the acquisition of the activated Vav3 state (Figure 4). However, the resolution obtained with EM does not allow for the identification of the CH residues involved in such intramolecular interactions. To tackle this problem, we performed scanning mutagenesis of the surface-exposed CH residues present in the predicted interfaces and tested the activity of the resulting mutant proteins in either ZF binding or cell transformation assays. Since Vav3 shows poor transforming activity (Movilla and Bustelo, 1999), we decided to utilize the highly related Vav protein in these experiments.

To identify the amino acids of the CH  $\alpha 5$ – $\alpha 6$  loop involved in the interaction with the ZF, we incubated a purified maltose binding protein (MBP)-Vav ZF with bacterial lysates expressing a collection of Vav CH–Ac point mutants fused to GST. The MBP fusion protein was then immobilized onto amylose beads, washed, and the bound proteins visualized by anti-GST immunoblots. Similar pull-down experiments have been used before to demonstrate the CH–ZF interaction *in vitro* (Zugaza *et al*, 2002). These experiments indicated that the two acidic amino-acid residues present in the CH  $\alpha 5$ – $\alpha 6$  loop (D101, D104) were important for the CH–ZF interaction (Figure 5A, upper panel). These two residues face the ZF region according to our structural modeling (Figure 5C). In contrast, no deleterious effect on the binding of the CH to the ZF was observed when other residues of  $\alpha 5$ – $\alpha 6$  loop were mutated (Figure 5A, upper panel). Parallel immunoblots confirmed that the fusion proteins used in the experiments were utilized in equivalent amounts in all samples (Figure 5A, middle and lower panels). No significant effect on ZF binding was observed when CH mutants outside the  $\alpha 5$ – $\alpha 6$  were tested (data not shown).

Next, we used focus formation assays to test the transforming activity of Vav proteins mutated in surface-exposed residues of the CH  $\alpha 3$ – $\alpha 4$  loop, the CH  $\alpha 6$  helix, the CH  $\alpha 5$ – $\alpha 6$  loop, and the Ac region. To get information on the contribution of the mutated residues in the stabilization of the inhibitory structure, all mutations were generated in the context of full-length Vav. This version of Vav reflects the conformational status of the inhibitory state of Vav proteins, because it lacks transforming activity *in vivo* unless co-expressed with tyrosine kinases (Schuebel *et al*, 1998). As comparative control, we used either point (Y174F) or N-terminally deleted ( $\Delta 1$ –144,  $\Delta 1$ –189) Vav mutants previously shown to be oncogenic *in vivo* (Schuebel *et al*, 1998; Lopez-Lago *et al*, 2000; Zugaza *et al*, 2002). We found that mutations affecting residues of either the Ac/DH (I173A) (Aghazadeh *et al*, 2000) or Ac/CH interfaces (N49A, E181K) stimulate Vav transforming activity (Figure 4B and C). This activity is  $\approx 50\%$  of the transforming activity of the Vav mutant in which the inhibitory Y<sup>174</sup> residue has been targeted (Figure 5B). The simultaneous mutation of the Ac/CH and Ac/DH interfaces (N49A + I173A) results in transforming activities similar to those of the Y174F mutant (Figure 5B and C), suggesting that the interaction of the inhibitory tyrosine with the DH domain is totally disrupted under those conditions. Instead, the CH/ZF or CH/DH contacts



**Figure 5** Activity of Vav CH mutants. (A) Interaction between the CH and ZF regions. Bacterial lysates containing equal amounts of the indicated point mutants of the GST-Vav CH-Ac (lower panel) were incubated with the MBP-Vav ZF bound to amylose beads. After incubation and washes, bound proteins were visualized by anti-GST immunoblots (upper panel). The use of similar amounts of MBP proteins was demonstrated by reblotting of membranes with anti-MBP antibodies (middle panel). PD, pull-down; TCL, total cell lysates. (B) Top panels: Transforming activity of Vav proteins. Residues conserved in mammalian Vav proteins are underlined. Note that residue numbers in Vav shift a +1 position with respect to Vav3 from residues 142 to 181. Bottom panels: Expression of mutant proteins in NIH3T3 cells. Cells were transfected, selected in the presence of neomycin, and the resulting pools evaluated by immunoblot analysis using anti-Vav antibodies. (C) Close-up view of the localization of some of the mutated residues in the Vav3 CH and Ac regions, as predicted by our 3D modeling. For the sake of simplicity, we have not depicted the PH domain.

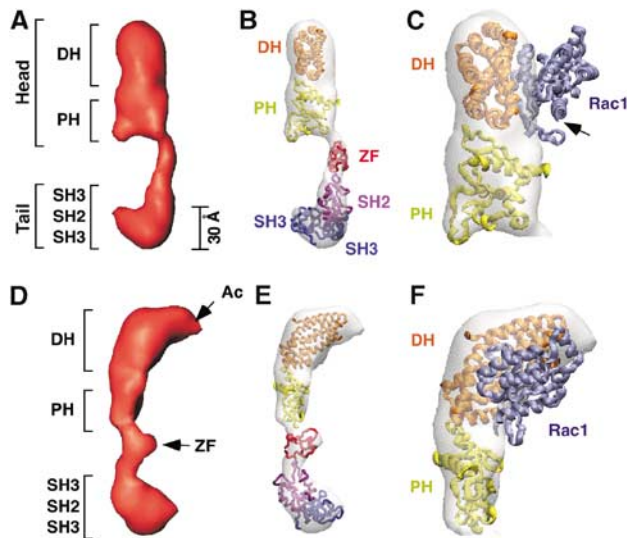
seem to be passively driven by the interactions described above, since mutations of surface-exposed residues of the CH  $\alpha 5$ - $\alpha 6$  loop (D101A, D104A, F105A) or  $\alpha 6$  helix (S116A, I120A, A121D, Q122A) do not trigger Vav transforming activity (Figure 5B). Immunoblot experiments confirmed that all these mutant proteins were expressed in cells (Figure 5B, bottom). These experiments indicate that the inhibitory structure of Vav3 is stabilized through interactions of the Ac  $\alpha$ -helix with the DH domain and, to a lower extent, by contacts between the CH and Ac regions. In contrast, although participating in the steric occlusion of the GTPase binding site, the CH/ZF interaction does not contribute much to the stabilization of the inhibitory conformation. As expected (Zugaza *et al*, 2002), deletions of the CH region promote much higher transforming activities ( $\approx 6$ - to 12-

fold) than the rest of mutants (Figure 5B, right top panel). This suggests that the integrity of the CH region may have additional structural functions in Vav proteins other than the mere stabilization of the inhibitory structure and the masking of the GTPase binding site.

### Structure of Vav 3 ( $\Delta 1$ -144)

Deletion of the CH yields a Vav3 protein with phosphorylation-independent exchange activity (Figure 1D) (Movilla and Bustelo, 1999). EM analyses indicate that such mutagenic event induces dramatic changes in the overall conformation of the Vav3 molecule. In this case, the Vav3 head acquires now a linear conformation totally different from the convoluted structure found in the full-length proteins (Supplementary Video S3; compare Figure 6A and D with Figures 3A, B, 4A, and D). As expected, the area corresponding to the CH region is lost from the Vav3 ( $\Delta 1$ -144) volume (Figure 6A, B, D, and E). Interestingly, the position of the DH undergoes minor changes with respect to that observed in nonphosphorylated Vav3 (Figure 6B and E, Supplementary Video S3). However, this domain can be fitted into the volume only after removing the inhibitory Ac loop (residues 170-189). Thus, unlike in the case of the bacterially purified Vav Ac-DH fragment, the inhibitory Ac loop is not stable in the context of the full-length protein in the absence of the CH region. More importantly, the rest of the Ac region that acquired a cylindrical structure in full-length Vav3 proteins cannot be visualized in the case of Vav3 ( $\Delta 1$ -144) (Figure 6D-F, Supplementary Video S3), suggesting that the entire Ac domain acquires a highly disorganized state upon removal of the CH region. This view is fully consistent with the constitutive catalytic activity of Vav3 ( $\Delta 1$ -144) and with the identical transforming activities of Vav ( $\Delta 1$ -144) and ( $\Delta 1$ -189) mutants (Movilla and Bustelo, 1999; Zugaza *et al*, 2002). The PH undergoes another rotation that puts it in a parallel position with respect to the longitudinal axis of the molecule (Figure 6A-F and Supplementary Video S3, Supplementary Figure S3E and F). As a consequence of such rotation, the relative orientation of the PH with respect to the DH is different from the positions previously seen in Vav3 and pY-Vav3 (Supplementary Figure S3). Despite the fact that the PH becomes now closer to the C-terminal end of the catalytic region (Figure 6 and Supplementary Figure S3, Supplementary Video S3), its position is still far away from the GTPase binding site. Finally, it is observed that the ZF-SH3-SH2-SH3 region of Vav3 ( $\Delta 1$ -144) undergoes a shift in its position when compared with inactive Vav3 (Supplementary Video S3, compare Figure 6B and E with Figure 3E and F).

Due to these conformational changes in Vav3 ( $\Delta 1$ -144), its catalytic domain is fully accessible for the binding of the GTPase substrates (Figure 6C and F). However, the changes experienced by the Vav3 head will probably impose a different structure of the Vav3/GTPase complex. Thus, the cup-like structure embracing the bound GTPase in pY-Vav3 is not present in this case as a consequence of the destabilization of the Ac domain (Figure 6C and F). Moreover, the modeling of the Vav3/GTPase complex suggests that the orientation of the bound GTPase relative to the rest of the Vav3 molecule would also be distinct due to the different location of the catalytic site in Vav3 ( $\Delta 1$ -144) and pY-Vav3 (compare Figures 4C and 6F). These results indicate that the overall



**Figure 6** Vav3 ( $\Delta 1-144$ ) structure. (A, B, D, E) Views of the Vav3 reconstructed before (A, D) and after (B, E) fitting the atomic structures of the indicated domains into the EM density. (C, F) Modeling of the Vav3 ( $\Delta 1-144$ )/Rac1 complex as described in Figure 4. The arrow in panel C signals the GTPase CAXX box.

conformation of Vav proteins and their way of interacting with the GTPase substrate are highly contingent on the presence or absence of the CH region.

## Discussion

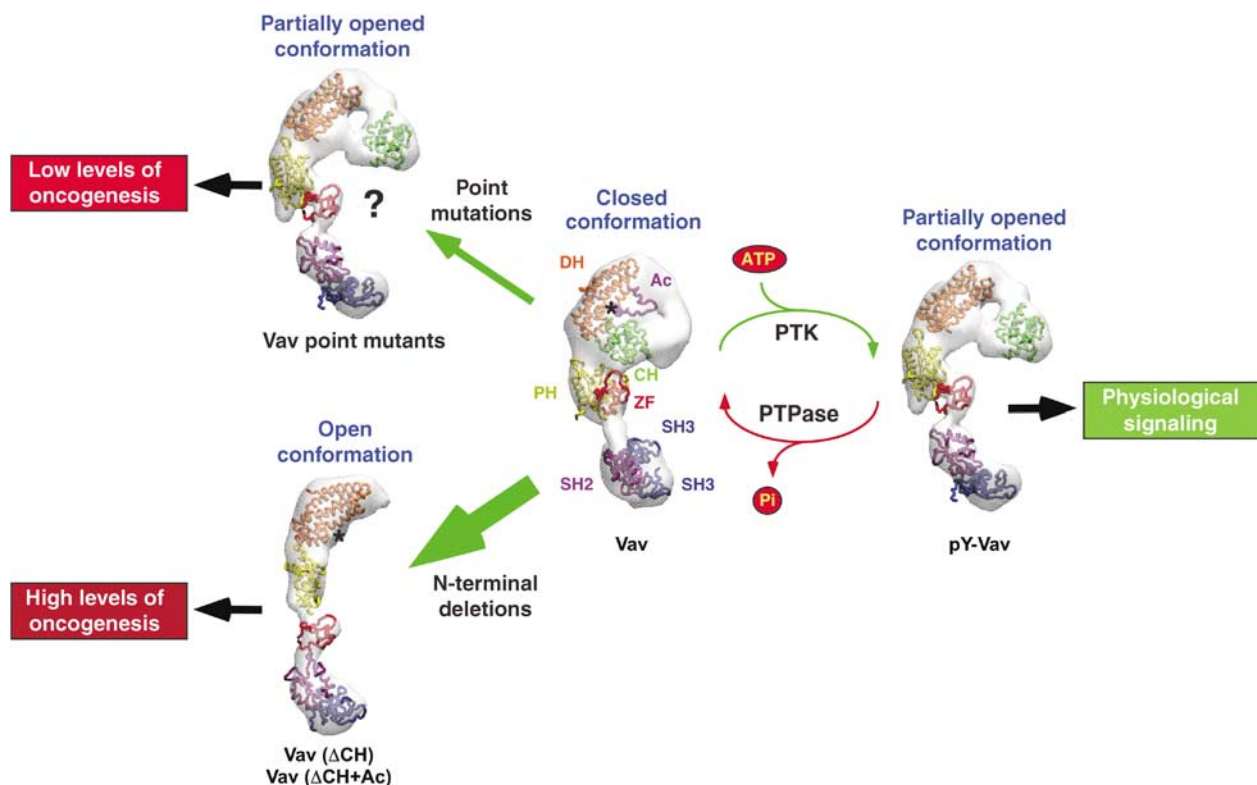
We have described here the tertiary structure of Vav3, pY-Vav3, and Vav3 ( $\Delta 1-144$ ) using EM techniques at middle resolution ( $\approx 22 \text{ \AA}$ ). These molecules have elongated shapes and show their structural domains segregated between a head and a tail area. These two areas harbor the five N-terminal and three C-terminal domains of Vav3, respectively. More importantly, we have shown that the spatial arrangement of these domains changes extensively depending on the functional status of the protein. Thus, it has been observed that the Vav3 head fluctuates between the ‘closed’ conformation of inactive Vav3, the ‘partially opened’ structure of pY-Vav3, and the fully ‘opened’ structure found of Vav3 ( $\Delta 1-144$ ). These changes are not limited to the head area, since the Vav3 tail also changes its orientation relative to rest of the molecule depending on whether Vav3 is in inactive or active states.

Although EM techniques do not provide atomic resolution, our study has given us as a better insight into the nature of the inhibitory structure modulating the exchange activity of Vav proteins. The seminal NMR work with a Vav Ac/DH fragment indicated that such inhibition involved interactions between the catalytic site and an  $\alpha$ -helix containing the inhibitory Y<sup>174</sup> residue (Y<sup>173</sup> in Vav3) (Aghazadeh *et al*, 2000). However, subsequent biochemical analysis suggested that the stability of this inhibitory loop requires the presence of the CH domain when working in the context of full-length proteins (Movilla and Bustelo, 1999; Zugaza *et al*, 2002). Consistent with these observations, we have observed that the CH domain stabilizes the entire Ac region both in the unphosphorylated and phosphorylated states. By contrast, the entire Ac region disappears in the 3D reconstructions of

the EM images derived from CH-deleted Vav3 proteins, indicating that the former region becomes totally disorganized in the constitutively active state of this GEF. The CH-dependent stabilization of the Ac region gives a structural explanation for the paradoxical identical constitutive activities of CH-Ac- and CH-truncated Vav proteins despite the fact that the latter ones keep an intact Ac region and the inhibitory tyrosine (Zugaza *et al*, 2002). Our EM data are also consistent with the biochemical observations postulating an intramolecular interaction between the CH and the ZF region in the inactive state of Vav proteins (Zugaza *et al*, 2002).

The analysis of the movements of the structural domains of the Vav3 head in the three activation states analyzed allows making inferences regarding the regulatory cycle of Vav proteins (Figure 7). In nonstimulated cells, the catalytic site of Vav3 is hidden underneath two overlapping layers of domains, an inner one containing the inhibitory Ac loop and an outer one formed by the CH, the ZF, and the rest of the Ac region (Figure 7). Under these conditions, the access of the GTPase to the DH is totally blocked by a bulky mass of interfering domains. However, upon cell stimulation, the phosphorylation of Vav3 will release the inhibitory Ac loop from the DH, leading to the exposure of the catalytic region to the GTPase (Figure 7). Three phenomena collaborate synergistically to such exposure: the displacement of the CH–Ac region away from the catalytic site, the breakage of the CH/ZF interaction, and a large rotation of the DH that moves the catalytic site away from the other three domains. It is apparent that this structure could be moved back to the ‘closed’ configuration via the dephosphorylation of Vav3 by tyrosine phosphatases at the end of the signaling cycle (Figure 7). However, this fine-tuned yin/yang equilibrium is tilted toward a totally unregulated status upon the deletion of the CH region and the subsequent destabilization of the Ac region (Figure 7). Alternatively, a deregulated activation can be obtained by point mutations that abolish some of the interdomain interactions that occur in the unphosphorylated state (Figure 7). In this cycle, the CH region seems to play important structural roles, contributing to the occlusion of the GTPase binding site when Vav proteins are in the inactive state, the stabilization of the Ac region in both phosphorylated and unphosphorylated states, the proper conformation of the pY-Vav3 head and, finally, the orientation of the PH, ZF, and tail region in all Vav3 states.

Mutagenesis experiments performed with the homologous Vav protein indicated that there is a hierarchy in the importance of the intramolecular contacts maintaining the ‘closed’ conformation of inactive Vav proteins. Thus, we have observed that mutations disrupting the contacts of the Ac inhibitory loop with either the DH region or the CH domain result in oncogenic activation. The combination of mutations in those two areas leads to a synergistic effect, resulting in transformation levels similar to those obtained when the inhibitory Y<sup>174</sup> residue is targeted. These results indicate that the CH and Ac domains work as a single unit to ensure the stabilization of the ‘closed’ conformation of Vav proteins. In contrast, we have observed that mutations disrupting the interaction of the CH with the ZF do not trigger Vav activation *in vivo*, suggesting that this contact contributes to the steric occlusion of the catalytic site and to the orientation of the tail area but not to the stabilization of the overall structure of the head. To date, we could not ever get Vav CH and Ac point



**Figure 7** Model for the regulation of Vav3 catalytic activity by phosphorylation and N-terminal deletions. Asterisks mark the position of the catalytic site. The asterisk in pY-Vav is missing since it is oriented on the other side of the molecule. Lanes in green and red show activation and inactivation steps, respectively. The thickness of each arrow represents the relative level of activation under each condition. The question mark indicates that the structure of the Vav point mutants is hypothetical. PTK, protein tyrosine kinase; PTPase, protein tyrosine phosphatase; Pi, inorganic phosphate. See Discussion for further details.

mutants with transforming activities as high as the truncated proteins lacking the CH region. This is even so when the inhibitory tyrosine residue or the other potential phosphorylation sites of the Ac region are mutated individually or in combination (Lopez-Lago *et al*, 2000). One possible explanation for these results is that point mutants, unlike the CH deletions, do not have dramatic effects on the stability of the Ac region other than exposing the catalytic site (Figure 7). Alternatively, it is possible that different CH areas will have to be targeted simultaneously to reproduce the effects of the domain deletion. Finally, it is also feasible that the higher transforming activity of CH-deleted Vav proteins observed *in vivo* is not due to higher catalytic rates but, rather, to the different orientation of other domains within the molecule (i.e., the PH region) that may affect the level of translocation of Vav proteins to the plasma membrane and/or their binding to other proteins during signal transduction. Future studies in this area will have to address this pending regulatory issue.

Our results have also shed light on other questions regarding the mechanistics of activation of Vav proteins during cell signaling. Thus, we have observed that the Vav3 PH cannot interfere with the catalytic site in any of the Vav3 versions. This result is inconsistent with the proposed model of regulation of Vav proteins by phospholipids that relied on hypothetical inhibitory interactions between the PH and DH areas (Han *et al*, 1998; Das *et al*, 2000). This model was initially appealing from a signaling point of view, since it gave a mechanistically simple explanation for the activation of Rac1

by the Ras/phosphatidylinositol 3-kinase pathway during cell signaling (Rodriguez-Viciano *et al*, 1997). However, this model has been rather controversial, because accumulating data indicate that the activation of Vav proteins occurs through phospholipid-independent events (Inabe *et al*, 2002; Zugaza *et al*, 2002). In fact, recent observations made with *vav*- and *vav3*-deficient lymphocytes indicate that Vav proteins act upstream, not downstream, of phosphatidylinositol 3-kinase (Costello *et al*, 1999; Inabe *et al*, 2002). Given that the PH seems to establish contacts with other domains only through the expected linker regions at the 22 Å resolution obtained, we surmise that the Vav3 PH works as a hinge region whose position will be passively established by the forces induced by the movements of the other Vav3 domains. This is in agreement with our previous biochemical observations indicating that Vav proteins with mutations disrupting the overall structure of the PH region can bind to, and promote nucleotide exchange on, their GTPase substrates *in vitro* (Movilla and Bustelo, 1999; Zugaza *et al*, 2002). Therefore, it is likely that the important role of the PH regions of Vav proteins *in vivo* might be derived from an action *in trans* unrelated to the direct catalytic regulation. Whether such roles are phospholipid-dependent or not remains to be determined.

An important issue in the GEF field is whether the GEF DH-PH core is fixed in time and space. Until now, the analyses of the structures of isolated DH-PH cassettes from a number of Dbl proteins have indicated that they have a rather rigid conformation (Hoffman and Cerione, 2002).

However, a problem with this approach is that it assumes that the architecture of the DH–PH cassettes does not depend on the protein context in which they operate. This assumption may be correct when working with DH–PH cassettes insulated from the influence of other domains or, alternatively, with DH–PH regions located at the GEF C-terminus. However, the DH–PH structure may be totally dependent on the conformational biases imposed by other domains in other instances. Our EM studies indicate that this is the case for Vav3. Thus, we have observed that the orientation of the PH relative to the DH domain is totally different in inactive Vav3, pY-Vav3, and Vav3 ( $\Delta 1-144$ ). Moreover, it is observed that the distance between the DH and PH regions changes in the three Vav3 versions studied, indicating that the DH–PH linker region has some level of structural flexibility. Such movements are probably induced by the intramolecular forces created by the interactions of the CH and Ac regions with the rest of the molecule (in the case of Vav3 and pY-Vav3) or, alternatively, by the relaxation of the Vav3 molecule after the breakage of those interactions (in the case of the N-terminally deleted proteins). Taken together, these observations emphasize the importance of studying these GEFs at the full-length level instead of focusing exclusively on the isolated catalytic regions as it has been the traditional approach in most cases. In addition, they indicate that the biological and biochemical properties of the wild type and oncogenic versions of these proteins may be similar, but not identical.

## Materials and methods

### Sample preparation

Hexahistidine-tagged Vav3 proteins and GST-tagged Lck proteins were obtained from baculovirus-infected *Spodoptera frugiperda* (Sf9) cells using affinity chromatography with nickel- and glutathione-coated beads, respectively (Movilla and Bustelo, 1999). pY-Vav3 was generated by *in vitro* kinase reactions with GST-Lck and subsequent removal of the kinase using glutathione beads (Movilla and Bustelo, 1999). The activity of Vav3 proteins was tested using *in vitro* GDP/GTP exchange assays (Movilla and Bustelo, 1999).

### Electron microscopy

Few microliters of each sample were applied to carbon-coated grids after glow discharge. The sample was then negatively stained with 1% uranyl acetate and observed in a JEOL 1230 electron microscope operated at 100 kV. Micrographs were recorded at a nominal magnification of 50 000 under low-dose conditions.

## References

- Aghazadeh B, Lowry WE, Huang XY, Rosen MK (2000) Structural basis for relief of autoinhibition of the Dbl homology domain of proto-oncogene Vav by tyrosine phosphorylation. *Cell* **102**: 625–633
- Bustelo XR (2000) Regulatory and signaling properties of the Vav family. *Mol Cell Biol* **20**: 1461–1477
- Bustelo XR (2002) Regulation of Vav proteins by intramolecular events. *Front Biosci* **7**: d24–d30
- Costello PS, Walters AE, Mee PJ, Turner M, Reynolds LF, Prisco A, Sarner N, Zamoyska R, Tybulewicz VL (1999) The Rho-family GTP exchange factor Vav is a critical transducer of T cell receptor signals to the calcium, ERK, and NF- $\kappa$ B pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 3035–3040
- Das B, Shu X, Day GJ, Han J, Krishna UM, Falck JR, Broek D (2000) Control of intramolecular interactions between the pleckstrin

### Image processing and 3D reconstructions

Micrographs were digitized using a Minolta Dimage Scan Multi Pro scanner and averaged to a final 4.1 Å/pixel at the specimen. Single particles were selected from several micrographs for Vav3, pY-Vav3, and Vav3 ( $\Delta 1-144$ ), using the ‘boxer’ command from EMAN (Ludtke *et al*, 1999). Particles were normalized, centered, and subjected to 3D refinement as implemented in EMAN (Ludtke *et al*, 1999). Initial volumes were generated by image classification of the whole data set into few average images to build a 3D model using the common lines approach (see Supplementary data for further details). The reconstructions were rendered to show 100% of the protein mass assuming an average density of 1.35 g/ml. Volumes were visualized using VMD (Humphrey *et al*, 1996).

### Fitting of atomic structures into EM maps

Atomic structures of selected domains (calponin CH domain, PDB entry 1H67; Vav Ac/DH domain, PDB entry 1F5X; Sos1 PH domain, PDB entry 1AWE; PKC ZF, PDB entry 1TBO; Grb2, PDB entry 1GRI) were fitted into the EM map computationally using the SITUS software (Wriggers and Birmanns, 2001). To help visualize the putative binding site of the Rho/Rac GTPase in Vav3, we positioned the Tiam1 DH domain in an equivalent orientation to the one in Vav3 and then left Rac1 to model a chimeric Rac1/Vav3 structure. The Tiam1 DH/Rac1 complex utilized was derived from PDB entry 1FOE (Worthylake *et al*, 2000). All volumes were rendered and visualized using VMD (Humphrey *et al*, 1996).

### Pull-down and transforming activity assays

Pull-down assays of GST-CH mutants and MBP-ZF fusion proteins were performed as indicated (Zugaza *et al*, 2002). Transforming activity of *vav*-encoding constructs was quantified using focus formation assays (Zugaza *et al*, 2002). Mutations were performed in the mouse *vav* proto-oncogene cDNA with appropriate combinations of primers using a commercial mutagenesis kit (Quickchange, Stratagene). Other Vav mutants used (Y174F,  $\Delta 1-144$ ,  $\Delta 1-189$ ) have been previously described (Zugaza *et al*, 2002).

### Supplementary data

Supplementary data are available at *The EMBO Journal* Online.

## Acknowledgements

This work was supported by the US National Cancer Institute (5 RO1 CA073735-07) to XRB, the Spanish Ministry of Education and Science (MES) Biomedicine Program to OL (SAF2002-01715) and XRB (SAF2003-00028), and an MES Action on Genomics & Proteomics (GEN2003-20239-C06-00) to both XRB and OL.

### Accession numbers

The EM reconstructions have been deposited in the Macromolecular Structure Database (<http://www.ebi.ac.uk/msd/>) with accession codes EMD-1103 (Vav3), EMD-1104 (pY-Vav3), and EMD-1105 (Vav3( $\Delta 1-144$ )).

- homology and Dbl homology domains of Vav and Sos1 regulates Rac binding. *J Biol Chem* **275**: 15074–15081
- Han J, Luby-Phelps K, Das B, Shu X, Xia Y, Mosteller RD, Krishna UM, Falck JR, White MA, Broek D (1998) Role of substrates and products of PI 3-kinase in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav. *Science* **279**: 558–560
- Hoffman GR, Cerione RA (2002) Signaling to the Rho GTPases: networking with the DH domain. *FEBS Lett* **513**: 85–91
- Humphrey W, Dalke A, Schulten K (1996) VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* **14**: 27–38
- Inabe K, Ishiai M, Scharenberg AM, Freshney N, Downward J, Kurosaki T (2002) Vav3 modulates B cell receptor responses by regulating phosphoinositide 3-kinase activation. *J Exp Med* **195**: 189–200

- Lopez-Lago M, Lee H, Cruz C, Movilla N, Bustelo XR (2000) Tyrosine phosphorylation mediates both activation and down-modulation of the biological activity of Vav. *Mol Cell Biol* **20**: 1678–1691
- Ludtke SJ, Baldwin PR, Chiu W (1999) EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions. *J Struct Biol* **128**: 82–97
- Ludtke SJ, Jakana J, Song JL, Chuang DT, Chiu W (2001) A 11.5 Å single particle reconstruction of GroEL using EMAN. *J Mol Biol* **314**: 253–262
- Maignan S, Guilloteau JP, Fromage N, Arnoux B, Becquart J, Ducruix A (1995) Crystal structure of the mammalian Grb2 adaptor. *Science* **268**: 291–293
- Movilla N, Bustelo XR (1999) Biological and regulatory properties of Vav-3, a new member of the Vav family of oncoproteins. *Mol Cell Biol* **19**: 7870–7885
- Orlova EV, Saibil HR (2004) Structure determination of macromolecular assemblies by single-particle analysis of cryo-electron micrographs. *Curr Opin Struct Biol* **14**: 584–590
- Rodriguez-Viciano P, Warne PH, Khwaja A, Marte BM, Pappin D, Das P, Waterfield MD, Ridley A, Downward J (1997) Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras. *Cell* **89**: 457–467
- Rossman KL, Worthylake DK, Snyder JT, Siderovski DP, Campbell SL, Sondek J (2002) A crystallographic view of interactions between Dbs and Cdc42: PH domain-assisted guanine nucleotide exchange. *EMBO J* **21**: 1315–1326
- Schuebel KE, Movilla N, Rosa JL, Bustelo XR (1998) Phosphorylation-dependent and constitutive activation of Rho proteins by wild-type and oncogenic Vav-2. *EMBO J* **17**: 6608–6621
- Soisson SM, Nimnual AS, Uy M, Bar-Sagi D, Kuriyan J (1998) Crystal structure of the Dbl and pleckstrin homology domains from the human Son of sevenless protein. *Cell* **95**: 259–268
- Turner M, Billadeau DD (2002) VAV proteins as signal integrators for multi-subunit immune-recognition receptors. *Nat Rev Immunol* **2**: 476–486
- Van Aelst L, D'Souza-Schorey C (1997) Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* **11**: 2295–2322
- Worthylake DK, Rossman KL, Sondek J (2000) Crystal structure of Rac1 in complex with the guanine nucleotide exchange region of Tiam1. *Nature* **408**: 682–688
- Wriggers W, Birmanns S (2001) Using situs for flexible and rigid-body fitting of multiresolution single-molecule data. *J Struct Biol* **133**: 193–202
- Zheng Y (2001) Dbl family guanine nucleotide exchange factors. *Trends Biochem Sci* **26**: 724–732
- Zugaza JL, Lopez-Lago MA, Caloca MJ, Dosil M, Movilla N, Bustelo XR (2002) Structural determinants for the biological activity of Vav proteins. *J Biol Chem* **277**: 45377–45392

**GLOBAL CONFORMATIONAL REARRANGEMENTS DURING  
THE ACTIVATION OF THE GDP/GTP EXCHANGE FACTOR**

**Vav3**

by

**Óscar Llorca, Ernesto Arias-Palomo, José L. Zugaza, and**

**Xosé R. Bustelo**

**SUPPLEMENTARY INFORMATION**

## **SUPPLEMENTARY TEXT, RESULTS SECTION**

### **Analysis of electron microscopy images**

Protein samples were used for EM determination, following recently developed approaches that allow the resolution of proteins within a middle range of molecular weight (Ludwig et al., 2003; Martin-Benito et al., 2002; Okorokov et al., 2004; Orlova and Saibil, 2004; Rivera-Calzada et al., 2003). Selected EM images for each Vav3 protein (see Main Text) were processed independently using the EMAN software package (Ludtke et al., 1999). For each data set, similar images were grouped together, aligned, and averaged using several routines implemented in EMAN to generate a collection of reference-free class-averages without imposing any initial bias. For each sample, these averages were then used to build an initial “reference-free” 3D model, which was refined through widely used angular reconstitution techniques (Ludtke et al., 2004; Sengupta et al., 2004; Sewell et al., 2004; van Heel et al., 1996). During this 3D refinement, particles were classified into homogeneous averages linked to certain projection angles. The EMAN software can dramatically reduce model bias during refinement by iterative aligning of the particles within each class (Ludtke et al., 2004). Several user-defined parameters were adjusted to minimize model bias and produce self-consistent final class-averages (Figure 2C-E), which were then used to build the definitive 3D reconstructions of the three Vav3 states (see below). To further verify that model bias was not a problem in our processing, each of these final reconstructions was used as starting models for a different data set. Volumes were found to evolve towards their previously obtained solution after few iterations, a result that further strengthened the reproducibility and model-independent properties of our maps.

Consistent with the biochemical homogeneity of our protein preparations (Figure 1C,D), each of the samples was also observed to be structurally homogeneous during image processing. Several parameters during refinement were set to keep only the most self-consistent data. Within each class, a histogram of similarity among the particles was analyzed and only the more similar particles were included in the average. Similarly, only 2D averages with a phase error below a certain threshold value were allowed to build each 3D volume. This approach eliminates damaged particles and those in a different structural state. Even with very stringent settings, a relatively small number of particles were discarded and the final reconstructions were built from structurally self-consistent data, where conformational variability must be restricted to differences undetected to our resolution level.

### **Location of domains into EM maps by fitting atomic data**

To understand in structural terms the changes occurring during the two types of Vav3 activation, we next used fitting tools to locate each of the eight Vav3 structural domains within the reconstructed volumes (see main text). To this end, the indicated atomic structures of single domains were accommodated into the Vav3 volumes using SITUS, an unbiased computing technique (Wriggers et al., 1999; Wriggers & Birmanns, 2001). In this process, we performed a full 6-dimensional search of each EM map with each of the atomic structures using a Laplacian filter, a contour-based matching criterion that enables a reliable docking of smaller components into the EM density of larger structures (Chacon and Wriggers, 2002). The location given the highest score was selected for each domain, though actually most top-ranked solutions provided coincident results. Once the location of each domain was assigned, we next

determined the orientation of each domain within the assigned regions. To this end, we utilized two different criteria. First, we used the top preferred orientation given from each domain by the Laplacian filter. Secondly, we utilized vector quantification as provided in SITUS to further investigate the orientation of each domain within each Vav3 molecule under study. Such strategy allowed us to evaluate the preferred orientation of Vav3 domains according to their “root mean square deviation” score. For some domains, such as the DH domain in all three proteins and the CH domain in inactive Vav3, several top solutions oriented the domains in a similar manner, suggesting they are the most likely orientation. In other cases, such as the PH domain or the CH domain in pY-Vav3 several orientations were obtained and these ambiguities are discussed specifically in the next sections. Nevertheless, it is important to stress that such uncertainties do not disqualify the correct mapping of the domains and the interpretation of the conformational changes observed in each version of Vav3 protein. Taken together, this mapping strategies allowed us to assign specific locations for each domain within the 3D reconstructions. Several indications suggest that the solutions obtained represent the true molecular architecture of Vav3, pY-Vav3 and Vav3 ( $\Delta$ 1-144): i) each domain was always found in similar locations in the independent reconstructions of the three versions of Vav3 studied; ii) the structure of CH-deleted Vav3 ( $\Delta$ 1-144) lacks the part of the volume that had been assigned by SITUS to the CH in the full-length proteins (see Main Text, Figure 6); iii) due to the different shapes and dimensions of Vav3 domains, they could hardly be placed anywhere else in the molecule. For instance, if the elongated Vav DH domain, the flat Sos1 PH domain, or the rough triangular shape of Grb2 are manually fitted into the 3D structure of Vav3 ( $\Delta$ 1-144), they can barely be placed in different locations to

those computationally assigned by SITUS; iv) some of the predicted interacting interfaces were corroborated biochemically (see Main Text, Fig. 5). v) As already indicated in the main text, the accuracy of our fitting strategy was further supported by performing reverse volume reconstructions. Thus, when the atomic structures of the calponin, Vav, Sos1, PKC, and Grb2 domains were filtered to the 22 Å resolution in the predicted orientations of our modeling, the volumes obtained were very similar to those derived from EM images (Figure S1). vi) Furthermore, when the atomic models were fitted as rigid bodies into the EM densities using the SITUS CoLoRes command (Wriggers and Birmanns, 2001), we obtained correlations above 0.68, 0.57 and 0.58 for Vav3, pY-Vav3 and Vav3 (□1-144), respectively. This is a good indication of the resemblance of the atomic models and the EM data, especially if we consider that only 85% of the total sequence of Vav3 has been accounted for by the atomic models.

**SUPPLEMENTARY TEXT, MATERIALS AND METHODS SECTION****Protein purification and exchange activities**

The development of Vav3-expressing baculovirus has been described before (Movilla and Bustelo, 1999). Exponentially growing Sf9 cells ( $2 \times 10^6$  cells/ml) were infected with the appropriate high-titer baculovirus supernatant at a multiplicity of infection of 5-10. After 48 hr, cells were harvested by centrifugation, washed twice with ice-cold phosphate buffered saline solution (PBS), and the final cell pellets stored frozen at  $-70^{\circ}\text{C}$ . For purification, cell pellets were thawed on ice and sonicated in the presence of lysis buffer (50 mM phosphate buffer [pH 8.0], 300 mM NaCl, 0.1% Triton X100, 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) and 10 mM imidazole (Sigma)). After clearing the cell lysates by centrifugation at 12,000 rpm for 30 min at  $4^{\circ}\text{C}$ , supernatants were incubated with nickel beads (Qiagen) at  $4^{\circ}\text{C}$  for 2 hr. Adsorbed proteins were washed three times with 50 mM phosphate buffer [pH 8.0], 300 mM NaCl, and 20 mM imidazole. Proteins were eluted in two steps by addition of 4 ml of 100 and 250 mM imidazole in 50 mM phosphate buffer [pH8.0] plus 300 mM NaCl. Fractions containing eluted proteins were pooled, dialyzed overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  in 50 mM phosphate buffer [pH 8.0], 100 mM NaCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM dithiothreitol (Sigma), and 10% glycerol. Dialyzed proteins were concentrated using Centricon YM-30 columns (Millipore), quantified by SDS-PAGE in the presence of known concentrations of bovine serum albumin (BSA) as standard, and stored in aliquots at  $-70^{\circ}\text{C}$  until further use. The purified GST-Lck from Sf9 cells was a gift from Dr. J. Fragnoli (Bristol-Myers Squibb Pharmaceutical Research Institute, Princeton, NY). GTP-binding proteins were purified from *E. coli* as GST fusion proteins, according to standard procedures.

In vitro kinase reactions were conducted for 45 min at room temperature in 20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 5 mM MgCl<sub>2</sub> and 1 mM ATP. When appropriate, reactions were diluted in dialysis buffer (see above) and incubated with glutathione beads (Amersham Biochemicals) to eliminate the GST-tagged kinase. Flow-throughs containing phosphorylated Vav3 were tested by SDS-PAGE, dialyzed as above, concentrated in Microcon YM-30 columns (Millipore), and stored in aliquots at -70°C until further use.

### **Image processing and three-dimensional reconstructions**

Single particles were selected from several micrographs for Vav3, phosphorylated Vav3, and Vav3 (□1-144), respectively, using the “boxer” command from EMAN (Ludtke et al., 1999). Particles were normalized, centered, and subjected to 3D refinement as implemented in EMAN (Ludtke et al., 1999). Initial volumes were generated by reference-free image classification of each data set into average images to build a 3D model using the common lines approach. Projections of each initial model were used to improve image classification and refine the volume. In order to minimize model bias, particles within each class were iteratively aligned and averaged during 8 cycles before the final averaging using the “classiter” parameter in EMAN. The “classkeep” parameter in the “classalign2” command was used to automatically eliminate particles during 2D alignment of each class that were worse than a cut-off value determined as a function of the standard deviation. During the final steps of refinement this parameter was adjusted to keep the most self-consistent 2D averages. Also, several values of the “hard” parameter in EMAN were tested to build each 3D model, so that averages with a higher phase error with the 3D reconstruction than a

certain threshold were discarded. Particles eliminated in one refinement cycle were not completely discarded but used in the following iterations. The criterion to state the convergence of the maps was that the volumes remained unchanged during several consecutive cycles using a low angle search and strict values in the “classkeep” and “classiter” parameters. Handedness of the final volumes was defined after the fitting of the atomic structure of Vav DH domain (PDB entry 1F5X) into wild type Vav3. This domain, when containing the Ac extension, encompasses an extensive region in Vav3 that could only be adequately fitted into one of the two possible hand versions of wild type Vav3. This handedness was maintained throughout the rest of the reconstructions.

**REFERENCES TO SUPPLEMENTARY INFORMATION**

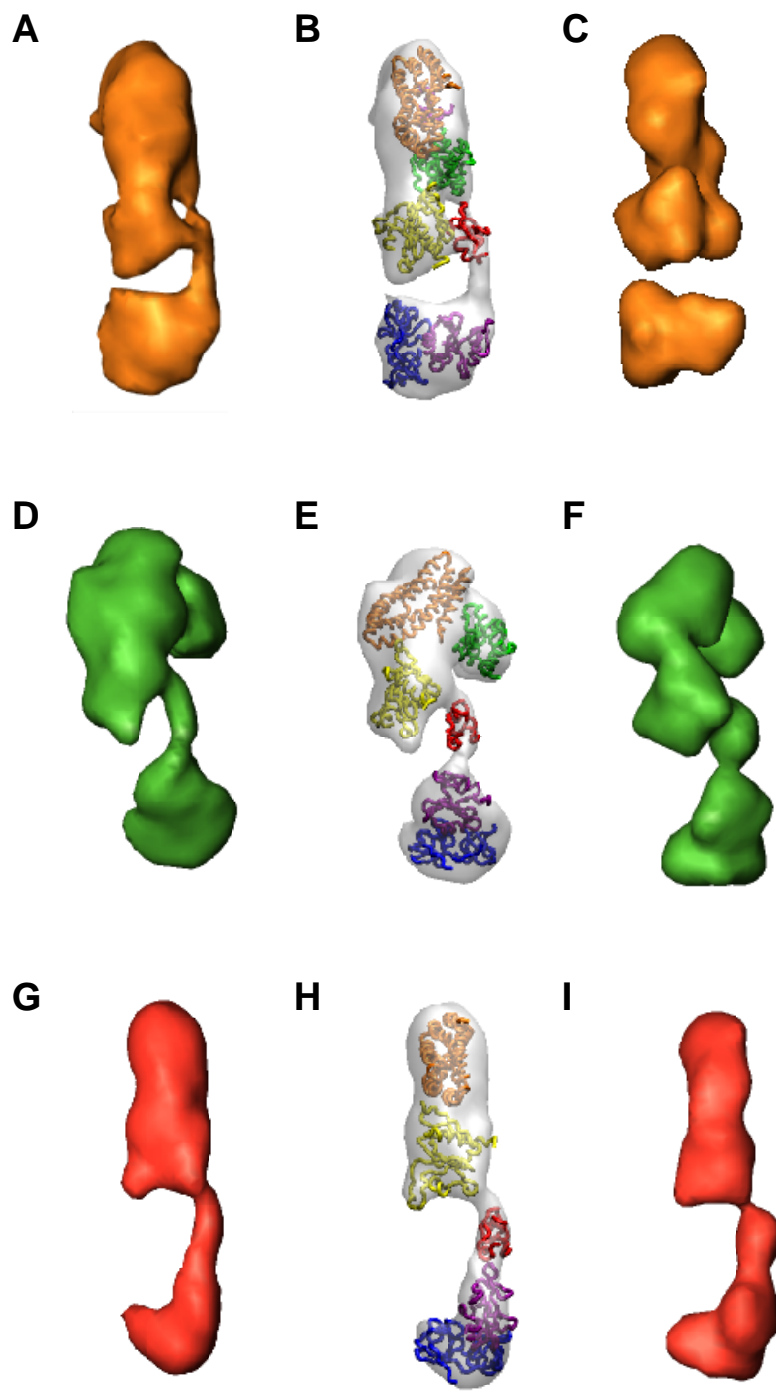
- Chacon, P. and Wriggers, W. (2002) Multi-resolution contour-based fitting of macromolecular structures. *J Mol Biol*, **317**, 375-384.
- Ludtke, S.J., Baldwin, P.R. and Chiu, W. (1999) EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions. *J Struct Biol*, **128**, 82-97.
- Ludtke, S.J., Chen, D.H., Song, J.L., Chuang, D.T. and Chiu, W. (2004) Seeing GroEL at 6 Å resolution by single particle electron cryomicroscopy. *Structure (Camb)*, **12**, 1129-1136.
- Ludwig, K., Baljinnyam, B., Herrmann, A. and Bottcher, C. (2003) The 3D structure of the fusion primed Sendai F-protein determined by electron cryomicroscopy. *Embo J*, **22**, 3761-3771.
- 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) Structure of eukaryotic prefoldin and of its complexes with unfolded actin and the cytosolic chaperonin CCT. *Embo J*, **21**, 6377-6386.
- Movilla, N. and Bustelo, X.R. (1999) Biological and regulatory properties of Vav-3, a new member of the Vav family of oncoproteins. *Mol Cell Biol*, **19**, 7870-7885.
- Okorokov, A.L., Orlova, E.V., Kingsbury, S.R., Bagneris, C., Gohlke, U., Williams, G.H. and Stoeber, K. (2004) Molecular structure of human geminin. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 1021-1022.
- Orlova, E.V. and Saibil, H.R. (2004) Structure determination of macromolecular assemblies by single-particle analysis of cryo-electron micrographs. *Curr Opin Struct Biol*, **14**, 584-590.

- Rivera-Calzada, A., Robertson, D., MacFadyen, J.R., Boskovic, J., Isacke, C.M. and Llorca, O. (2003) Three-dimensional interplay among the ligand-binding domains of the urokinase-plasminogen-activator-receptor-associated protein, Endo180. *EMBO Rep*, **4**, 807-812.
- Sengupta, J., Nilsson, J., Gursky, R., Spahn, C.M., Nissen, P. and Frank, J. (2004) Identification of the versatile scaffold protein RACK1 on the eukaryotic ribosome by cryo-EM. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 957-962.
- Sewell, B.T., Best, R.B., Chen, S., Roseman, A.M., Farr, G.W., Horwich, A.L. and Saibil, H.R. (2004) A mutant chaperonin with rearranged inter-ring electrostatic contacts and temperature-sensitive dissociation. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 1128-1133.
- van Heel, M., Harauz, G., Orlova, E.V., Schmidt, R. and Schatz, M. (1996) A new generation of the IMAGIC image processing system. *J Struct Biol*, **116**, 17-24.
- Wriggers, W. and Birmanns, S. (2001) Using situs for flexible and rigid-body fitting of multiresolution single-molecule data. *J Struct Biol*, **133**, 193-202.

## SUPPLEMENTARY INFORMATION

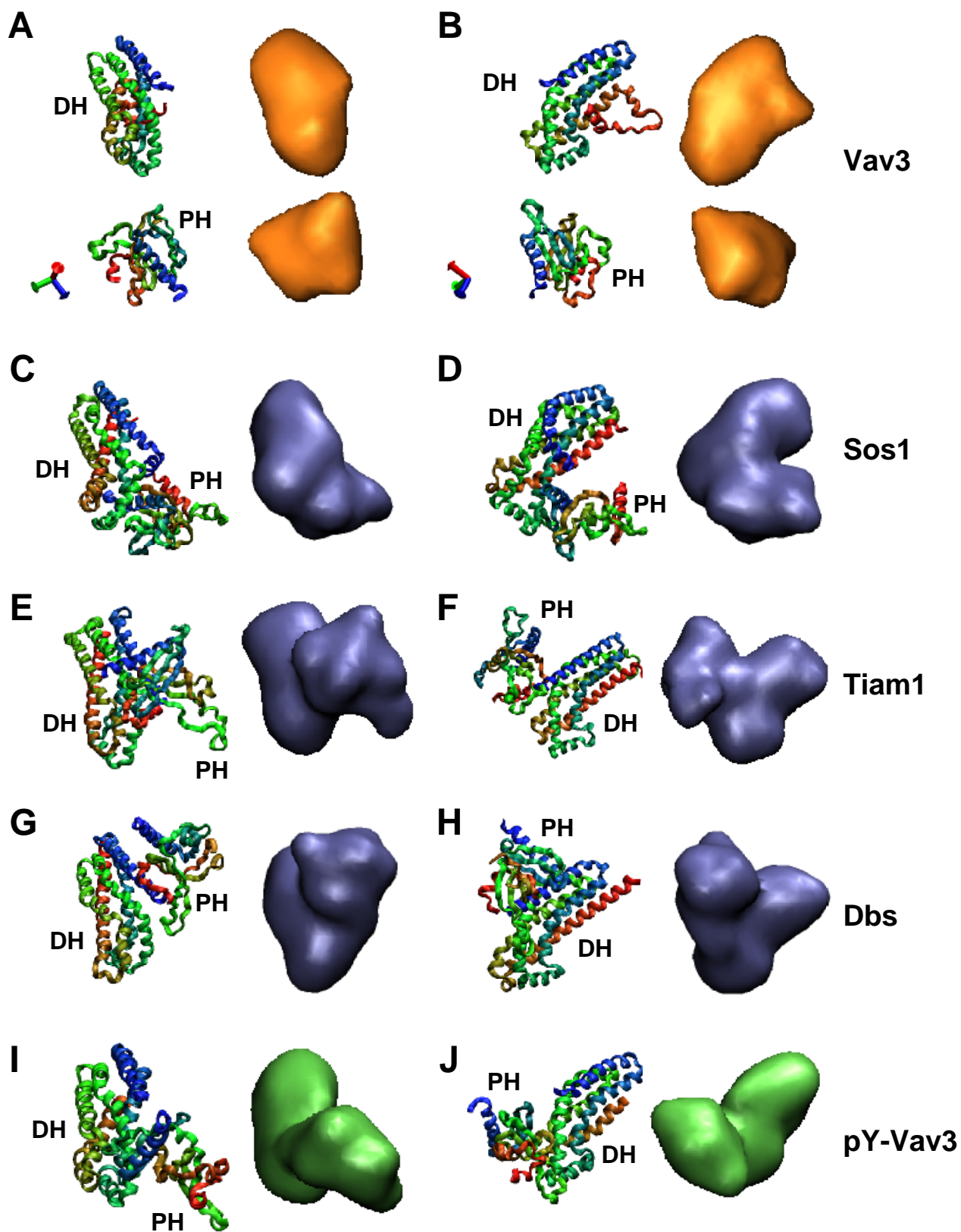
**FIGURE S1.** Selected views of Vav3 (A,B), pY-Vav3 (D,E) and Vav3 (□1-144) (G,H) reconstructed volumes before (A,D,G) and after (B,E,H) fitting the atomic structures of the indicated domains into the EM density. In order to visually support the quality of our models, the resulting fittings for Vav3 (C), pY-Vav3 (F) and Vav3 (□1-144) (I) were low-passed filtered at a resolution identical to that of the EM reconstructions (22 Å). A close resemblance between the 3D experimental volumes and the fitted models is observed at this resolution. Please, bear in mind that some parts of the reconstructions (those corresponding to the interdomain linker regions) have not been fitted with any atomic data.

Supplementary Fig. S1  
Llorca et al.



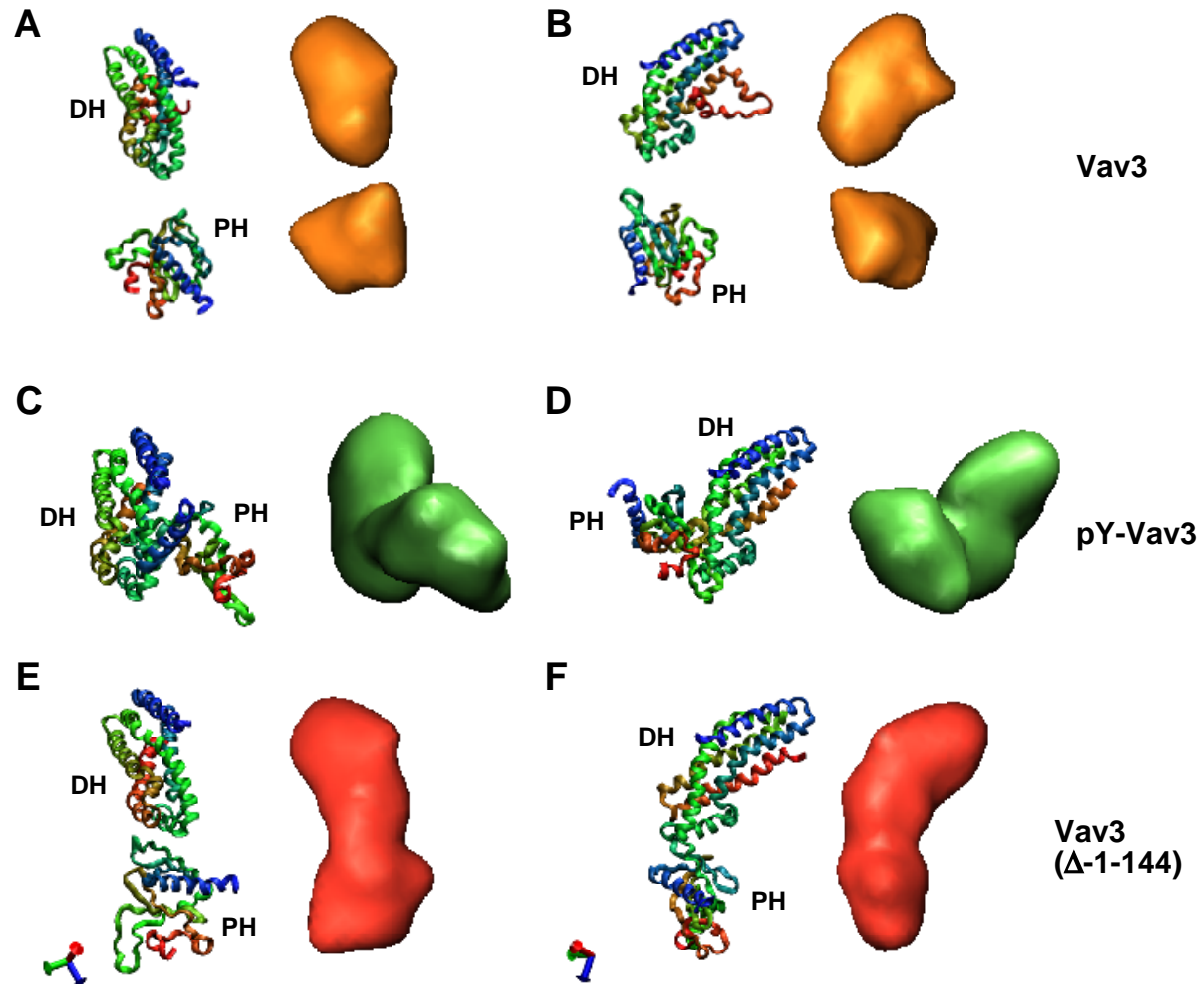
## SUPPLEMENTARY INFORMATION

**FIGURE S2.** Comparison of the relative orientation between the DH and PH domains of inactive Vav3 (A,B), Sos1 (C,D), Tiam1 (E,F), Dbs (G,H), and pY-Vav3 (I,J). Within each panel, we show on the right the DH-PH cassette volumes as they would be seen after filtration at a resolution of 22 Å. The volumes of Vav3 and pY-Vav3 are shown on orange and green, respectively. The volumes of Sos1, Tiam1 and Dbs are shown on ice blue. On the left of each panel, we show the chain structure of the DH and PH domains of the indicated proteins. To help visualization, the chains of each domain are colored from red to dark blue to mark the N- and C-terminus, respectively.



## SUPPLEMENTARY INFORMATION

**FIGURE S3.** Movements of the DH and PH domains during the normal (phosphorylation-dependent) and oncogenic (N-terminal deletion) activation of Vav proteins. The structure of the DH-PH cassette in Vav3 (A,B), pY-Vav3 (C,D), and Vav3 ( $\Delta$ 1-144) (E,F) are presented either as secondary structure (left side) or volumes (right side, resolution of 22 Å). The secondary structure of each domain is colored from red to dark blue to mark the N- and C-terminus of each domain, respectively. The volumes of Vav3, pY-Vav3 and Vav3 ( $\Delta$ 1-144) are shown on orange, green, and red, respectively.





## Capítulo 3.2: Estructura 3D de la quinasa Syk resuelta mediante microscopía electrónica de partículas individuales

Ernesto Arias-Palomo<sup>1</sup>, María A. Recuero-Checa<sup>1</sup>, Xosé R. Bustelo<sup>2</sup>, Oscar Llorca<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, España.

<sup>2</sup>Centro de Investigación del Cáncer, Universidad de Salamanca-CSIC, Campus Unamuno, Salamanca, España.

La quinasa citoplásmica Syk juega funciones clave en las respuestas inmunes y está formada por dos dominios reguladores SH2 (*Src homology 2*), situados en el extremo N-terminal, seguidos de la región catalítica. Hasta la fecha, únicamente se han determinado las estructuras de estos dominios aislados resueltos a resolución atómica. Para ahondar en el conocimiento de la estructura de la proteína Syk completa hemos empleado la microscopía electrónica de partículas individuales. Syk adquiere una conformación cerrada con grandes similitudes con la estructura de Zap-70, otro miembro de la familia Syk, en su estado inactivo. Esta conformación sugiere que los dominios N-terminales de Syk inhiben su actividad. Además, los sitios de unión a tirosinas fosforiladas de ambos dominios SH2 no están ocluidos y, por lo tanto, potencialmente pueden interactuar con otras fosfoproteínas.

## 3D structure of Syk kinase determined by single-particle electron microscopy

Ernesto Arias-Palomo<sup>a</sup>, María A. Recuero-Checa<sup>a</sup>, Xosé R. Bustelo<sup>b,\*</sup>, Oscar Llorca<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Spanish National Research Council, CSIC), Ramiro de Maeztu, 9, E28040 Madrid, Spain*

<sup>b</sup> *Centro de Investigación del Cáncer and Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, CSIC-University of Salamanca, Campus Unamuno, E37007 Salamanca, Spain*

Received 28 August 2007; received in revised form 15 October 2007; accepted 15 October 2007

Available online 26 October 2007

### Abstract

The cytoplasmic Syk kinase plays key roles in immune responses and comprises two N-terminal regulatory Src homology 2 (SH2) domains followed by a catalytic region. Atomic structures of these domains have only been solved in isolation. To gain insights into the three-dimensional structure of full-length Syk, we have used single-particle electron microscopy. Syk acquires a closed conformation resembling the inhibited structure of Zap-70, another member of the Syk family. Such configuration suggests an inhibition of the N-terminal domains on its catalytic activity. The phosphotyrosine binding pockets of both SH2 domains are not occluded and they could interact with other phosphoproteins.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Single-particle electron microscopy; EM; Syk; Zap-70; Kinases

### 1. Introduction

Spleen tyrosine kinase (Syk) family proteins are non-receptor protein tyrosine kinases (PTKs) that associate with activated antigen receptors at the inner side of the plasma membrane [1,2]. Over 10 distinct families of non-receptor PTKs exist including the Src, Tec, JAK, Csk, Abl and Syk families [1,3]. A common structural feature of the Syk family is the presence of two N-terminal SH2 domains located in tandem and a C-terminal catalytic region (Fig. 1A). These three domains are separated physically by intervening amino acid sequences that are usually referred to as interdomain A (located between the two SH2 regions) and B (located between the second SH2 and the kinase domain) (Fig. 1A) [4]. In vertebrates, the Syk family is composed of two members, Syk and Zap-70.

Previous reports have shown that the activation of Syk proteins during the stimulation of antigen receptors requires a

complex cascade of signalling events. Those involve the previous stimulation of upstream kinases of the Src family by the antigen-bound receptors, the Src family-dependent phosphorylation of two tyrosine residues located in the immunoreceptor tyrosine-based activating motifs (ITAMs) of ancillary molecules to the antigen receptors, the translocation of Syk family members to the plasma membrane via the interaction of their SH2 domains with those phosphorylated ITAM motifs, and the eventual activation of Syk proteins by either *trans*-phosphorylation by Src family kinases (in the case of Zap-70) or by auto-phosphorylation (in the case of Syk) [5]. Syk undergoes conformational changes upon auto-phosphorylation and/or binding to phosphorylated ITAMs that likely contribute to activate the protein kinase [6–8]. Upon activation, Syk family proteins promote the stimulation of downstream signal transduction cascades that are essential for the developmental and effector responses of several haematopoietic cell lineages and, when deregulated, for the progression of a several human pathologies [9,10]. Despite the important roles of Syk in cell signalling and pathophysiological events, their mechanism of activation at the structural level remains still obscure. Experimental evidence indicates that specific and non-overlapping Syk phosphorylation sites are important for either the stimulation of the intrinsic

\* Corresponding authors. O. Llorca is to be contacted at tel.: +34 91 8373112x4446; fax: +34 91 5360432. X.R. Bustelo, tel.: +34 923294802; fax: +34 923294743.

E-mail addresses: [xbustelo@usal.es](mailto:xbustelo@usal.es) (X.R. Bustelo), [olllorca@cib.csic.es](mailto:olllorca@cib.csic.es) (O. Llorca).

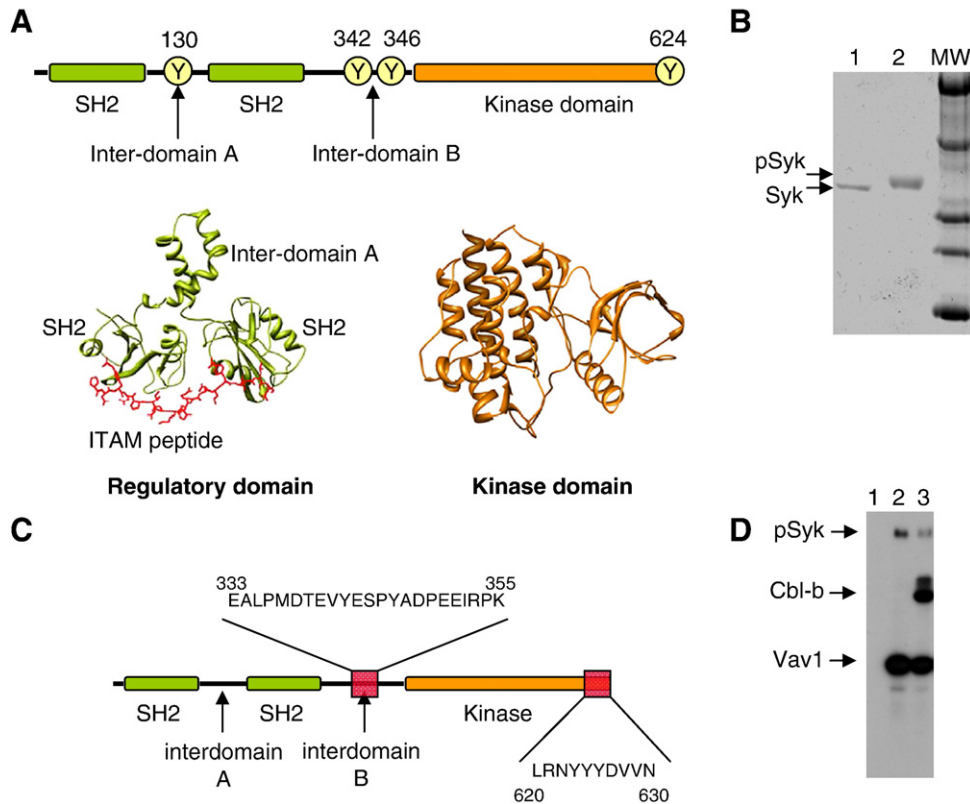


Fig. 1. Structure and purification of GST-Syk. (A) Schematic representation of the domain organization of Syk highlighting some of the tyrosines that can become phosphorylated. At the bottom, atomic structure of the regulatory domains of Syk bound to an ITAM peptide (PDF file 1A81) [4] and the kinase domain (PDB file 1XBA) [16]. (B) SDS-PAGE gel of non-phosphorylated (0.5  $\mu$ g, lane 1) and phosphorylated (1  $\mu$ g, lane 2) Syk-GST. Phosphorylation assays were performed by incubation 1 mg/ml of Syk-GST with 1 mM ATP and 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> for 60 min at 25 °C. (C) Scheme of the two phosphorylated peptides detected using mass spectrometry. (D) Syk can auto-phosphorylate and also phosphorylate their targets as shown by autoradiography using radioactive ATP. Lane 1, Syk+Vav1 CH-Ac before the reaction; Lane 2, Syk+Vav1 CH-Ac after the kinase reaction; Lane 3, Syk+Vav1 CH-Ac+N-Cbl-b after the kinase reaction.

kinase activity of Syk or for serving as docking sites for the recognition of Syk downstream targets. Thus, tyrosine residues located in the interdomain B have been implicated in the regulation of Syk kinase activity [11]. Furthermore, phosphorylated Tyr342 is recognized by the SH2 domain of Vav1, a phosphorylation-dependent exchange factor that plays crucial roles in lymphocyte signalling [12]. The phosphorylation of Tyr342 and Tyr346 is also required for the optimal binding of another important signalling mediator, the phospholipase C- $\gamma$  [13].

Although Syk and Zap-70 belong to the same family of PTKs they reveal substantial differences in their mechanisms of regulation [1]. Whereas Zap-70 expresses in T and NK cells, Syk regulates signalling in B cells, mast cells, neutrophils and macrophages. More importantly, the kinase activity of Syk is intrinsically 100-fold higher than that of Zap-70 and its stimulation does not require phosphorylation by kinases of the Src family. In contrast, activation of Zap-70 strictly requires the phosphorylation of tyrosine residues in its inter-SH2 linker region by Src. Moreover, interdomain B is 23 amino acid longer in Syk than in Zap-70 likely influencing its association with phosphorylated targets. Structural studies have provided some clues on the structural basis of these functional differences between Syk and Zap-70. The atomic structure of a

tandem SH2 domain of Syk bound to a double phosphorylated ITAM peptide shows that each SH2 functions as an independent binding module [4]. In contrast, Zap-70 utilises both SH2 domains as a binding module for just one tyrosine [14]. More recently, the atomic structure of the inhibited conformation of Zap-70 has been solved by X-ray crystallography [15] revealing that the interaction between the tandem SH2 region and the catalytic domain likely reduces the flexibility required for catalysis. Importantly, two tyrosine residues located in the inter-SH2 region interact with the kinase domain to maintain this auto-inhibited conformation. These residues must become phosphorylated by Src kinases in order to activate Zap-70.

A drawback for the full understanding of the mechanism of activation of the Syk protein is the lack of information regarding the three-dimensional (3D) structure of the full-length protein. Indeed, up to now, only 3D structures of fragments of Syk have been characterized using either crystallization or nuclear magnetic resonance (NMR) techniques [4,16]. We have used single-particle electron microscopy (EM) [17] to elucidate the 3D structure of full-length Syk in its non-phosphorylated state at low resolution. This approach has revealed a compact conformation shaped by the regulatory and the kinase domains similar to that of Zap-70.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Purification of GST–Syk and auto-phosphorylation

Rat Syk–GST was cloned as described and purified as a GST fusion protein [18,19]. Phosphorylation assays were performed by incubation 1 mg/ml of Syk–GST with 1 mM ATP and 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> for 60 min at 25 °C.

### 2.2. Kinase assays

To test the kinase activity of GST–Syk, we used an *in vitro* kinase reaction assay in the presence of [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP, as indicated before [20]. As substrates, we used GST proteins fused to either the Vav1 CH-Acidic region [21] or the N-terminal region of Cbl-b [22] that were purified from IPTG-induced *Escherichia coli* cultures using glutathione-coated beads.

### 2.3. Electron microscopy and image processing

A few microliters of the purified GST–Syk and the phosphorylated protein were adsorbed to glow discharged carbon coated grids and negatively stained using 2% uranyl acetate. The grids were observed in a JEOL 1230 operated at 100 kV and micrographs were taken at 50,000 $\times$  magnification under low-dose conditions with the specimen holder tilted at 0 and 15°. These were digitized using a Minolta Dimage Scan Multi PRO scanner at 2400 dpi corresponding to a final 2.1 Å/pixel at the specimen. Particles from the micrographs were extracted, normalised, centred and filtered using different commands found in the EMAN software [23]. The data from tilted and untilted micrographs were processed together following a strategy that avoided bias from our previous knowledge of the atomic structures of isolated domains or Zap-70. Images were processed using angular refinement methods in EMAN [23] and using several volumes as starting references. Images were classified into homogeneous groups using reference-free methods (*refine2d.py* command in EMAN) and using the XMIPP platform [24] and the best averages were used to build several reference volumes using common lines (*startAny* command in EMAN). We also used artificial noisy ellipses and Gaussian blobs as starting models as before [25,26]. Projections from the initial reference volumes were confronted to the data set using angular refinement methods implemented in EMAN [23]. In all cases and after several iterations, the different strategies used converged to similar solutions. Refinement was performed with an angular coverage of 8° to generate 280 classes, each containing approximately between 4 and 14 particles. The resolution was estimated by Fourier Shell Correlation (*eotest* command in EMAN) to be 24 Å (using the 0.5 cross-correlation coefficient criteria) for the reconstructions of Syk. The density map and the atomic structures were visualized with UCSF Chimera from the Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco, CA [27]. Thresholds were chosen to account for 100% of the protein mass.

Also, pairs of micrographs were obtained and processed following the Random Conical Tilt (RCT) method [28] which allows deriving 3D structures from defined views of the specimen. Pairs of micrographs were taken for each area, with and without tilting the specimen holder. Pairs of particles were selected and all the processes were performed using the XMIPP platform [24]. Untilted data was classified and aligned in 2D and distinct 2D averages were selected and their tilted data used to build 3D reconstructions. Since these RCT 3D structures are obtained from defined views, they are not affected by the averaging of views from different orientations that happens in angular refinement methods. The RCT structures were found to preserve the overall structural features of the model derived by angular refinement.

The handedness chosen to render GST–Syk was that providing the best fit with the atomic structure of the homologous Zap-70 [15]. Both possible hands of the reconstruction were tested for fitting and it was found that only one hand provided a reasonable fitting of this atomic structure.

### 2.4. Fitting of atomic structures

Atomic structures deposited in the Protein Data Bank and used in the fitting experiments were as follows: 1A81 (Syk tandem SH2 domains, but used without

considering the bound peptide) [4], 1XBA (Kinase domain) [16] and 2OZO (Zap-70) [15]. Fitting was carried out by a 6-dimensional search using *colores* from the software SITUS [29,30] and the ADP\_EM platform [31] using both the method of cross-correlation and the Laplacian filter. Fittings were performed using both possible hands.

## 3. Results

### 3.1. Purification and functional assay of Syk

We purified Syk by fusing a glutathione *S*-transferase (GST) tag at its N-terminus. Previous results indicated that such tagging strategy does not affect the biological functions of Syk or its sites of auto-phosphorylation [32,33]. Similar findings have been reported for other non-receptor PTKs such as Lck [18]. GST–Syk was expressed in baculovirus-infected insect cells, purified to homogeneity using glutathione-coated beads. The correct functionality of the purified protein was tested first by the analyses of its capacity to auto-phosphorylate using *in vitro* kinase reactions. We observed an optimal phosphorylation of the kinase, as demonstrated by the shift in the electrophoretic mobility of GST–Syk after the kinase reaction (Fig. 1B). This shift was inhibited when *in vitro* kinase reactions were carried out either in the absence of ATP or, alternatively, when ATP was combined with an inhibitor of the kinase activity of Syk (piceatannol), indicating that it was a result of the auto-phosphorylation of the kinase (data not shown). Mass spectrometry analysis also confirmed that the slow migrating band of Syk–GST was indeed phosphorylated in tyrosine residues located within the interdomain B and the C-terminal tail (Fig. 1C) (Supplementary Fig. S1 online). To further support the correct functionality of the protein, the activity of GST–Syk was demonstrated by its ability to *trans*-phosphorylate known substrates such as Cbl-b and Vav1 (Fig. 1D).

### 3.2. Electron microscopy and 3D structure of Syk

Non-phosphorylated GST–Syk molecules were clearly seen in negatively stained electron micrographs (Fig. 2A) and images of single molecules suggested that GST–Syk has the rough shape of a square (Fig. 2B). Micrographs were taken after tilting the specimen holder from 0 up to 15° to help increase the angular sampling of possible orientations of the molecules binding to the support film. A total of 6299 images, tilted and untilted, were selected, combined and subjected to iterative refinement (Fig. 2C). Importantly, the structural information of Zap-70 [15] was never used as an input during refinement (see Materials and methods). As a further control, 3D reconstructions were also derived using the random conical tilt method (RCT) on typical square-shaped views [28]. The general structural features of the RCT map supported the reconstruction defined by angular refinement (result not shown).

The three-dimensional (3D) reconstruction of GST–Syk at a resolution of 24 Å (Fig. 2D) indicates that this kinase displays a square-shaped conformation with dimensions compatible with those of the atomic structures solved for individual domains. Two major intramolecular regions could be defined: a bulky massive region (Fig. 2D, region A) and a two-lobule domain

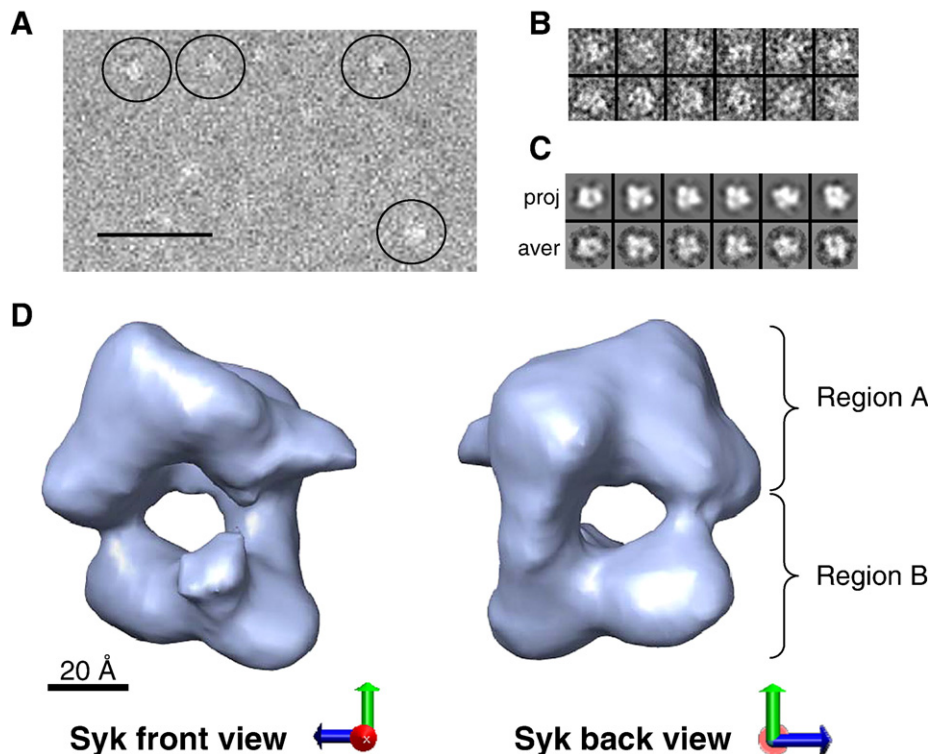


Fig. 2. 3D Structure of full-length non-phosphorylated GST-Syk. (A) EM fields of negatively stained Syk. Some molecules highlighted within circles. Scale bar corresponds to 50 nm. (B) Gallery containing a representative collection of single molecules. Particles from the micrographs were extracted, normalised, centred and filtered using different commands found in the EMAN software [23]. (C) Panel containing the projections (upper row) and their corresponding class averages (lower row) obtained after angular refinement. (D) Front and back views of the 3D reconstruction of GST-Syk. Scale bar represents 20 Å.

(Fig. 2D, region B). Such arrangement seemed highly reminiscent of the recently published inhibited conformation of the related Zap-70 protein [15]. In order to define the hand of our 3D reconstruction of Syk and simultaneously analyse the similarities and differences between Syk and Zap-70 [15], we fitted this within the EM map using computational procedures implemented in the SITUS [30] and the ADP\_EM platforms [31]. The solutions provided by these automatic methods are less biased and less subjective than a manual fitting. Solutions were obtained where Zap-70 (Fig. 3A, yellow colour) fitted into the reconstruction of Syk (Fig. 3A, blue colour) confirming the structural resemblance between the two proteins. Notably, only one possible handedness in the EM reconstruction allowed an adequate fitting of Zap-70's X-ray structure. Most importantly, this fitting allowed us to assign the two structural regions in GST-Syk (regions A and B) to specific domains of the protein. Accordingly the two-lobule region B likely corresponded to the two SH2 tandem domains whereas the bulky region A must comprise the kinase domain and the GST tag. The catalytic and regulatory domains in Syk would therefore form a compact protein whereas the tag would be placed at the back of the kinase domain. Despite the similarity between Zap-70 and Syk, the fitting between the two structures is not perfect indicating that conformational differences exist. More specifically, the EM reconstruction of Syk reveals a protrusion in the regulatory region likely corresponding to the inter-SH2 linker whose position is not identical to that of the equivalent region in Zap-70 (Fig. 3A).

Since atomic structures of both regulatory and catalytic domains of Syk are known [4,16], we fitted these within the EM map in order to better assign areas of the 3D reconstruction to those specific domains. We considered the assignment of regulatory and catalytic domains revealed previously by the fitting of Zap-70 to the whole protein, and the regulatory and kinase domain of Syk were then fitted within their corresponding region in the map (Fig. 3B). We fitted the N-terminal SH2-interdomain A-SH2 region (Fig. 3B, green colour) within the bottom part of the map (Fig. 3B, blue density). A sufficiently precise orientation of these domains within region B could be defined where the helical interdomain A fitted the protrusion between the two lobules (Fig. 3B). This fitting suggested that the phosphotyrosine binding pockets of each SH2 domain are not occluded by other regions in the structure and, therefore, are fully accessible for binding to either phosphorylated ITAM sequences or downstream partners. In conclusion, the bottom part of our map could be quite positively assigned to the SH2-SH2 cassette, leaving the remaining of the 3D reconstruction (region A) to account for the kinase domain and the GST tag. Accordingly, fitting experiments revealed that indeed kinase (Fig. 3B, orange colour) and GST atomic structures could be nicely placed within that portion of the map. The combined density of the kinase domain and the GST tag fully occupied region A (fitting for the GST tag not shown in the figure).

Taken together, the 3D structure of Syk is consistent with a compact conformation highly reminiscent of that described for the inhibited version of Zap-70, though the precise relative

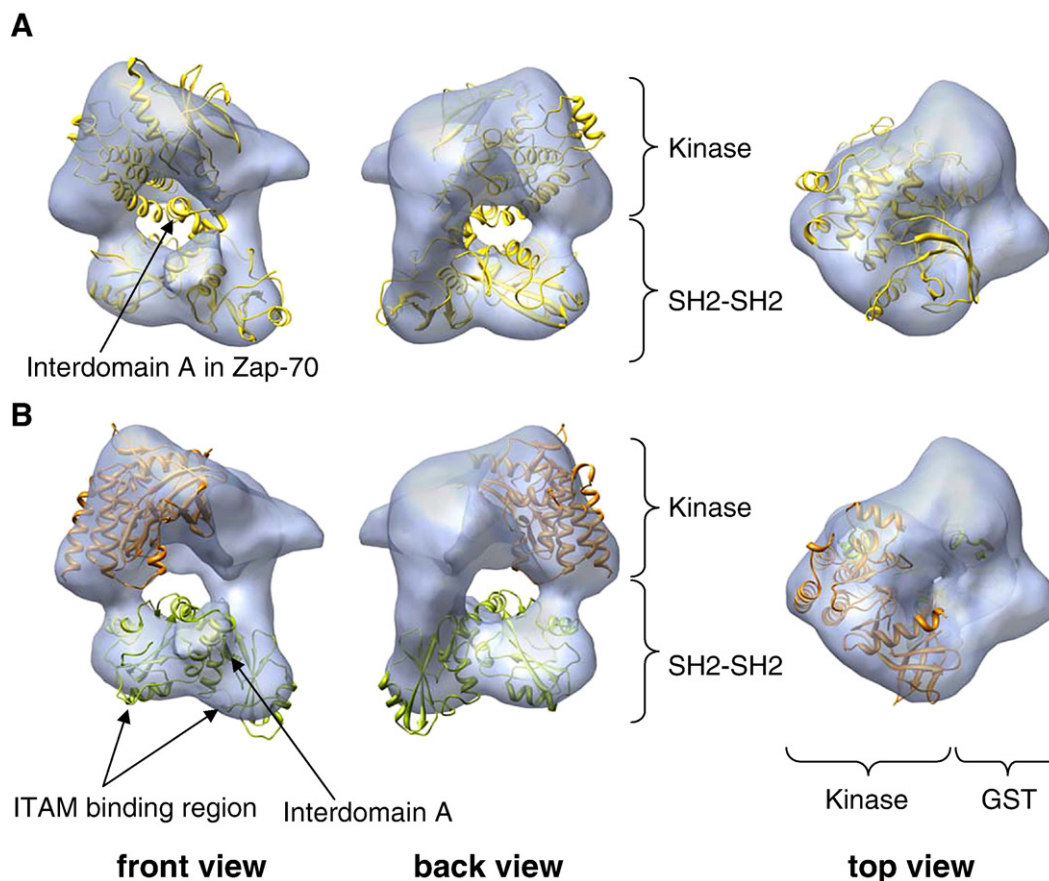


Fig. 3. Fitting of atomic structures into the EM map of GST-Syk. (A) Views of the fitting of the atomic structure of Zap-70 (yellow colour) [15] into the EM map of Syk (blue density shown as transparency). The handedness chosen to represent GST-Syk was that providing the best fit with Zap-70. Both possible hands of the reconstruction were tested for fitting and it was found that only one hand provided a reasonable fitting of this atomic structure. (B) Fitting of the atomic structures of SH2-interdomain A-SH2 domain (green colour) and kinase domain (orange colour) of Syk into the EM map (blue density displayed as transparency). Atomic structures deposited in the Protein Data Bank and used in the fitting experiments were as follows: 1A81 (Syk tandem SH2 domains, but used without considering the bound peptide) [4] and 1XBA (Kinase domain) [16].

disposition of regulatory and catalytic regions is slightly different (see Discussion). As in Zap-70, the phosphotyrosine binding pockets of the two Syk SH2 domains are located in non-occluded areas of the molecule and therefore are fully accessible for recognition and binding to the phosphorylated ITAM sequences (Fig. 3B).

#### 4. Discussion

The analysis of the Syk EM structures reported here provides a first model of the structural organization of full-length Syk protein. In its inhibited state, Syk displays a compact conformation likely sustained by interactions between the catalytic and regulatory regions. This compact arrangement is similar to those described for other non-receptor PTKs of the Src family [3], and very closely reminiscent of that shown by Zap-70 [15], the second member of the Syk family of kinases. In apo-Syk the orientation of the SH2 domains is such that the ITAM binding pockets seem to be facing outwards accessible to bind ITAMs in an activated receptor. Importantly such disposition contrasts the general organization of Src where the

binding pockets of its SH2-SH3 domains face inwards towards the back side of the kinase domain [2]. These propositions for Syk are further sustained by the recently solved structure of Zap-70 [15]. Interactions between the inter-SH2 linker (interdomain A) and the SH2-kinase linker (interdomain B) with the kinase domain in Zap-70 were found to maintain the inactive conformation.

Collectively, the 3D reconstructions presented in this work indicate that the overall structural organization of Syk is similar to that of Zap-70 [15], the other member of the Syk family of kinases. The interactions between the tandem SH2 regulatory region and the kinase domain in Zap-70 are proposed to inhibit the protein by either reducing the flexibility needed to transit to the active conformation and/or precluding the motions required in the kinase domain for the catalytic activity. The fact that we observe a similar compact conformation for Syk suggests that similar regulatory mechanisms must be taking place. Nevertheless, the 3D reconstruction of inhibited Syk reveals a slightly more open conformation than Zap-70. We cannot rule out that such conformational difference is just raised by the methodology we have used and non-significant given the resolution of

our EM map. Still, it is also possible that a small conformational difference between Syk and Zap-70 could contribute for their striking differences in activity. In our EM reconstruction, both regulatory and catalytic regions are to some extent rotated slightly outwards when compared to Zap-70 where the interdomain A is found intimately contacting the kinase domain. Importantly, the interaction between the SH2–SH2 linker of Zap-70 with its catalytic domain defines the structural basis of the inhibited conformation, and the phosphorylation of this region seems to be the hallmark in the activation of the protein. Such structural difference between Syk and Zap-70 would suggest that the inhibition of the kinase activity in Syk could be less stringent than in Zap-70, maybe facilitating the transition from the inactive to the active conformation. Significantly, the activity Syk is intrinsically 100-fold higher than that of Zap-70 and it does not require the phosphorylation of interdomain A by Src kinases [1]. Syk can be activated directly by auto-phosphorylation [2] and the structural differences we observe between Syk and Zap-70 might therefore contribute to the permissiveness for Syk activation both *in vivo* and *in vitro* compared to other protein tyrosine kinases including Zap-70 [1,2].

### Acknowledgements

OL's work is supported by grants SAF2005-00775 (OL) and GEN2003-20239-C06-06 from the Spanish Ministry of Education and Science (MES). XRB's work is supported by grants from the US National Cancer Institute (5R01-CA73735-10), the MES (SAF2006-01789 and GEN2003-20239-C06-01), and the Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RD06/0020/0001, Spanish Ministry of Health). All Spanish funding is co-sponsored by the European FEDER program.

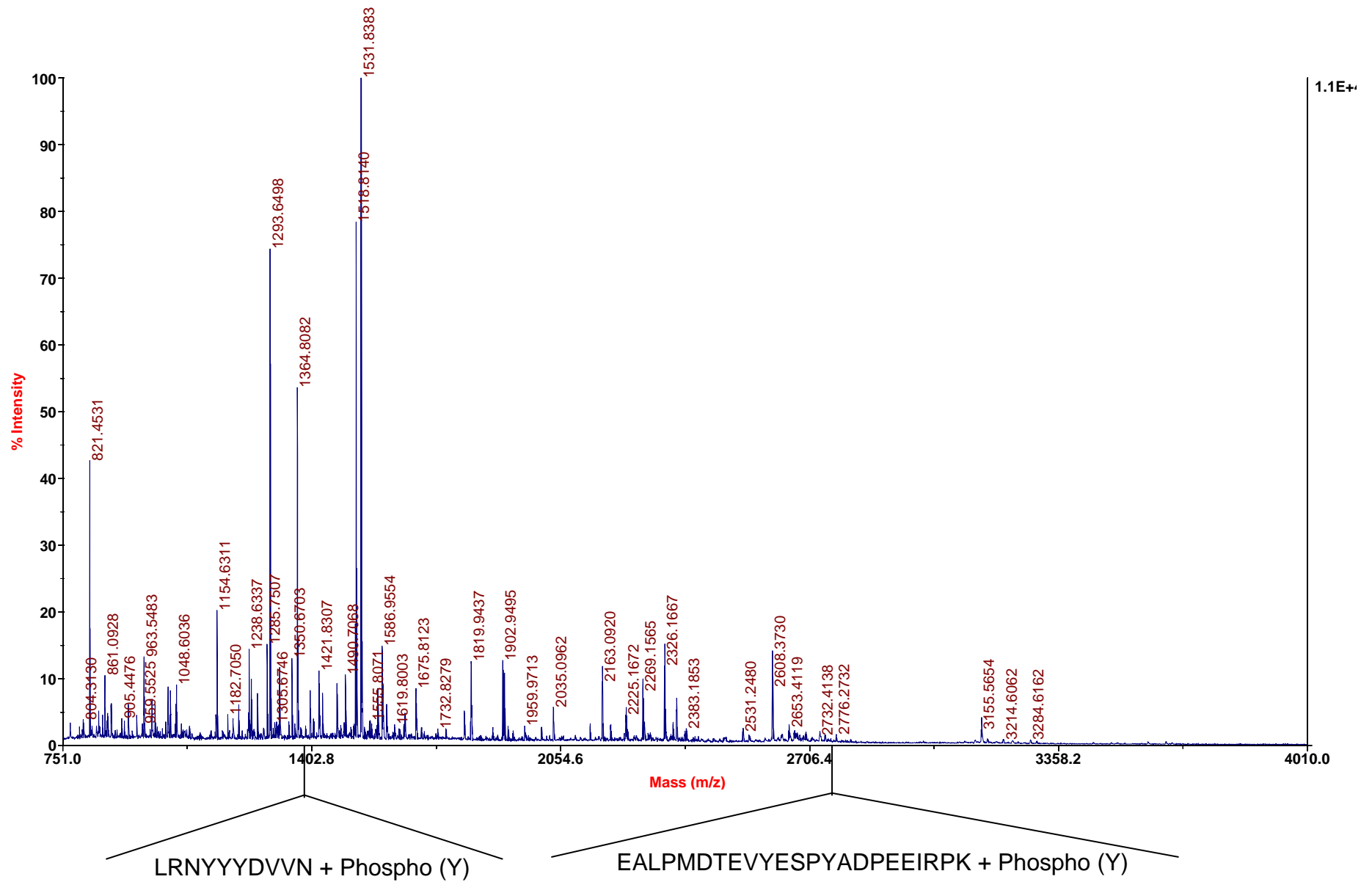
### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bbapap.2007.10.008.

### References

- [1] S. Latour, A. Veillette, Proximal protein tyrosine kinases in immunoreceptor signaling, *Curr. Opin. Immunol.* 13 (2001) 299–306.
- [2] K. Sada, T. Takano, S. Yanagi, H. Yamamura, Structure and function of Syk protein-tyrosine kinase, *J. Biochem. (Tokyo)* 130 (2001) 177–186.
- [3] R. Roskoski, Src protein-tyrosine kinase structure and regulation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324 (2004) 1155–1164.
- [4] K. Futterer, J. Wong, R.A. Gruzca, A.C. Chan, G. Waksman, Structural basis for Syk tyrosine kinase ubiquity in signal transduction pathways revealed by the crystal structure of its regulatory SH2 domains bound to a dually phosphorylated ITAM peptide, *J. Mol. Biol.* 281 (1998) 523–537.
- [5] S. Latour, J. Zhang, R.P. Siraganian, A. Veillette, A unique insert in the linker domain of Syk is necessary for its function in immunoreceptor signalling, *Embo J.* 17 (1998) 2584–2595.
- [6] M.I. Catalina, M.J. Fischer, F.J. Dekker, R.M. Liskamp, A.J. Heck, Binding of a diphosphorylated-ITAM peptide to spleen tyrosine kinase (Syk) induces distal conformational changes: a hydrogen exchange mass spectrometry study, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 16 (2005) 1039–1051.
- [7] T. Kimura, H. Sakamoto, E. Appella, R.P. Siraganian, Conformational changes induced in the protein tyrosine kinase p72syk by tyrosine phosphorylation or by binding of phosphorylated immunoreceptor tyrosine-based activation motif peptides, *Mol. Cell Biol.* 16 (1996) 1471–1478.
- [8] C. Visco, G. Magistrelli, R. Bosotti, R. Perego, L. Rusconi, S. Toma, M. Zamai, O. Acuto, A. Isacchi, Activation of Zap-70 tyrosine kinase due to a structural rearrangement induced by tyrosine phosphorylation and/or ITAM binding, *Biochemistry* 39 (2000) 2784–2791.
- [9] P.J. Coopman, M.T. Do, M. Barth, E.T. Bowden, A.J. Hayes, E. Basyuk, J.K. Blacato, P.R. Vezza, S.W. McLeskey, P.H. Mangeat, S.C. Mueller, The Syk tyrosine kinase suppresses malignant growth of human breast cancer cells, *Nature* 406 (2000) 742–747.
- [10] P.J. Coopman, S.C. Mueller, The Syk tyrosine kinase: a new negative regulator in tumor growth and progression, *Cancer Lett.* 241 (2006) 159–173.
- [11] T. Brdicka, T.A. Kadlecck, J.P. Roose, A.W. Pastuszak, A. Weiss, Intramolecular regulatory switch in ZAP-70: analogy with receptor tyrosine kinases, *Mol. Cell Biol.* 25 (2005) 4924–4933.
- [12] M. Deckert, S. Tartare-Deckert, C. Couture, T. Mustelin, A. Altman, Functional and physical interactions of Syk family kinases with the Vav proto-oncogene product, *Immunity* 5 (1996) 591–604.
- [13] T.D. Groesch, F. Zhou, S. Mattila, R.L. Geahlen, C.B. Post, Structural basis for the requirement of two phosphotyrosine residues in signaling mediated by Syk tyrosine kinase, *J. Mol. Biol.* 356 (2006) 1222–1236.
- [14] R.H. Folmer, S. Geschwindner, Y. Xue, Crystal structure and NMR studies of the apo SH2 domains of ZAP-70: two bikes rather than a tandem, *Biochemistry* 41 (2002) 14176–14184.
- [15] S. Deindl, T.A. Kadlecck, T. Brdicka, X. Cao, A. Weiss, J. Kuriyan, Structural basis for the inhibition of tyrosine kinase activity of ZAP-70, *Cell* 129 (2007) 735–746.
- [16] S. Atwell, J.M. Adams, J. Badger, M.D. Buchanan, I.K. Feil, K.J. Froning, X. Gao, J. Hendle, K. Keegan, B.C. Leon, H.J. Muller-Dieckmann, V.L. Nienaber, B.W. Noland, K. Post, K.R. Rajashankar, A. Ramos, M. Russell, S.K. Burley, S.G. Buchanan, A novel mode of Gleevec binding is revealed by the structure of spleen tyrosine kinase, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 55827–55832.
- [17] O. Llorca, Introduction to 3D reconstruction of macromolecules using single particle electron microscopy, *Acta Pharmacol. Sin.* 26 (2005) 1153–1164.
- [18] C. Spana, E.C. O'Rourke, J.B. Bolen, J. Fargnoli, Analysis of the tyrosine protein kinase p56lck expressed as a glutathione S-transferase fusion protein in *Spodoptera frugiperda* cells, *Protein Expr. Purif.* 4 (1993) 390–397.
- [19] R.B. Rowley, J.B. Bolen, J. Fargnoli, Molecular cloning of rodent p72Syk. Evidence of alternative mRNA splicing, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 12659–12664.
- [20] P. Crespo, K.E. Schuebel, A.A. Ostrom, J.S. Gutkind, X.R. Bustelo, Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the vav proto-oncogene product, *Nature* 385 (1997) 169–172.
- [21] M. Lopez-Lago, H. Lee, C. Cruz, N. Movilla, X.R. Bustelo, Tyrosine phosphorylation mediates both activation and downmodulation of the biological activity of Vav, *Mol. Cell Biol.* 20 (2000) 1678–1691.
- [22] X.R. Bustelo, P. Crespo, M. Lopez-Barahona, J.S. Gutkind, M. Barbacid, Cbl-b, a member of the Sh1-1/c-Cbl protein family, inhibits Vav-mediated c-Jun N-terminal kinase activation, *Oncogene* 15 (1997) 2511–2520.
- [23] S.J. Ludtke, P.R. Baldwin, W. Chiu, EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions, *J. Struct. Biol.* 128 (1999) 82–97.
- [24] C.O. Sorzano, R. Marabini, J. Velazquez-Muriel, J.R. Bilbao-Castro, S.H. Scheres, J.M. Carazo, A. Pascual-Montano, XMIPP: a new generation of an open-source image processing package for electron microscopy, *J. Struct. Biol.* 148 (2004) 194–204.
- [25] A. Rivera-Calzada, L. Spagnolo, L.H. Pearl, O. Llorca, Structural model of full-length human Ku70-Ku80 heterodimer and its recognition of DNA and DNA-PKcs, *EMBO Rep.* 8 (2007) 56–62.
- [26] L. Spagnolo, A. Rivera-Calzada, L.H. Pearl, O. Llorca, Three-dimensional structure of the human DNA-PKcs/Ku70/Ku80 complex assembled on DNA and its implications for DNA DSB repair, *Mol. Cell* 22 (2006) 511–519.
- [27] E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, T.E. Ferrin, UCSF Chimera—a visualization system for

- exploratory research and analysis, *J. Comput. Chem.* 25 (2004) 1605–1612.
- [28] M. Radermacher, Three-dimensional reconstruction of single particles from random and nonrandom tilt series, *J. Electron. Microsc. Tech.* 9 (1988) 359–394.
- [29] P. Chacon, W. Wriggers, Multi-resolution contour-based fitting of macromolecular structures, *J. Mol. Biol.* 317 (2002) 375–384.
- [30] W. Wriggers, R.A. Milligan, J.A. McCammon, Situs: a package for docking crystal structures into low-resolution maps from electron microscopy, *J. Struct. Biol.* 125 (1999) 185–195.
- [31] J.I. Garzon, J. Kovacs, R. Abagyan, P. Chacon, ADP\_EM: fast exhaustive multi-resolution docking for high-throughput coverage, *Bioinformatics* (2006).
- [32] M.T. Furlong, A.M. Mahrenholz, K.H. Kim, C.L. Ashendel, M.L. Harrison, R.L. Geahlen, Identification of the major sites of autophosphorylation of the murine protein-tyrosine kinase Syk, *Biochim. Biophys. Acta* 1355 (1997) 177–190.
- [33] N. Yamamoto, H. Hasegawa, H. Seki, K. Ziegelbauer, T. Yasuda, Development of a high-throughput fluoroimmunoassay for Syk kinase and Syk kinase inhibitors, *Anal. Biochem.* 315 (2003) 256–261.



**Supplementary Fig S1.** Mass spectrometry data of phosphorylated Syk. Two of the peptides were sequenced and found to contained one phosphorylated tyrosine.



## Capítulo 3.3: Estructura de Epac2 en complejo con un análogo del AMP cíclico y Rap1B

Holger Rehmann<sup>1</sup>, Ernesto Arias-Palomo<sup>2</sup>, Michael A. Hadders<sup>3</sup>, Frank Schwede<sup>4</sup>, Oscar Llorca<sup>2</sup> y Johannes L. Bos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Physiological Chemistry, Centre for Biomedical Genetics and Cancer Genomics Centre, University Medical Center Utrecht, Holanda.

<sup>2</sup>Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, España.

<sup>3</sup>Department of Crystal and Structural Chemistry, Bijvoet Center for Biomolecular Research, Utrecht University, Holanda.

<sup>4</sup>BIOLOG Life Science Institute, Bremen, Alemania.

Las proteínas Epac son activadas por la unión del segundo mensajero cAMP, tras lo cual actúan como factores intercambiadores de nucleótidos de las proteínas Rap. Las proteínas Epac están involucradas en la regulación de la adhesión celular y la secreción de insulina. En este trabajo se ha determinado la estructura de Epac2 en complejo con un análogo del cAMP (Sp-cAMPS) y Rap1B, mediante cristalografía y difracción de rayos X, y microscopía electrónica de partículas individuales. La estructura representa una conformación activa de Epac2 unida a Rap1B y atrapada en el transcurso de la reacción de intercambio del nucleótido. La comparación con la estructura inactiva de Epac2 revela que la unión del cAMP induce cambios conformacionales que provocan el desplazamiento del dominio de unión a nucleótido cíclico, desde una posición que bloquea el sitio de unión de Rap hacia una región específica del dominio REM.

## LETTERS

# Structure of Epac2 in complex with a cyclic AMP analogue and RAP1B

Holger Rehmann<sup>1</sup>, Ernesto Arias-Palomo<sup>2</sup>, Michael A. Hadders<sup>3</sup>, Frank Schwede<sup>4</sup>, Oscar Llorca<sup>2</sup> & Johannes L. Bos<sup>1</sup>

**Epac proteins are activated by binding of the second messenger cAMP and then act as guanine nucleotide exchange factors for Rap proteins<sup>1,2</sup>. The Epac proteins are involved in the regulation of cell adhesion<sup>3</sup> and insulin secretion<sup>4</sup>. Here we have determined the structure of Epac2 in complex with a cAMP analogue (Sp-cAMPS) and RAP1B by X-ray crystallography and single particle electron microscopy. The structure represents the cAMP activated state of the Epac2 protein with the RAP1B protein trapped in the course of the exchange reaction. Comparison with the inactive conformation reveals that cAMP binding causes conformational changes that allow the cyclic nucleotide binding domain to swing from a position blocking the Rap binding site towards a docking site at the Ras exchange motif domain.**

Previously we have determined the structure of Epac2 in the inactive state, showing that the access of Rap to the catalytic site, a helical hairpin in the CDC25-homology domain, is sterically blocked by the cyclic nucleotide binding (CNB) domains<sup>5</sup>. To understand the mechanism of activation and guanine nucleotide exchange factor (GEF) activity of Epac proteins, we solved the crystal structure of a deletion mutant of Epac2 lacking the first 305 amino acids in complex with RAP1B and Sp-cAMPS to 2.2 Å resolution (Fig. 1, Supplementary Table 1). Epac2Δ305 lacks the first CNB domain and the DEP domain, but, due to the presence of the critical second CNB, its activity is completely cAMP dependent<sup>5</sup>. Sp-cAMPS is a hydrolysis resistant cAMP analogue, which activates Epac normally<sup>6</sup>.

Comparison of Epac2Δ305•Sp-cAMPS•RAP1B with the structure of inactive full length Epac2 shows that the second CNB domain moves by 45 Å as a rigid body from one side of the helical hairpin, where it blocks the access of Rap to the catalytic site, to the other (Fig. 1b, c). To prove that this movement reflects the conformational changes that occur in the full-length protein, inactive full-length Epac2 and the active complex of full-length Epac2 and RAP1B were subjected to single particle electron microscopy (EM). A good match was obtained between the crystal structure<sup>5</sup> and EM reconstructions of inactive Epac2 (Supplementary Fig. 1). Similarly, the X-ray structure of Epac2Δ305•Sp-cAMPS•RAP1B could be fitted in the EM density of Epac2•cAMP•RAP1B, whereby a continuous volume of extra density for the missing domains was obtained (Fig. 1d). Although the obtained resolution does not allow discrimination in the position of the missing domains, geometric constraint suggests the DEP domain to be in close proximity to the second CNB domain.

The function of the first CNB domain was investigated by mutational analysis: we find that this domain is not required to maintain the auto-inhibited state, and that cAMP binding to the first CNB domain is not required for activation (Supplementary Fig. 2). However, the first and the second CNB domain are arranged face to face to each other, so each is blocking the other's cAMP binding

site. Activation of Epac2 requires the displacement of the first CNB domain by stochastic opening of the regulatory region, which allows cAMP to access the second CNB domain and to induce activation of Epac2 (Supplementary Fig. 2). This is in agreement with the EM data, which show that the relative domain organization within the regulatory region changes upon cAMP binding.

The movement of the second CNB domain originates in the hinge, which connects the two carboxy-terminal β-strands of the second CNB domain to the central β-core of the domain (Fig. 1b). The movement can be best analysed by keeping the core of the CNB domain fixed and considering the catalytic region to move (Supplementary Movie 1). Two major effects are observed: (1) the hinge helix (and the whole catalytic region) swings closer to the core of the CNB domain; and (2) the last two turns of the hinge helix 'melt', resulting in a prolonged loop between the hinge helix and the C-terminal β-strands. This allows the C-terminal β-strands (and the whole catalytic region) to rotate about 90° sideways and to translate closer to the cAMP binding site (Fig. 2a).

By forming a rigid β-sheet-like structure with the first β-strand of the Ras exchange motif (REM) domain and the tip of the helical hairpin, the C-terminal β-strands anchor the CNB domain to the catalytic region. Even though structurally unaffected by cAMP binding, the C-terminal β-strands together with the first helix of the REM domain complete the cAMP binding site. The base of the cyclic nucleotide interacts with both elements, which are referred to as the lid. Several of these interactions are crucial for proper activation. For instance, Leu 449 is packed in parallel to the adenine base (Fig. 2b). The maximal activity ( $k_{\text{max}}$ ), which is a measure of the efficiency with which cAMP shifts the equilibrium to the active site, is reduced in Epac2 L449A to less than 10% (Supplementary Fig. 3). The amino group of the adenine base interacts with Lys 450 while cPuMP, which only differs from cAMP by the absence of this group, is a very weak activator of Epac2. The crucial need for the amino group thus explains the selectivity of Epac2 for cAMP over cGMP (Supplementary Fig. 4).

In addition to the interactions with Sp-cAMPS, the lid forms new contacts with the central β-core of the CNB domain (Fig. 2c). These interactions are clustered around Lys 405, which is part of the phosphate binding cassette (PBC). The PBC is a highly conserved part of the central β-core and interacts with the phosphate-sugar moiety of cAMP<sup>7</sup>. At the corresponding position of Lys 405, a totally conserved glutamic acid is found in all CNB domains except for those in Epac. The glutamic acid of non-Epac proteins crucially interacts with the 2'-OH group of the cyclic nucleotide and, in addition, with the lid structure of this proteins<sup>8-12</sup>. However, no direct interaction is observed between Lys 405 and Sp-cAMPS. Lys 405 interacts with Tyr 480 at the beginning of the REM domain and with the backbone

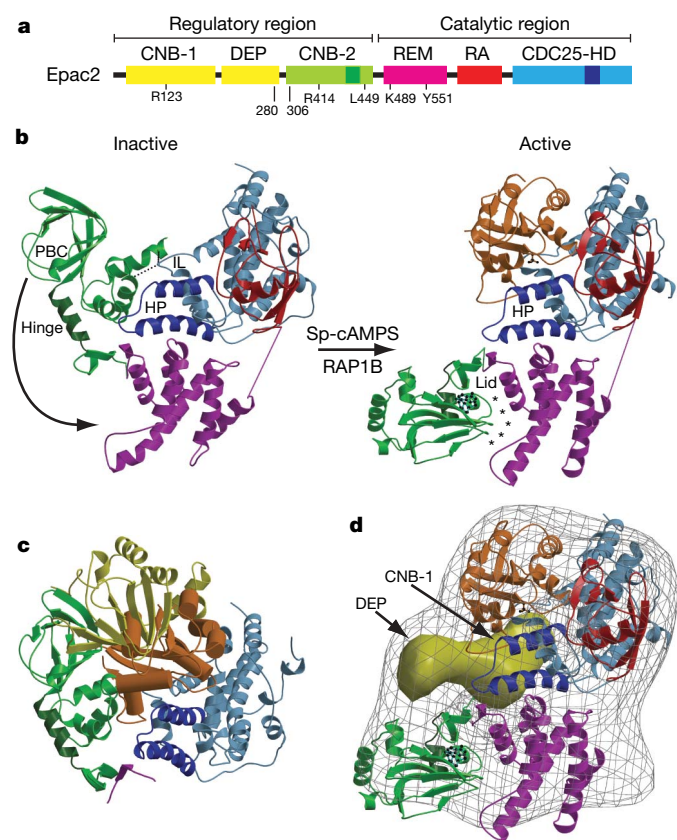
<sup>1</sup>Department of Physiological Chemistry, Centre for Biomedical Genetics and Cancer Genomics Centre, University Medical Center, Universiteitsweg 100, 3584 CG Utrecht, The Netherlands. <sup>2</sup>Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), Spanish National Research Council (CSIC), Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain. <sup>3</sup>Department of Crystal and Structural Chemistry, Bijvoet Center for Biomolecular Research, Utrecht University, Padualaan 8, 3584 CH Utrecht, The Netherlands. <sup>4</sup>BIOLOG Life Science Institute, Flughafenweg 9a, 28199 Bremen, Germany.

oxygens of Asn 445 and Glu 445, which are part of the loop between the hinge helix and the amino-terminal  $\beta$ -strands. These interactions stabilize the active conformation of the lid, since Epac2 Y480F shows a  $k_{max}$  which is reduced by 50% (data not shown).

In the active conformation, the  $\beta$ -core of the second CNB domain is packed against the REM domain (Fig. 1b). The emerging intra-molecular interface is dominated by van der Waals interactions clustered around a hydrogen bond between Gln 369 in the CNB domain and Tyr 551 in the REM domain. The  $k_{max}$  is reduced in Epac2 Y551F and Epac2 Y551A to 70% of the wild-type protein (Supplementary Figs 3, 5).

In summary, there are three elements stabilizing the active conformation of Epac2: (1) the interaction of the cyclic nucleotide with the lid; (2) newly formed interactions of the central  $\beta$ -core and the lid; and (3) interactions between the core of the CNB domain and the REM domain. The REM domain is involved in all three of these elements and disrupting mutations decreased the maximal activity of Epac2, indicative of the importance of the proper stabilization of the active conformation.

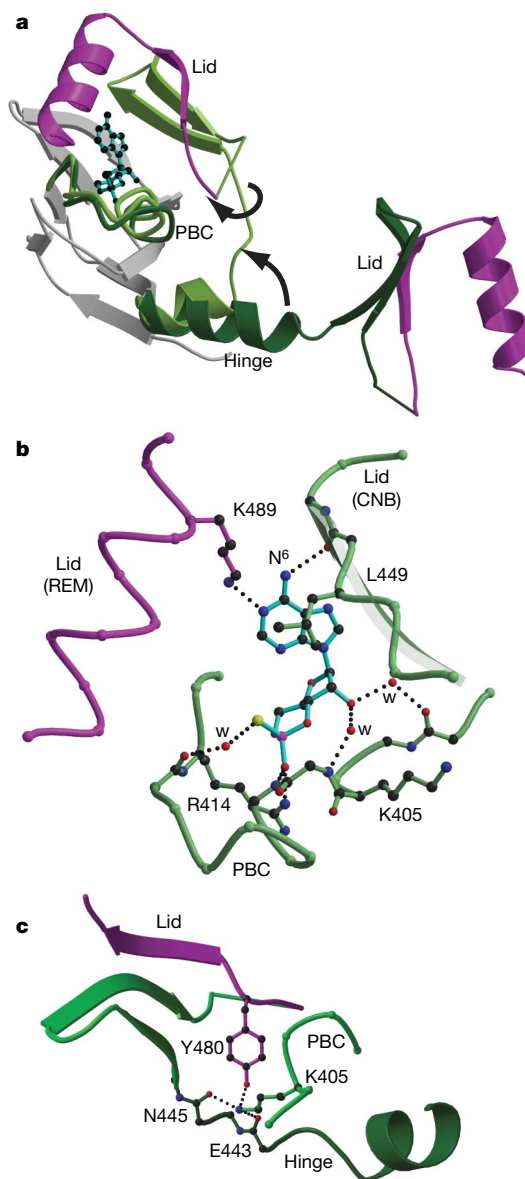
Apart from stabilizing the active conformation, how is cAMP causing the transition to the active conformation? In the absence of cAMP, the PBC sterically prevents the hinge-helix from swinging



**Figure 1 | Active Epac 2.** **a**, Domain organization of Epac2. Residues that were subjected to mutational analysis are indicated. The same colour code is used throughout the figures. Hinge (residues 432–445, dark green); helical hairpin (residues 906 to 946, dark blue). CDC25-HD, CDC25 homology domain; CNB, cyclic nucleotide binding domain; DEP, Dishevelled, Egl-10, Pleckstrin domain; RA, Ras-association domain; REM, Ras-exchange motif. **b**, Left, inactive Epac2 (first CNB and DEP domain omitted); right, active Epac2 $\Delta$ 305•Sp-cAMPS•RAP1B. RAP1B is shown orange; Sp-cAMPS and  $SO_4^{2-}$  are shown in ball and stick representation. Arrow, movement of the second CNB domain; straight lines, missing connectivity; dotted lines, ionic latch (IL); asterisks, interface between the REM and the CNB domain; HP, helical hairpin; PBC, phosphate binding cassette. **c**, RAP1B placed into the inactive structure. **d**, The crystal structure of Epac2 $\Delta$ 305•Sp-cAMPS•RAP1B was fitted into the EM density reconstruction (grey grid) of full length Epac2•cAMP•RAP1B. Yellow surface, difference density.

towards the central  $\beta$ -core. In agreement with a previously described model<sup>13</sup>, cAMP binding induces a tightening of the PBC thereby releasing this steric block (Supplementary Fig. 6). Once released, the hinge can undergo the aforementioned rearrangements, and the CNB domain can be trapped in the active conformation. This process crucially depends on the lid. Its  $\beta$ -sheet structure is unique to the CNB domains of Epac, since helical structures are found in PKA<sup>9,10</sup> and cyclic nucleotide regulated ion channels<sup>11,12</sup> (Supplementary Fig. 7).

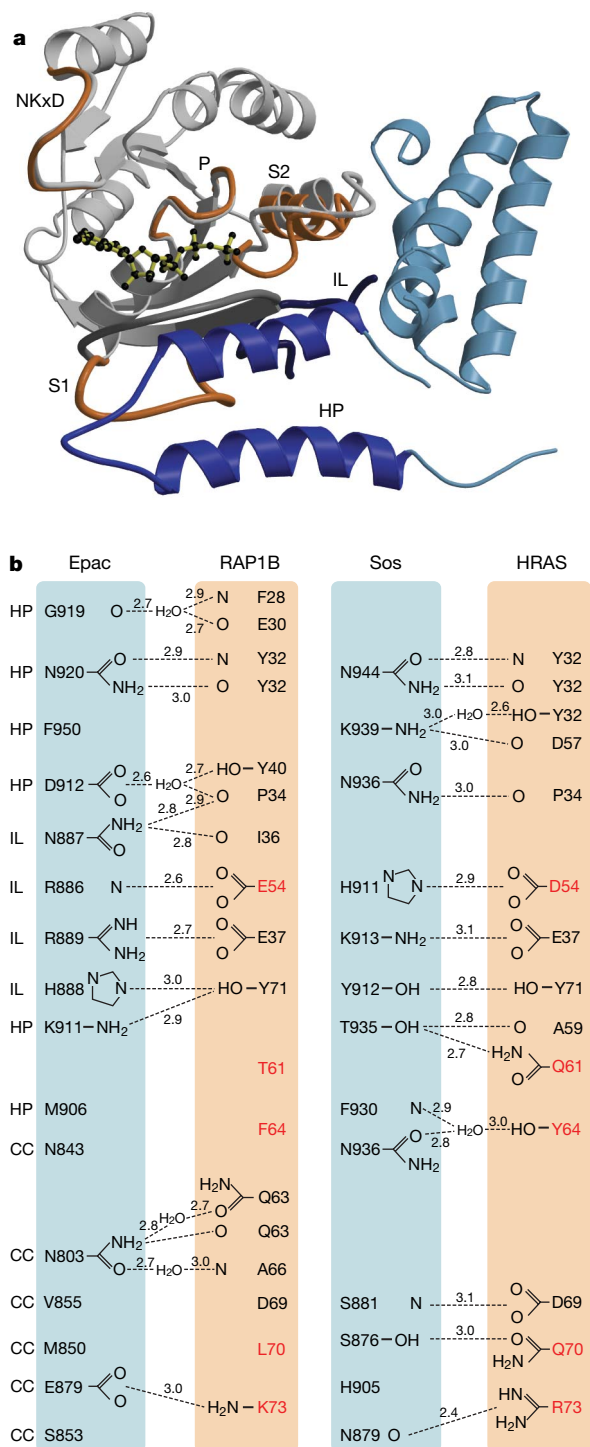
How is Epac interacting with its substrate RAP1B? Binding of RAP1B to the CDC25-homology domain induces an upwards bending of the helical hairpin towards the REM domain, which corresponds to a  $C_\alpha$ -backbone displacement of at most 2 Å at its tip. A similar effect was observed in the complex of HRAS and its GEF Sos, which was attributed to a repositioning of the REM domain<sup>14,15</sup>. The REM domain of the active Epac2 is slightly affected by its interaction with the CNB domain. However, these changes are different and



**Figure 2 | Sp-cAMPS induced conformational changes.** **a**, Superposition of the active and inactive second CNB domain. The arrows indicate the movement of the hinge and the lid region. Light green, active conformation; dark green, inactive conformation; grey, no difference in conformation. **b**, Interactions of Sp-cAMPS with the CNB domain and the REM domain. Hydrogen bonds are shown by dotted lines; w, water. **c**, Interaction of Lys 405 with the hinge-lid region.

much more subtle than in Sos and might be attributed to the constraints of crystal packing.

The nucleotide binding site of G proteins consists mainly of switch I and II, the P-loop that amply interacts with the phosphate moiety of the nucleotide, and the NKxD motif that interacts with the base.



**Figure 3 | Interactions between Epac2 and RAP1B.** **a**, The structure of RAP1A (PDB entry 1c1y; grey) bound to GTP (ball-and-stick) was superimposed onto the nucleotide free RAP1B in Epac2Δ305•Sp-cAMPS•RAP1B, which is shown in orange only where it adopts a different conformation. HP, helical hairpin (blue); IL, ionic latch loop (dark blue); NKxD, NKxD motif; P, P-loop; S1, switch 1; S2, switch 2. **b**, Comparison of interaction in the Epac2Δ305•Sp-cAMPS•RAP1B and the Sos•HRAS complex. Residues not conserved in RAP1B and HRAS are highlighted in red. Hydrogen bonds are indicated by dotted lines, and distances are given in Å. CC, central core.

Epac2 inserts the helical hairpin of the CDC25-homology domain into the nucleotide binding site of Rap, thereby bending switch I and opening the nucleotide binding site (Fig. 3a). Switch II becomes deformed, and is thus disabled from interacting properly with the nucleotide by being tightly packed against the core of the CDC25-homology domain (Fig. 3a, Supplementary Fig. 8). In contrast, the conformation of neither the P-loop nor the NKxD motif is changed by Epac2 (Fig. 3a). The P-loop is stabilized by a  $\text{SO}_4^{2-}$  anion, which takes the position of the  $\beta$ -phosphate and mimics its interactions (Supplementary Fig. 8). The absence of the  $\text{SO}_4^{2-}$  anion would probably result in a collapse of the P-loop, as seen in the HRAS•Sos complex<sup>16</sup>. Nevertheless, the direct action of CDC25-homology domains is limited to the switch regions as shown here.

Three major elements of the CDC25-homology domain contribute to the interaction with RAP1B: the helical hairpin, the part of the domain core to which the switch II region is packed, and the ionic latch loop. In the inactive conformation, residues in the ionic latch loop interact with the N terminus of the second CNB domain. The catalytic activity of the ionic latch loop mutant Epac2 R886A was found to be drastically reduced<sup>5</sup>, demonstrating that in the inactive conformation, residues crucial for catalysis are directly masked by an interaction with the second CNB domain. In the Epac2Δ305•Sp-cAMPS•RAP1B complex, Arg 886<sup>Epac2</sup> and Arg 889<sup>Epac2</sup> are arranged in parallel with Glu 37<sup>RAP1B</sup>, and Arg 889<sup>Epac2</sup> and Glu 37<sup>RAP1B</sup> are in hydrogen bonding distance (Fig. 3b). Indeed, the ability of Epac2 to activate RAP1B E37A is reduced (Supplementary Fig. 8).

Even though the general interaction mode is conserved between Epac2Δ305•Sp-cAMPS•RAP1B and Sos•HRAS, there are remarkable differences in detail (Fig. 3b). HRAS and RAP1B are characterized by high sequence homology, and selectivity has thus to be determined by the limited number of non-conserved residues. However, attempts to change selectivity by single point mutations in HRAS have been unsuccessful (so far; data not shown), suggesting that selectivity emerges from the whole assembly of non-conserved residues. Sos and Epac2 interact with most of the conserved residues in RAP1B and HRAS differently and the ionic latch loop is even two residues longer in Epac than in Sos (Fig. 3b). This suggests that the catalytic mechanism is conserved but not the detailed interaction, which allows the establishment of selectivity.

The structural characterization of the activated state of Epac2 demonstrates how the small ligand cAMP induces huge conformational changes within the protein. The incoming cAMP molecule causes small changes in the immediate binding site, which result in the release of steric constraints and finally the collapse of the stable auto-inhibited conformation. The obtained structural flexibility allows 'undirected' rearrangements, whereby Epac is finally trapped in the active conformation by the establishment of the full cAMP binding site (Supplementary Movie 1).

## METHODS SUMMARY

Epac2 proteins were purified from *Escherichia coli* using a glutathione S-transferase (GST) tag and gel filtration. The GST tag was removed by thrombin cleavage. A C-terminal truncated version of RAP1B was used. Several deletion constructs of Epac2 were tested for their ability to form crystals. A protein solution of Epac2Δ305, RAP1B and Sp-cAMPS was prepared by mixing 8.7 g l<sup>-1</sup> Epac2Δ305, 3.4 g l<sup>-1</sup> RAP1B, and 3 mM Sp-cAMPS in buffer containing 40 mM TrisHCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 2.5% glycerol and 1 mM EDTA. Crystals were grown at 277 K in sitting drops using a reservoir solution containing 0.4 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1.2 M  $\text{LiSO}_4$  and 0.1 M sodium citrate pH 5.6. Crystals diffract to 2.2 Å resolution. The structure was solved by molecular replacement.

The samples for EM were prepared under similar conditions, applied to carbon-coated grids and negatively stained with 2% uranyl formate. As a control, the inactive Epac2 was used. The obtained density reconstruction corresponds to a resolution of 23 Å and 30 Å for Epac2•RAP1B and Epac2, respectively.

For the GEF assays, RAP1B was loaded with the fluorescent GDP analogue 2'-/3'-O-(N-methylanthraniloyl)-guanosine diphosphate (mGDP). The fluorescence intensity of RAP1B bound mGDP is approximately twice that of free mGDP, and thus nucleotide exchange can be observed as decay in fluorescence

upon addition of an excess of unlabelled GDP. The speed of the decay depends on Epac2 activity and thus on the cyclic nucleotide concentration.

**Full Methods** and any associated references are available in the online version of the paper at [www.nature.com/nature](http://www.nature.com/nature).

**Received 23 February; accepted 20 June 2008.**

**Published online 27 July 2008.**

- de Rooij, J. *et al.* Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* **396**, 474–477 (1998).
- Kawasaki, H. *et al.* A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* **282**, 2275–2279 (1998).
- Bos, J. L. Linking Rap to cell adhesion. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**, 123–128 (2005).
- Seino, S. & Shibasaki, T. PKA-dependent and PKA-independent pathways for cAMP-regulated exocytosis. *Physiol. Rev.* **85**, 1303–1342 (2005).
- Rehmann, H., Das, J., Knipscheer, P., Wittinghofer, A. & Bos, J. L. Structure of the cyclic-AMP-responsive exchange factor Epac2 in its auto-inhibited state. *Nature* **439**, 625–628 (2006).
- Rehmann, H., Schwede, F., Døskeland, S. O., Wittinghofer, A. & Bos, J. L. Ligand-mediated activation of the cAMP-responsive guanine nucleotide exchange factor Epac. *J. Biol. Chem.* **278**, 38548–38556 (2003).
- Canaves, J. M. & Taylor, S. S. Classification and phylogenetic analysis of the cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit family. *J. Mol. Evol.* **54**, 17–19 (2002).
- Yagura, T. S. & Miller, J. P. Mapping adenosine cyclic 3',5'-phosphate binding sites on type I and type II adenosine cyclic 3',5'-phosphate dependent protein kinases using ribose ring and cyclic phosphate ring analogues of adenosine cyclic 3',5'-phosphate. *Biochemistry (Mosc.)* **20**, 879–887 (1981).
- Su, Y. *et al.* Regulatory subunit of protein kinase A: Structure of deletion mutant with cAMP binding domains. *Science* **269**, 807–813 (1995).
- Diller, T. C., Madhusudan, Xuong N. H. & Taylor, S. S. Molecular basis for regulatory subunit diversity in cAMP-dependent protein kinase: Crystal structure of the type II beta regulatory subunit. *Structure (Camb.)* **9**, 73–82 (2001).
- Clayton, G. M., Silverman, W. R., Heginbotham, L. & Morais-Cabral, J. H. Structural basis of ligand activation in a cyclic nucleotide regulated potassium channel. *Cell* **119**, 615–627 (2004).
- Zagotta, W. N. *et al.* Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels. *Nature* **425**, 200–205 (2003).
- Rehmann, H., Wittinghofer, A. & Bos, J. L. Capturing cyclic nucleotides in action: Snapshots from crystallographic studies. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 63–73 (2007).
- Margarit, S. M. *et al.* Structural evidence for feedback activation by Ras•GTP of the Ras-specific nucleotide exchange factor SOS. *Cell* **112**, 685–695 (2003).
- Freedman, T. S. *et al.* A Ras-induced conformational switch in the Ras activator Son of sevenless. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **103**, 16692–16697 (2006).
- Boriack-Sjodin, P. A., Margarit, S. M., Bar-Sagi, D. & Kuriyan, J. The structural basis of the activation of Ras by Sos. *Nature* **394**, 337–343 (1998).

**Supplementary Information** is linked to the online version of the paper at [www.nature.com/nature](http://www.nature.com/nature).

**Acknowledgements** We thank P. Gros for access to crystallization robots, M. Rensen-De Leeuw for technical assistance, A. Wittinghofer for reading the manuscript, the European Synchrotron Radiation Facility for providing synchrotron facilities, the scientists at ID23-1 for help with data collection, and the Galicia Supercomputer Centre (CESGA) and the Barcelona Supercomputing Centre for computing resources. H.R. is a recipient of the Hendrik Casimir-Karl Ziegler-Forschungspreis of the Nordrhein-Westfälischen Akademie der Wissenschaften and the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen. E.A.-P. and O.L. are supported by the Autonomous Region of Madrid, F.S. by the Bremer Innovationsagentur, O.L. by the Spanish Ministry of Education and Science (MEC) and the Red Temática de Investigación cooperativa en Cáncer (RTICC), and J.L.B. by the Chemical Sciences and the Netherlands Genomic Initiative of the Netherlands Organisation for Scientific Research (NWO).

**Author Information** Reprints and permissions information is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints). Co-ordinates have been deposited with the Protein Data Bank under accession number 3cf6. The EM map of activated full length Epac2 bound to RAP1B has been deposited in the 3D EM database (<http://www.ebi.ac.uk/msd/>) under accession code EMD-1510. Correspondence and requests for materials should be addressed to H.R. ([h.rehmann@UMCutrecht.nl](mailto:h.rehmann@UMCutrecht.nl)).

## METHODS

**Protein preparation.** All Epac2 proteins (Epac2 (also known as RapGEF 4) *Mus musculus*, accession number AF115480) were expressed as GST-fusion (pGEX4T, Pharmacia) in the *E. coli* strain CK600K similar to the procedure described for Rap1 (ref. 17). RAP1B (RAP1B, *Homo sapiens*, accession number X08004, amino acids 1–167) was purified as described<sup>18</sup>.

**Crystallography.** The following constructs were screened for their ability to form crystals in complex with RAP1B and cyclic nucleotide: Epac2 1–993 (Epac2 full length), Epac2 280–993 (Epac2 $\Delta$ 279), Epac2 288–293 (Epac2 $\Delta$ 287), Epac2 293–993 (Epac2 $\Delta$ 292), Epac2 306–993 (Epac2 $\Delta$ 305) and Epac2 319–993 (Epac2 $\Delta$ 318). Only Epac2 $\Delta$ 305 was found to form crystals. The activity of Epac2 $\Delta$ 305 is, as the full length protein, dependent on cAMP. However, it was previously shown that in comparison to full length Epac2 or Epac2 $\Delta$ 279, cAMP binding to Epac2 $\Delta$ 305 shifts the equilibrium between the inactive and the active conformation more efficiently to the active state<sup>5</sup>. This effect was attributed to a partial destabilization of interactions formed by the ionic latch, which stabilizes the inactive conformation<sup>5</sup>. Thus the complex formed by Epac2 $\Delta$ 305 might be more homogeneous in comparison to other Epac2 variants and might crystallize more easily. In addition, a longer N terminus might be incompatible with the obtained crystal matrix.

The complex of Epac2 $\Delta$ 305 with RAP1B and Sp-cAMPS (6-(6-amino-purin-9-yl)-2-thioxo-tetrahydro-2-furo[3,2-d][1,3,2]dioxaphosphinine-2,7-diol) was prepared by mixing 8.7 g l<sup>-1</sup> Epac2 $\Delta$ 305, 3.4 g l<sup>-1</sup> RAP1B, and 3 mM Sp-cAMPS in buffer containing 40 mM TrisHCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 2.5% glycerol and 1 mM EDTA. Crystals of the complex were grown at 277 K in sitting drops using a reservoir solution containing 0.4 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.2 M LiSO<sub>4</sub> and 0.1 M sodium citrate pH 5.6. Crystals were cryoprotected in a solution containing the mother liquor supplemented with 2.1 M LiSO<sub>4</sub> and flash frozen in liquid nitrogen. Data were collected at 100 K at beamline ID23-1 of ESRF. Crystals diffract to 2.2 Å resolution and belong to the space group I212121 with one molecule per asymmetric unit (Supplementary Table 1).

The data were processed with XDS<sup>19</sup>. Molecular replacement was carried out in MOLREP<sup>20</sup>. In a first step, the catalytic region (residues 482–991) of the auto-inhibited Epac2 (PDB code 2BYV) was used as a search model. The solution was fixed and in a second step, HRAS from HRAS•Sos (PDB code 1BKD) was used as a poly-alanine model for RAP1B. In a third step, the second CNB domain (residues 320–432) of the auto-inhibited Epac2 were added. The program O<sup>21</sup> was used to build the model into 2F<sub>o</sub> - F<sub>c</sub> and F<sub>o</sub> - F<sub>c</sub> maps and refinement was carried out with REFMAC<sup>22</sup>. Residues 306–309, 463–477, 613–642, 953–961 and 991–993 of Epac2 and 1–2, 45–49 and 135–141 of RAP1B are not visible. The Ramachandran plot depicts 93.6% of main chain torsion angles in the most favoured regions, 6.1% in additional allowed regions, with 0 residues in disallowed regions.

Two molecules of Sp-cAMPS were unambiguously identified in the electron density. One is bound to the CNB domain and the second one is sandwiched in a crystal contact interface between parts of a CNB domain and parts of two REM domains (Supplementary Fig. 8). The second Sp-cAMPS molecule is attributed to the crystallization conditions, as it interacts with residues that are not conserved within Epac2 proteins and any biochemical indication for cAMP binding outside the canonical binding site is lacking.

Figures were generated using the programs Molscript<sup>23</sup>, Bragi<sup>24</sup> and Raster3D<sup>25</sup>.

**Electron microscopy and 3D reconstruction.** The complex of full length Epac2 was prepared by incubating Epac2 with GST-RAP1B and cAMP and purified to homogeneity by the GST, which was then cleaved off. Observations were performed in a JEOL 1230 transmission electron microscope operating at 100 kV and a FEI Tecnai G<sup>2</sup> operated at 200 kV. Micrographs were recorded at a magnification of 50,000 under low dose conditions and digitized using a Minolta Dimage Scan Multi Pro scanner at 2,400 d.p.i.; 8,712 and 7,412 images of Epac2•RAP1B•cAMP and of Epac2, respectively, were extracted using the program Boxer<sup>26</sup>. The contrast transfer function of the microscope for each micrograph was estimated using CTFFIND3 (ref. 27) and corrected using Bsoft<sup>28</sup>. The extracted particles were averaged to a final 4.2 Å per pixel and subjected to iterative refinement using a combined approach with EMAN<sup>26</sup> and 3D maximum likelihood classification (ML3D)<sup>29</sup>. Initial 2D reference-free classification of the data was performed using EMAN and 2D maximum-likelihood methods implemented in XMIPP<sup>30,31</sup>. Several initial template volumes for refinement were built from selected 2D averages through common-lines or constructed as gaussian blobs with the rough dimensions of the protein. The crystallographic struc-

tures were never used as input in the refinement to avoid any model bias. Models converged after refinement with EMAN into a 3D reconstruction that was the input of ML3D<sup>29</sup> to classify the data into more homogeneous groups. For this purpose, three initial template volumes were prepared by splitting the data into three random subsets. Starting from these seeds, ML3D classification converged within 20 cycles and the volume accounting for the largest number of particles was selected as the most representative. The resolution of the final 3D maps was estimated using two independent reconstructions obtained using even and odd halves of the particle data set (*eotest* command in EMAN<sup>26</sup>), which corresponded to 30 Å and 23 Å using a 0.5 correlation coefficient for Epac2 and Epac2•RAP1B, respectively. The final volumes were low-pass filtered accordingly and visualized using UCSF Chimera<sup>32</sup>.

Fitting of the atomic structures into the EM densities was performed using COLORES as implemented in SITUS<sup>33</sup>, and the ADP\_EM platform<sup>34</sup>, testing both possible hands of the final reconstructions. Both programs provided a better correlation coefficient (0.79 and 0.78) for one of the hands. A difference map between the crystallographic structure of truncated Epac2 $\Delta$ 305•Sp-cAMPS•RAP1B complex fitted into the EM map and the experimental EM reconstruction of Epac2•cAMP•RAP1B was calculated using SPIDER<sup>35</sup> after filtering the atomic coordinates at the resolution of the EM structure.

**Biochemistry.** GEF assays were performed as described previously<sup>17</sup>. For mutational analysis, Epac2 $\Delta$ 279 was chosen when the first CNB domain was not object of the investigation. Epac2 $\Delta$ 279 can be obtained in much higher amounts than full length Epac2 and any complication by the first CNB domain can be excluded. It addition it was previously shown that in comparison to full length Epac2 or Epac2 $\Delta$ 279 cAMP binding to Epac2 $\Delta$ 305 shifts the equilibrium between the inactive and the active conformation more efficiently to the active state<sup>5</sup>.

- Rehmann, H. Characterization of the activation of the Rap-specific exchange factor Epac by cyclic nucleotides. *Methods Enzymol.* **407**, 159–173 (2006).
- Herrmann, C., Horn, G., Spaargaren, M. & Wittinghofer, A. Differential interaction of the ras family GTP-binding proteins H-Ras, Rap1A, and R-Ras with the putative effector molecules Raf kinase and Ral-guanine nucleotide exchange factor. *J. Biol. Chem.* **271**, 6794–6800 (1996).
- Kabsch, W. Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J. Appl. Crystallogr.* **26**, 795–800 (1993).
- Vagin, A. & Teplyakov, A. An approach to multi-copy search in molecular replacement. *Acta Crystallogr. D* **56**, 1622–1624 (2000).
- Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W. & Kjeldgaard, M. Improved methods for building protein models in electron-density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr. A* **47**, 110–119 (1991).
- Murshudov, G. N., Vagin, A. A. & Dodson, E. J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. D* **53**, 240–255 (1997).
- Kraulis, P. J. Molscript — a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* **24**, 946–950 (1991).
- Schomburg, D. & Reichelt, J. Bragi — a comprehensive protein modeling program system. *J. Mol. Graphics* **6**, 161–165 (1988).
- Merritt, E. A. & Murphy, M. E. P. Rasert3D version 2.0 — A program for photorealistic molecular graphics. *Acta Crystallogr. D* **50**, 869–873 (1994).
- Ludtke, S. J., Baldwin, P. R. & Chiu, W. EMAN: Semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions. *J. Struct. Biol.* **128**, 82–97 (1999).
- Mindell, J. A. & Grigorieff, N. Accurate determination of local defocus and specimen tilt in electron microscopy. *J. Struct. Biol.* **142**, 334–347 (2003).
- Heymann, J. B. & Belnap, D. M. Bsoft: Image processing and molecular modeling for electron microscopy. *J. Struct. Biol.* **157**, 3–18 (2007).
- Scheres, S. H. et al. Disentangling conformational states of macromolecules in 3D-EM through likelihood optimization. *Nature Methods* **4**, 27–29 (2007).
- Scheres, S. H. et al. Maximum-likelihood multi-reference refinement for electron microscopy images. *J. Mol. Biol.* **348**, 139–149 (2005).
- Sorzano, C. O. et al. XMIPP: A new generation of an open-source image processing package for electron microscopy. *J. Struct. Biol.* **148**, 194–204 (2004).
- Pettersen, E. F. et al. UCSF Chimera — a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605–1612 (2004).
- Wriggers, W., Milligan, R. A. & McCammon, J. A. Situs: A package for docking crystal structures into low-resolution maps from electron microscopy. *J. Struct. Biol.* **125**, 185–195 (1999).
- Garzon, J. I., Kovacs, J., Abagyan, R. & Chacon, P. ADP\_EM: Fast exhaustive multi-resolution docking for high-throughput coverage. *Bioinformatics* **23**, 427–433 (2007).
- Frank, J. et al. SPIDER and WEB: Processing and visualization of images in 3D electron microscopy and related fields. *J. Struct. Biol.* **116**, 190–199 (1996).

**Supplementary Table 1.** Crystallographic data

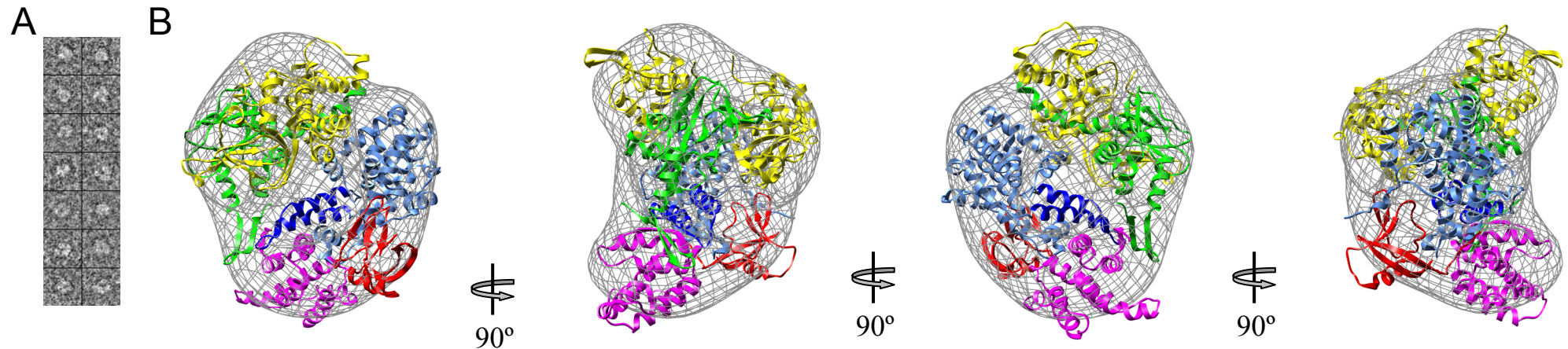
	Data collection	Refinement	
space group	$I_{212121}$	resolution range (Å)	40-2.2
cell dimensions (Å)	a=125.4 b=149.0 c=225.3	$R_{\text{cryst}}$ (%)	24.3
wavelength (Å)	0.9732	$R_{\text{free}}$ (%) <sup>b</sup>	26.5
resolution range (Å) <sup>a</sup>	40-2.2 (2.3-2.2)	average B factor (Å <sup>2</sup> )	48.2
number of reflections	370088	rmsd from ideal values:	
number unique reflections	102111	bond lengths (Å)	0.012
completeness (%) <sup>a</sup>	95.6 (87.3)	bond angles (°)	1.418
$I/\sigma$ <sup>a</sup>	17.68 (2.96)		
$R_{\text{mrgd}}$ (%) <sup>a</sup>	8.4 (49.1)		

<sup>a</sup> Values in parenthesis correspond to highest resolution shell.

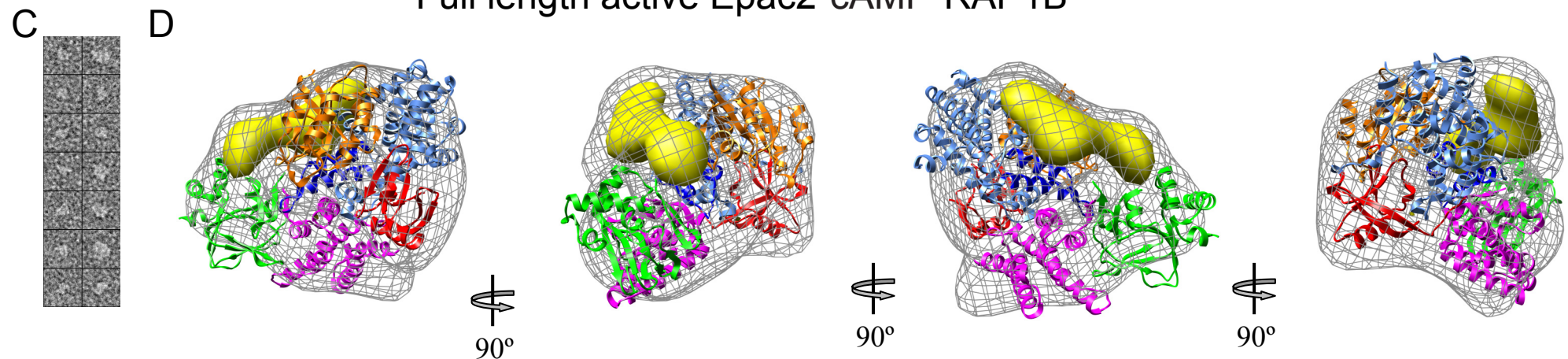
<sup>b</sup> The Free-R factor was calculated with 4.9% of the data omitted from structure refinement.

**Supplementary movie M1 | Schematic model of Epac activation.** Left: cAMP induced conformational changes within the CNB domain (the core of the CNB domain is kept fixed). Right: Conformational rearrangements within the full length protein (the catalytic domain is kept fixed). Changes in the left and the right panel are synchronised to each other. The cyclic nucleotide binding domain is shown in yellow. The cyclic nucleotide (left: shown in red with the phosphate group (P) coloured blue; right: as red star) enters the binding site, and the phosphate-binding cassette (PBC) undergoes rearrangements to allow it to optimally interact with the phosphate sugar moiety of the cyclic nucleotide (red dotted lines represent hydrogen bonds). As a result, Leu 408 residue, which is shown in a blue stick representation, is repositioned and its movement leaves a space that allows the hinge to move closer to the core of the PBC. During this movement the last two turns of the hinge helix melt and the lid rotates by approximately 90° sidewise. When the hinge adopts its final conformation, it positions the lid over the cyclic nucleotide and the conformation of the lid is stabilized by interactions with the base of the nucleotide (black and red striped lines). The conformational rearrangements of the hinge reposition the CNB domain relative to the catalytic region (shown on the right in blue) and allow Rap (magenta) to enter the catalytic side.

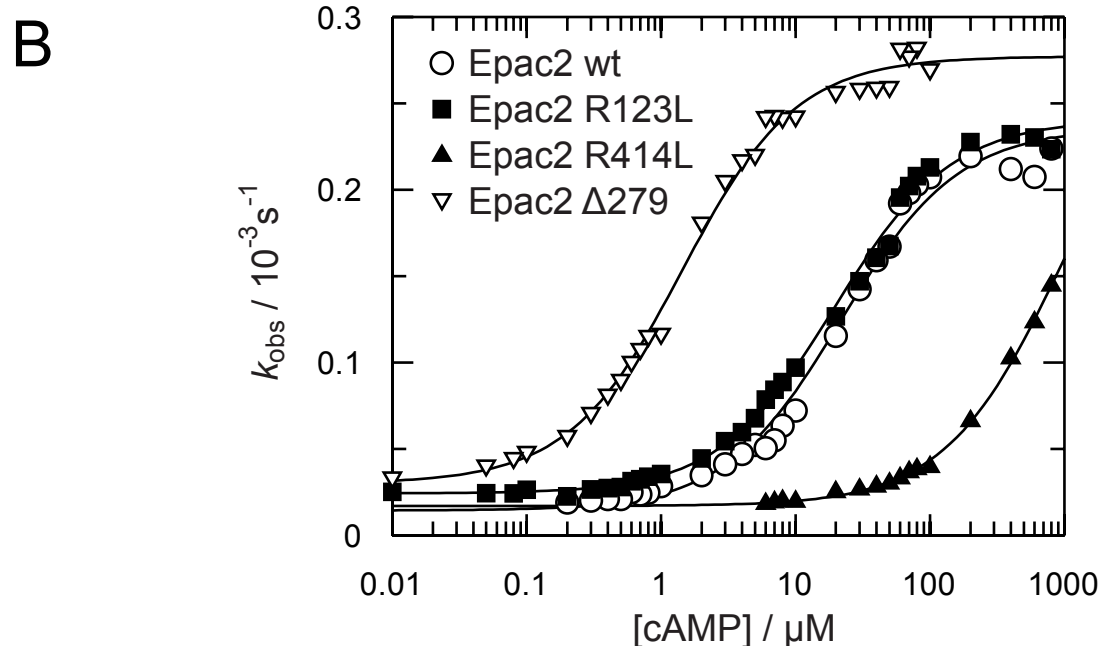
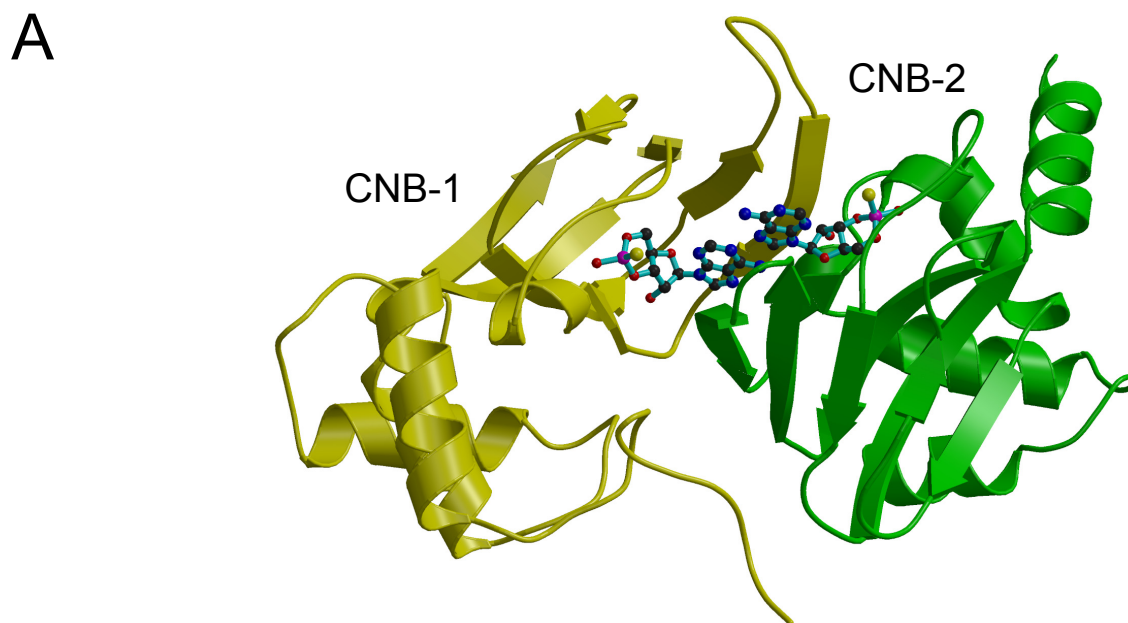
## Full length inactive Epac2



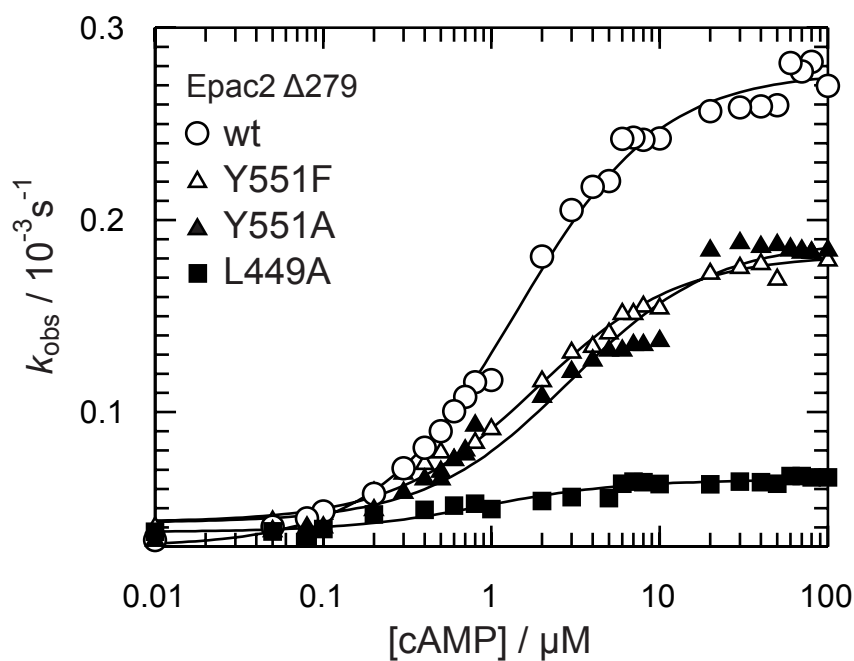
## Full length active Epac2•cAMP•RAP1B



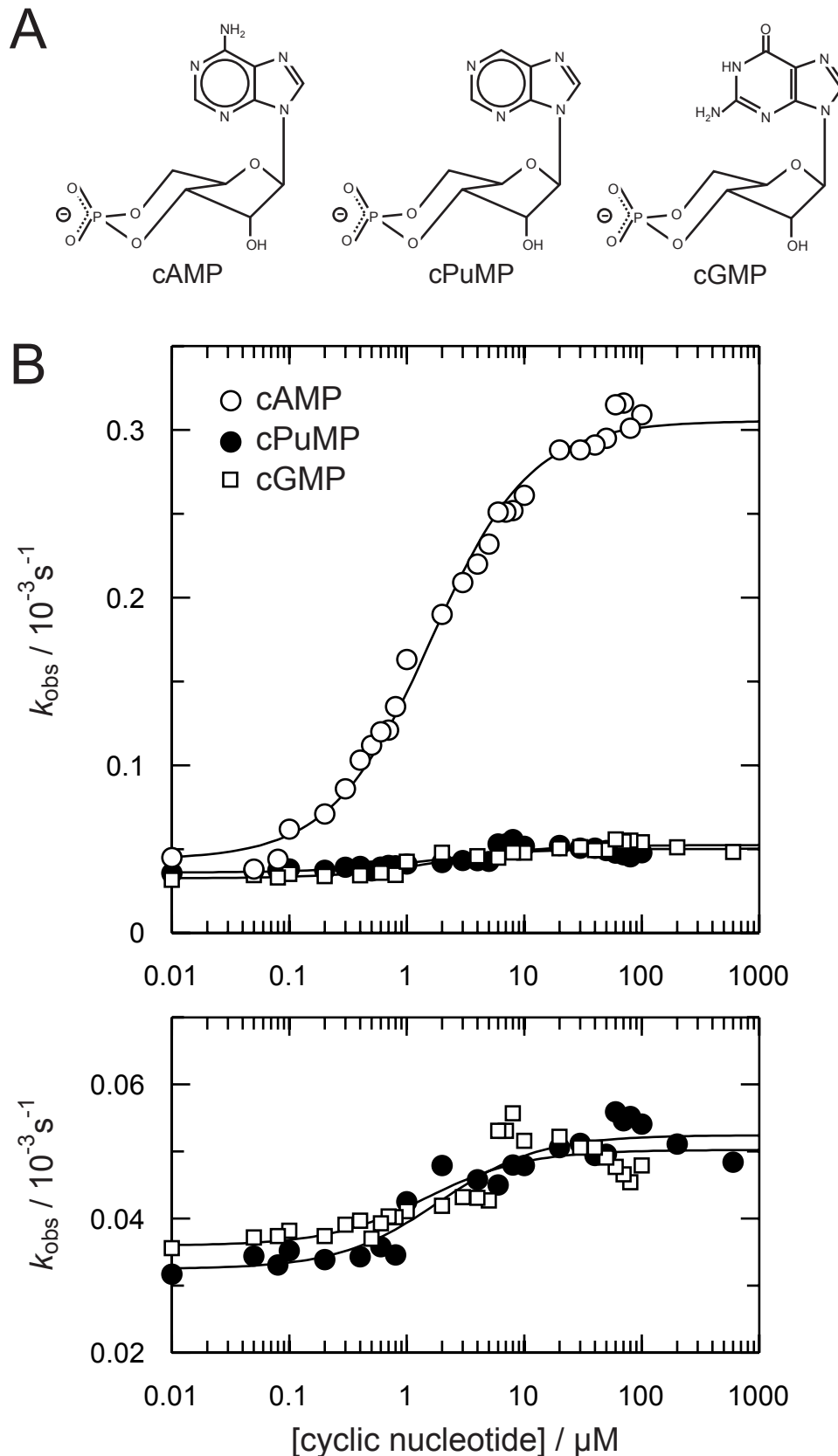
**Supplementary figure S1 | Electron Microscopy of Epac2 and Epac2•RAP1B.** (a) Gallery of selected raw images extracted from micrographs of Epac2. (b) Several views of the final 3D reconstruction of Epac2 (mesh) containing the atomic structure of inactive full-length Epac2 (PDB entry 2BYV) fitted within the EM density. (c) Selected raw images of single molecules of Epac2•cAMP•RAP1B extracted from the micrographs. (d) Several views of the final 3D reconstruction of Epac2•cAMP•RAP1B (mesh) containing the atomic structure of the Epac2 $\Delta$ 305•Sp-cAMPS•RAP1B complex fitted within the EM density. The calculated difference map between the fitted atomic structure and the experimental EM map is shown as a yellow solid density.



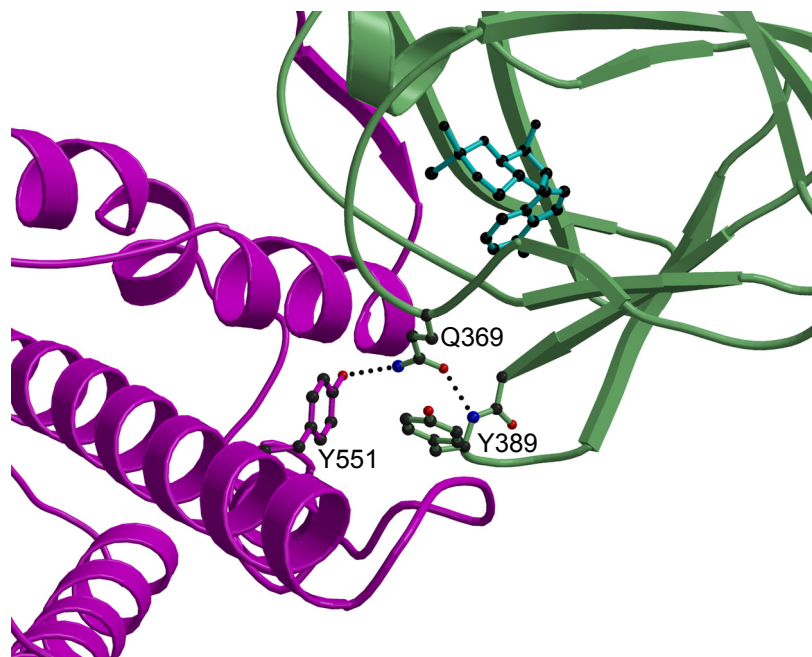
**Supplementary figure S2 | Function of the first CNB domain** (a) In the inactive conformation the CNB domains of Epac2 are arranged “face to face” to each other. The domains are blocking sterically the access of cAMP to each other's binding sites. Sp-cAMPS was placed into the first (yellow) and second (green) CNB domain of the structure of inactive Epac2. (b) The contribution of the first CNB domain to the activation process was investigated by mutational analysis. Deletion of the first CNB domain and the DEP domain (Epac2 $\Delta 279$ ) results in an  $AC_{50}$  of 1.4  $\mu\text{M}$ , which is more than 10 times lower than the  $AC_{50}$  of full length Epac2 ( $AC_{50}$  20  $\mu\text{M}$ ), whereas the  $k_{\text{max}}$  is hardly affected. The mutant Epac2 R123L, in which cAMP binding to the first CNB domain is impaired, is activated as efficiently as the wild type protein, whereas the mutant Epac2 R414L, in which cAMP binding to the second domain is impaired, is characterised by a drastically increased  $AC_{50}$  of approximately 1000  $\mu\text{M}$ . Activation of Epac2 requires thus binding of cAMP to the second but not to the first CNB domain. The crucial function of the arginine residue in cAMP binding becomes evident from Fig. 2B. Arg 414 interacts with the phosphate of the cyclic nucleotide, a function which was found to be highly conserved in CNB domains also of PKA and cyclic nucleotide regulated ion channels. The decreased  $AC_{50}$  in the absence of the first CNB domain is explained by the “face to face” arrangement of the CNB domain in the inactive conformation, in which the first CNB competes with cAMP for binding to the second CNB domain. Increasing concentrations of cAMP were added to a mixture of 200 nM RAP1B•mGDP and 150 nM Epac2. The nucleotide exchange against 100-fold excess of GDP was measured as a time-dependent decay of the fluorescence signal, which was fitted as single exponential to obtain  $k_{\text{obs}}$ .



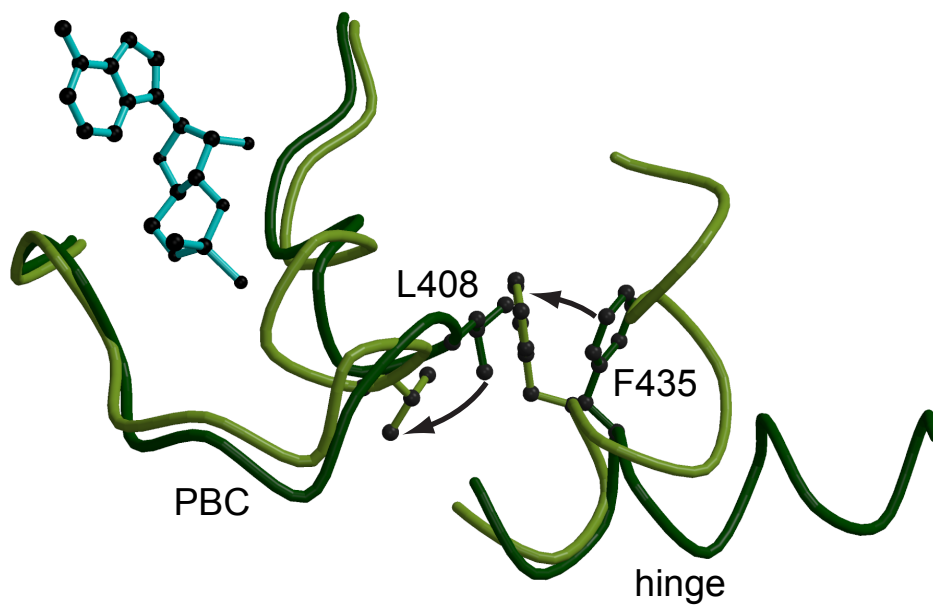
**Supplementary figure S3 | Activity of Epac2 mutants.** Increasing concentrations of cAMP were added to a mixture of 200 nM RAP1B•mGDP and 150 nM Epac2. The nucleotide exchange against 100-fold excess of GDP was measured as a time-dependent decay of the fluorescence signal, which was fitted as single exponential to obtain  $k_{\text{obs}}$ . The half maximal activities for Epac2 $\Delta 279$ , Epac2 $\Delta 279$  Y551F, Epac2 $\Delta 279$  Y551A and Epac2 $\Delta 279$  L449A are approximately 2  $\mu\text{M}$ . The maximal activity of the mutants Y551F and Y551A is reduced to 70% and of the mutant L449A to 10% of the wild type protein.



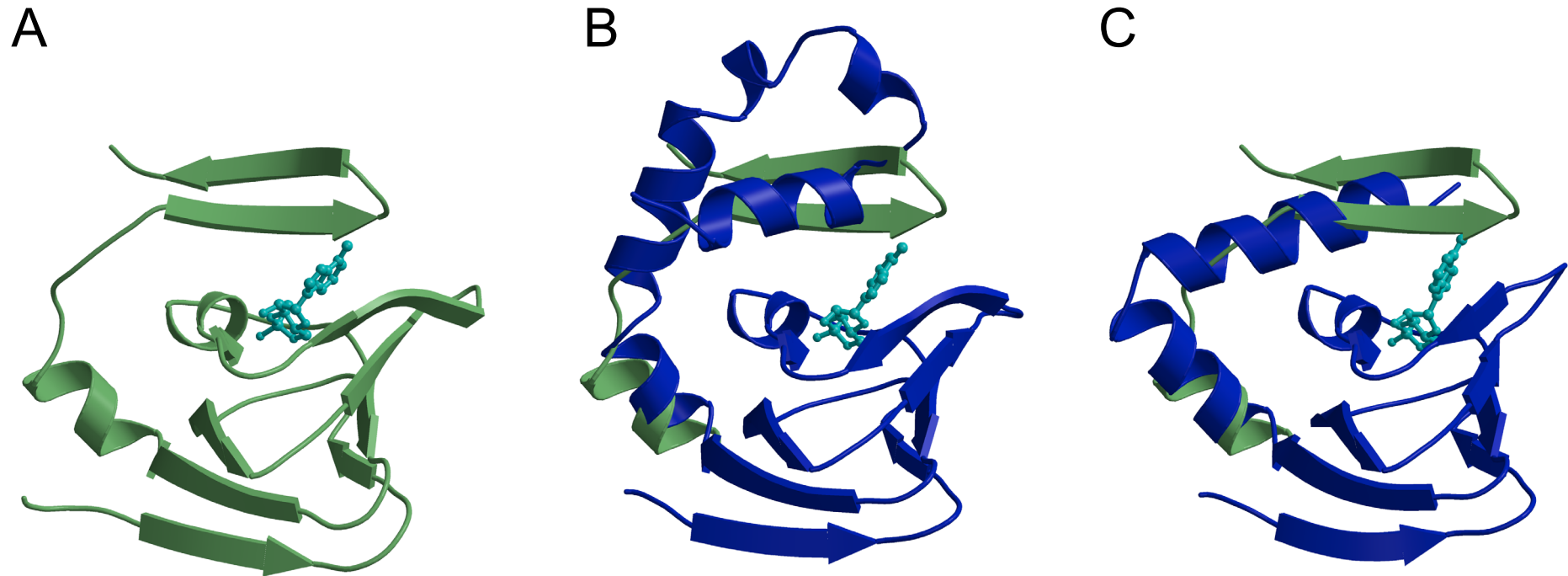
**Supplementary figure S4 | Activation of Epac by cPuMP and cGMP** (a) The chemical structure of cAMP, cGMP and cPuMP (Purine riboside-3',5'-cyclic monophosphate) are shown. (b) Increasing concentrations of cAMP, cGMP or cPuMP were added to a mixture of 200 nM RAP1B•mGDP and 150 nM Epac2 $\Delta$ 279. The nucleotide exchange against 100-fold excess of GDP was measured as a time-dependent decay of the fluorescence signal, which was fitted as single exponential to obtain  $k_{\text{obs}}$ . The  $k_{\text{obs}}$  values were plotted against the cyclic nucleotide concentration.  $AC_{50}$  values are 1.8  $\mu\text{M}$ , 1.4  $\mu\text{M}$  and 1.8  $\mu\text{M}$  for cAMP, cPuMP and cGMP, respectively. The lower panel shows a magnification of the graphs obtained for cGMP and cPuMP.



**Supplementary figure S5 | Docking of the CNB domain to the REM domain.** The interaction surface between the CNB domain (green) and the REM domain (magenta) is centred around residues Y551 and Q369, which are shown in ball-and-stick representation. Hydrogen bonds are indicated by dotted lines.

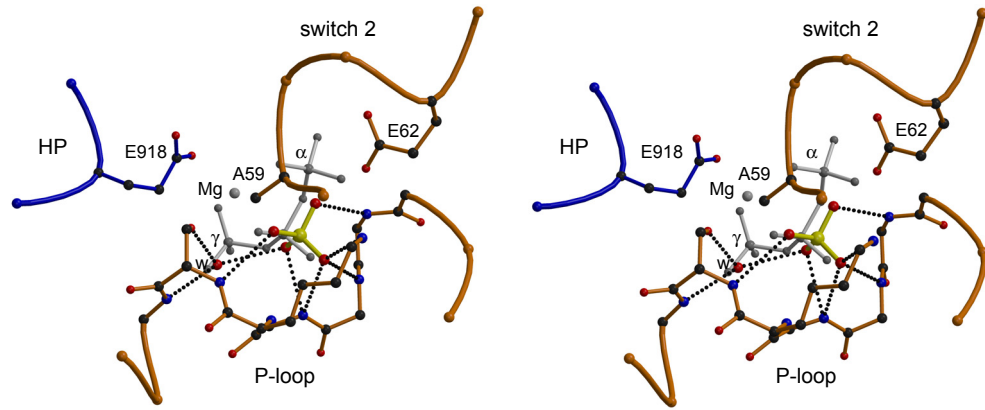


**Supplementary figure 6 | Communication between the PBC and the hinge.** The second CNB domain of the inactive (dark green) and the active (light green) Epac2 were superimposed. A magnification of the PBC and the hinge is shown. cAMP binding induced a tightening of the PBC, which results in repositioning of Leu 408. In consequence, a steric constraint is released and the hinge can move closer to the PBC. Conformational changes within the PBC and the movement of the hinge are indicated by arrows.

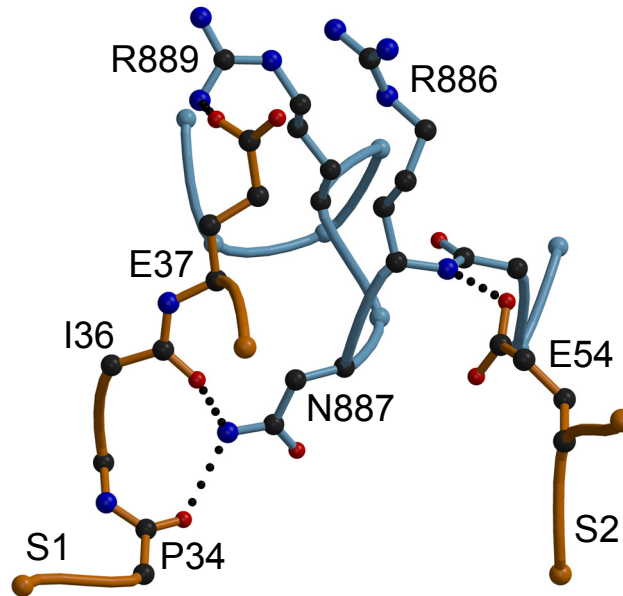


**Supplementary figure S7 | The lid is a common element in CNB domains, but its secondary structure is unique in the individual domains.** The CNB domain of Epac2 $\Delta$ 305•Sp-cAMPS•RAP1B (a) was superimposed onto the first CNB domain of PKAI (b) and the CNB domain of an ion channel (c). The lid structure of Epac2 is shown in panel b and c in green. PKAI and the ion channel were taken from pdb entries 1rgs and 1vp6, respectively.

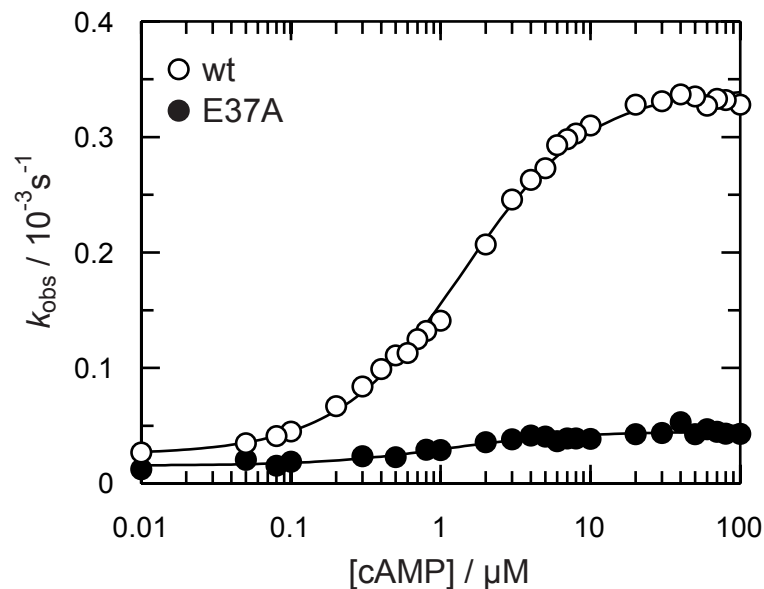
A



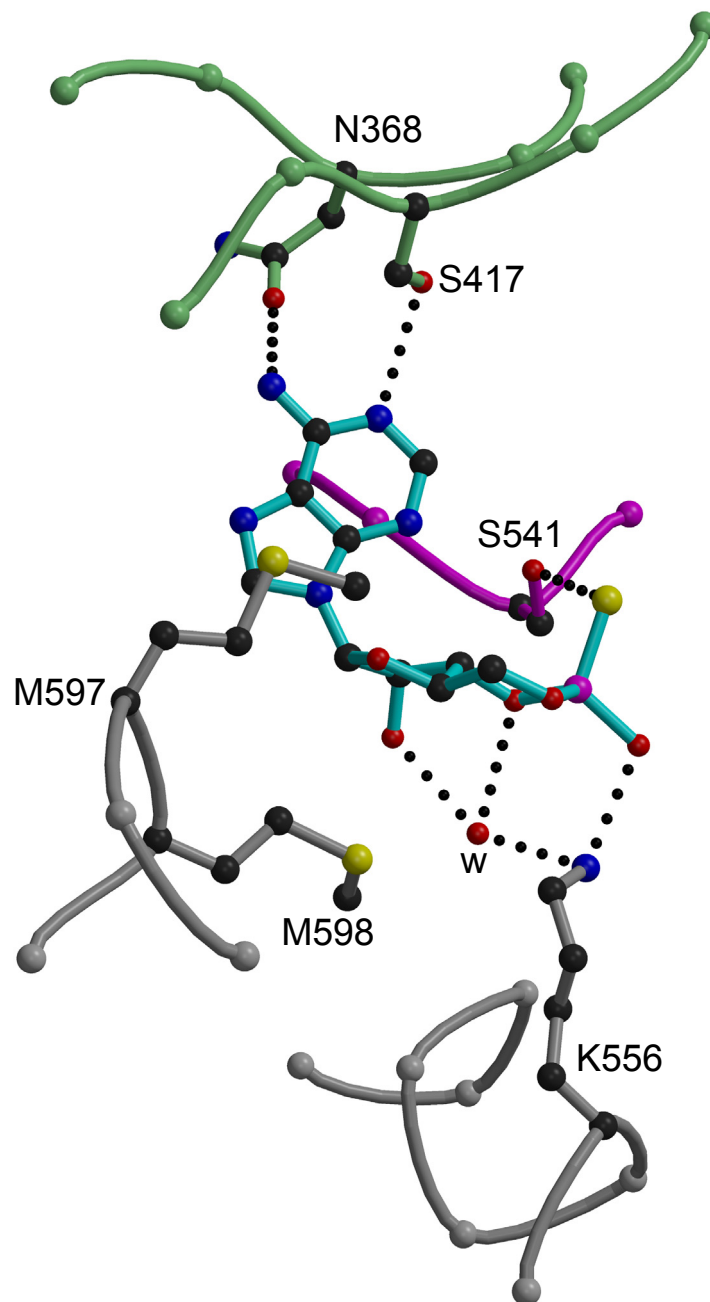
B



C



**Supplementary figure S8 | Interactions between Epac2 and RAP1B.** (a) Magnification of the P-loop and parts of switch 2 as stereo figure. The Epac2 induced deformation of switch 2 results in repositioning of Ala59<sup>RAP1B</sup> and Glu62<sup>RAP1B</sup>. In its new position Ala59<sup>RAP1B</sup> occupies the space of the Mg<sup>2+</sup>-ion, which normally co-ordinates the  $\beta$ - and the  $\gamma$ -phosphate of the bound nucleotide and the negative charge of Glu62<sup>RAP1B</sup> is pointing towards the  $\gamma$ -phosphate. The SO<sub>4</sub><sup>-</sup>-anion is shown in yellow and the three phosphates of the GTP as well as the magnesium ion (Mg) according to the GTP bound structure in grey. w, water (b) Interactions between residues of the ionic latch in the CDC25-homology domain and RAP1B. (c) Exchange activity of Epac2 $\Delta$ 279 towards RAP1B and RAP1B E37A. Increasing concentrations of cAMP were added to a mixture of 200 nM RAP1B•mGDP and 150 nM Epac2 $\Delta$ 279. The nucleotide exchange against 100-fold excess of GDP was measured as a time-dependent decay of the fluorescence signal, which was fitted as single exponential to obtain  $k_{\text{obs}}$ . The  $k_{\text{obs}}$  values were plotted against the cAMP concentration as shown here.



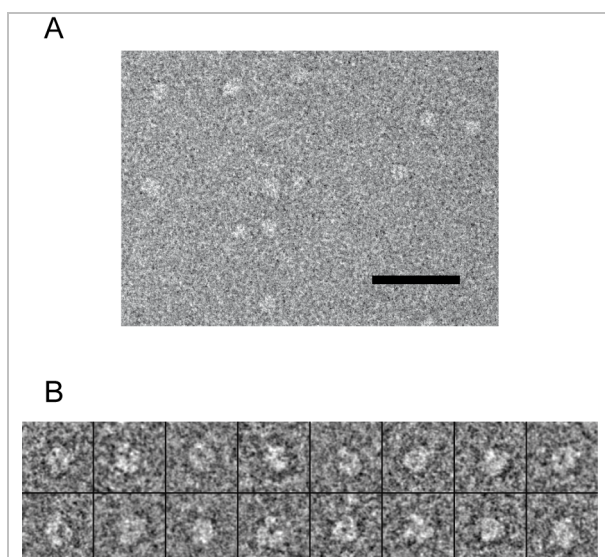
**Supplementary figure S9 | Crystal contact with a second Sp-cAMPS-molecule.** A second Sp-cAMPS molecule is found in a crystal contact between the second CNB domain (green) and the REM domain (magenta) of one Epac2  $\Delta$ 305 molecule and the REM domain (grey) of a second Epac2 $\Delta$ 305 molecule. Hydrogen bonds are indicated by dotted lines. w, water.

## Anexo al Capítulo 3 de Resultados

Debido al escaso espacio del que se disponía para escribir el capítulo 3 de Resultados y para explicarlo con más detalle, se incluye este anexo a dicho capítulo.

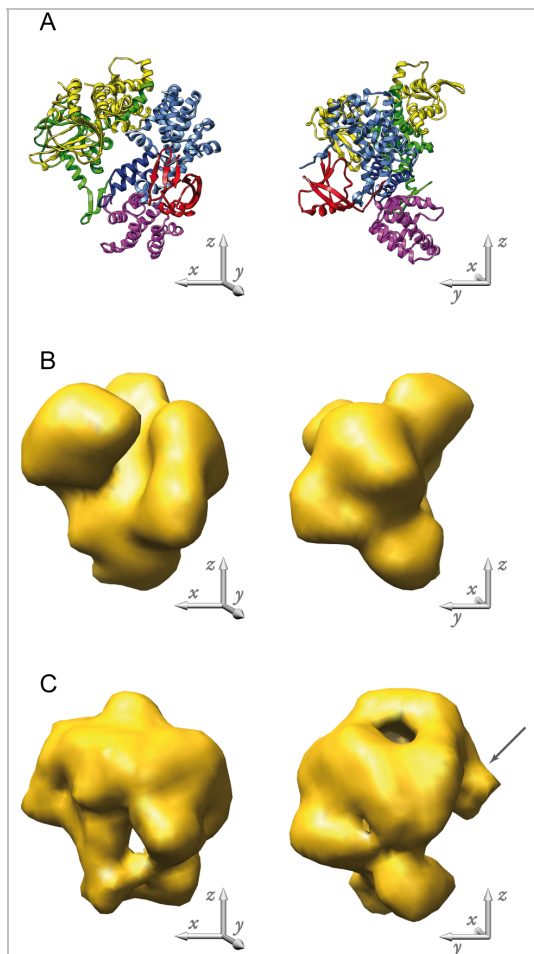
### Determinación de la estructura de Epac2 en su forma inactiva resuelta mediante ME y reconstrucción 3D de partículas individuales.

El primer objetivo que se realizó con Epac2 fue estudiar, mediante ME y reconstrucción 3D de partículas individuales, la conformación inactiva de la proteína, como control de que con esta metodología podemos llegar a unos resultados compatibles con los publicados por nuestros colaboradores mediante difracción de rayos X (Rehmann et al., 2006), a pesar del pequeño tamaño de la proteína. Preparamos la muestra, purificada por nuestros colaboradores, para observarla al microscopio electrónico. Para ello utilizamos la técnica de tinción negativa, ya que Epac2 es una proteína de baja masa molecular (~115 kDa), cerca del límite de lo resoluble mediante esta técnica, y sin la ayuda de un agente de tinción no tendríamos contraste suficiente para distinguirla del fondo. En la **Fig. A.1A** se muestra un campo de una micrografía en el que se pueden observar moléculas individuales de Epac2. Se determinaron los parámetros de la función de transferencia de contraste (CTF) para cada micrografía con el programa CTFFIND3 (Mindell y Grigorieff, 2003) y se corrigió el signo de las fases con Bsoft (Heymann, 2001). En total, 8712 partículas fueron seleccionadas



**Fig. A.1- Micrografía y partículas de Epac2.** (A) Campo de una micrografía de Epac2. La barra de escala corresponde a 500 Å. (B) Selección de partículas de Epac2.

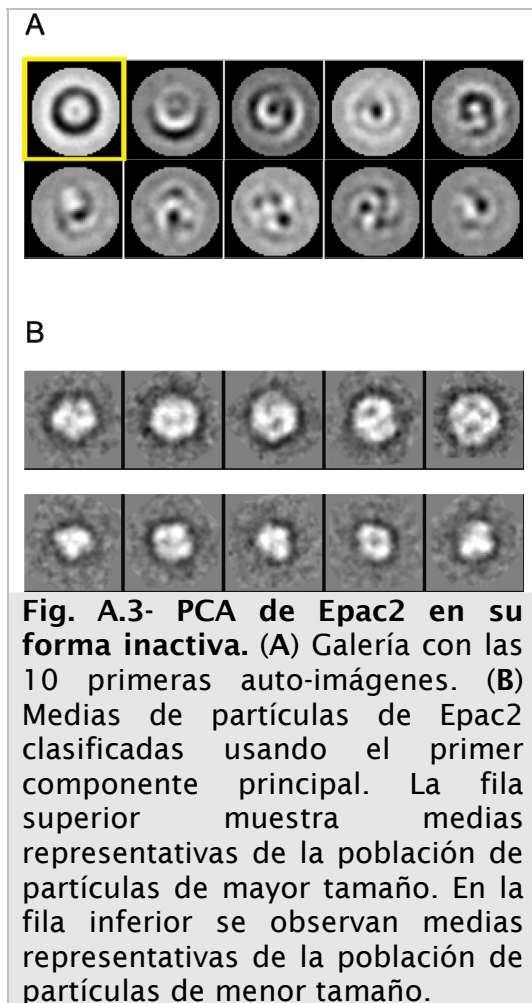
manualmente con Boxer (programa perteneciente al paquete EMAN) (Ludtke et al., 1999) y promediadas a un tamaño de píxel final de 4.2 Å/px (**Fig. A.1B**). Las partículas fueron sometidas a varios pasos de refinamiento angular utilizando EMAN (Ludtke et al., 1999). Para ello se necesitó un modelo inicial que fue proyectado en todas las direcciones, y cuyas proyecciones se compararon mediante correlación cruzada con cada una de las partículas experimentales con el fin de asignarles los tres ángulos de Euler. Se generaron varios modelos iniciales, sin usar nunca la estructura obtenida



**Fig. A.2- Estructura inicial.** Comparación de la estructura de Epac2 en su forma inactiva reconstruida con todas las imágenes recolectadas en el microscopio electrónico, con la estructura resuelta mediante cristalografía (Rehmann et al., 2006). (A) Vistas ortogonales de la estructura de Epac2 resuelta mediante difracción de rayos X. (B) Vistas equivalentes de la estructura determinada por cristalografía filtrada a 25 Å de resolución. (C) Estructura de Epac2 resuelta mediante ME. La flecha señala la zona en la que aparecía masa al modificar el umbral de visualización.

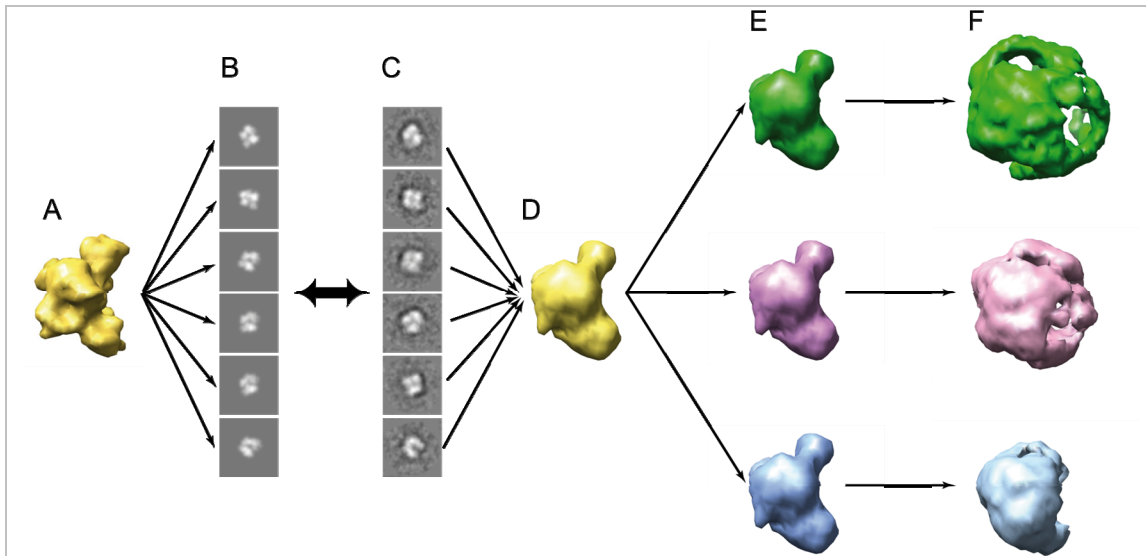
por cristalografía para no introducir ningún sesgo, mediante reconstitución angular (Van Heel, 1987) basado en el teorema de líneas comunes en el espacio de Fourier (Crowther et al., 1970), mediante la generación de modelos gaussianos aleatorios, y utilizando simplemente ruido blanco gaussiano como modelo de partida. Tras varios pasos de refinamiento usando todos estos modelos iniciales llegamos a una solución convergente que se muestra en la **Fig. A.2C**. La comparación de la estructura obtenida mediante microscopía (**Fig. A.2C**) con la de cristalografía filtrada a una resolución comparable (**Fig. A.2B**), reveló un gran parecido. Sin embargo, varios hechos nos indicaron la existencia de errores en la reconstrucción. Cuando se compararon mapas correspondientes a las últimas iteraciones de un mismo proceso de refinamiento, en los que la estructura estaba próxima a la convergencia, se observó que varias zonas sufrían cambios, lo suficientemente importantes, como para que el resultado del encaje de la estructura resuelta mediante difracción de rayos X dependiera del mapa con el que se realizara. Otro punto que alertó de que la estructura sufría algún defecto fue una masa situada en la parte que se denominó posterior (**Fig. A.2C**, flecha), que crecía al modificar el umbral de visualización y que no concordaba con la estructura resuelta mediante cristalografía. Estos defectos en la reconstrucción podían deberse a la presencia de heterogeneidad en nuestras imágenes, pese a que la

muestra tenía un alto grado de pureza según indicaron las electroforesis en geles de poliacrilamida, tanto en presencia de SDS como en condiciones nativas, y la cromatografía de filtración el gel (resultados no mostrados). La primera prueba acerca de cuál era la fuente de heterogeneidad la dio el análisis de los componentes principales (PCA) de las imágenes. PCA es una técnica que puede usarse para simplificar



conjuntos de datos. Formalmente, es una transformación lineal que elige un nuevo sistema de coordenadas para el conjunto de datos, de manera que la mayor fuente de variabilidad recae en el primer eje (también llamado primer componente principal), la segunda lo hace en un eje ortonormal, etc. De esta forma se puede simplificar el conjunto de datos utilizando sólo los componentes que más contribuyen a la variabilidad de la muestra. En la **Fig. A.3A** se pueden observar los 10 primeros componentes principales del conjunto de datos de Epac2 en su forma inactiva. Los halos claros y oscuros de la primera auto-imagen indicaron que la fuente principal de variabilidad en la muestra es la diferencia de tamaños. Esto quedó reflejado en las medias obtenidas a partir de las partículas clasificadas en base al primer componente principal (**Fig. A.3B**). Una vez se evidenció la existencia de mezcla de tamaños en la muestra se separaron las distintas

poblaciones. Para ello se utilizó un refinamiento multi-referencia de manera similar al descrito previamente por otros autores (Chen et al., 2006). Dicho procedimiento se basa en usar varios modelos iniciales, ligeramente diferentes, que son proyectados en todas las direcciones. Dichas proyecciones son comparadas con todas las partículas, dándoles a estas la posibilidad de que, en cada ciclo del refinamiento, se asignen a la proyección con la que obtengan mayor coeficiente de correlación, sin importar de qué modelo provenga esta proyección. Esto permite que las partículas puedan “saltar” de un modelo a otro y eventualmente convergir en grupos coherentes. En nuestro caso concreto, en primer lugar se generaron medias libres de referencia con las partículas de Epac2 (**Fig. A.4C**). Estas medias fueron comparadas, usando SPIDER (Frank et al., 1981), con proyecciones de la estructura resuelta por difracción de rayos X (Rehmann et al., 2006) (**Fig. A.4A,B**), para asignarles los ángulos de Euler. Se emplearon medias en lugar de partículas debido a que su mayor relación señal-ruido facilita su correcta clasificación. La asignación de los ángulos de Euler a las medias permitió reconstruir un nuevo mapa de Epac2 en su conformación inactiva utilizando datos experimentales (**Fig. A.4D**). A partir de este mapa se generaron tres modelos diferentes añadiendo una cantidad mínima de ruido aleatorio (**Fig. A.4E**). Esos tres modelos sutilmente diferentes se utilizaron como datos de entrada para un refinamiento

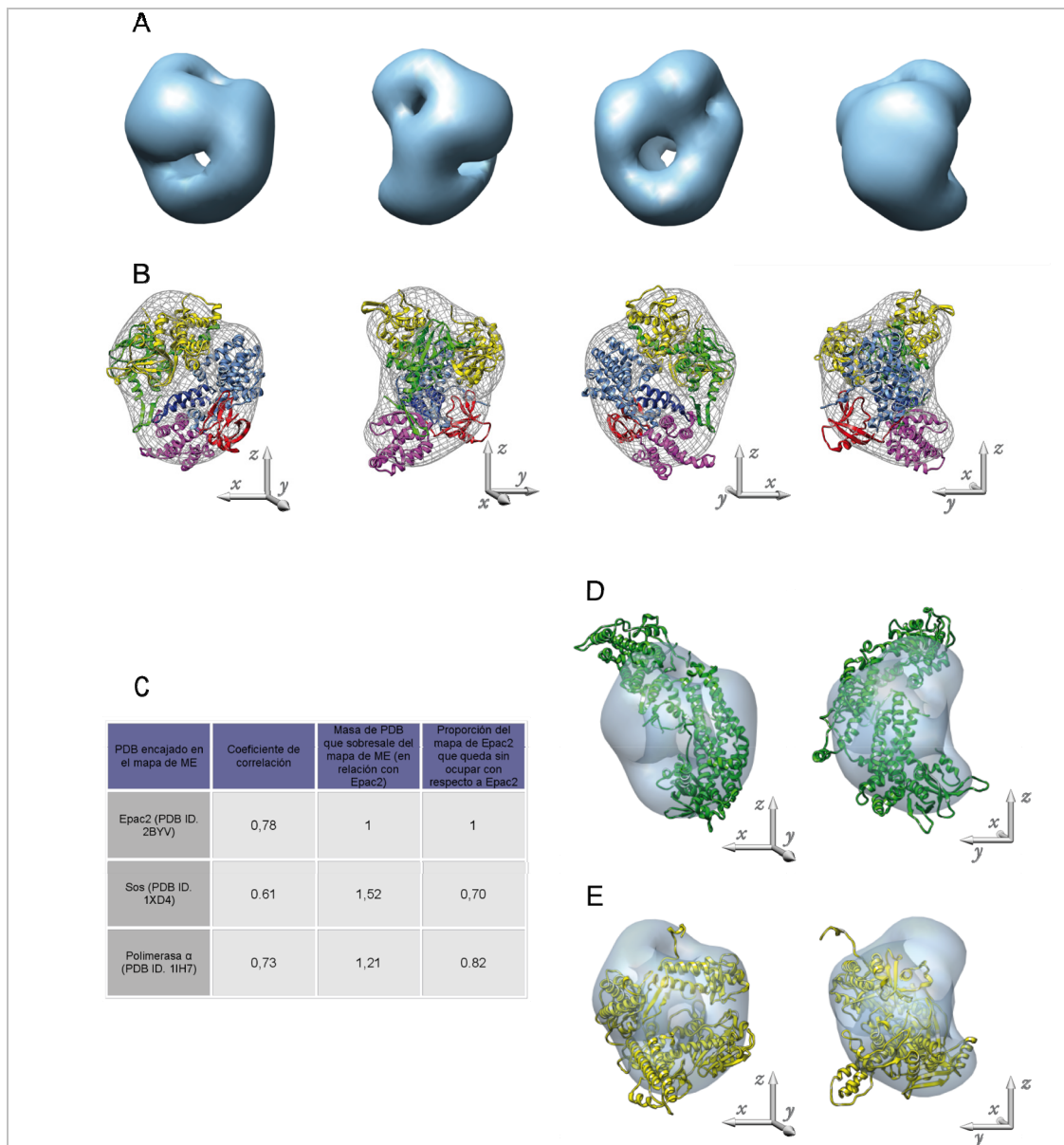


**Fig. A.4- Esquema del refinamiento multi-referencia.** (A) Estructura resuelta mediante difracción de rayos X filtrada a 25 Å de resolución (Rehmann et al., 2006). (B) Proyecciones de la estructura determinada por cristalografía filtrada a 25 Å. (C) Medias libres de referencia de las partículas de Epac2. (D) Mapa reconstruido a partir de las medias libres de referencia, a las que se les asignó los ángulos de Euler comparándolas con las proyecciones de la estructura resuelta mediante difracción de rayos X filtrada a 25 Å de resolución. (E) Modelos iniciales generados añadiendo ruido al azar a la estructura D. (F) Estructuras finales del refinamiento multi-referencia.

multi-referencia. En los primeros ciclos las imágenes fueron asignadas casi al azar a cada una de las tres referencias, pero conforme los tres volúmenes se iban diferenciando, las partículas convergieron en grupos más coherentes. Finalmente, como puede observarse en la **Fig. A.4F**, los volúmenes son marcadamente diferentes, los dos primeros de mayor tamaño y el tercero con unas dimensiones más compatibles con las de la estructura resuelta mediante cristalografía. Cuando las partículas de mayor tamaño, separadas por el refinamiento multi-referencia, fueron procesadas de manera independiente, no se llegó a ninguna estructura estable. Sin embargo, con las partículas más pequeñas sí se pudo reconstruir un volumen estable (**Fig. A.5A**) que recordaba al obtenido con la mezcla de partículas y a la estructura filtrada de la resuelta mediante cristalografía (**Fig. A.2B**). La resolución de esta reconstrucción es de 30 Å (valor a 0,5 de la correlación de los anillos de Fourier).

### **Encaje de la estructura de Epac2 determinada por difracción de rayos X en el mapa reconstruido mediante ME.**

La estructura resuelta mediante cristalografía (Rehmann et al., 2006) (PDB ID. 2BYV) fue encajada en el mapa de microscopía utilizando dos programas informáticos: Situs (Wriggers et al., 1999; Chacon y Wriggers, 2002) y ADP\_EM (Garzon et al., 2007). Ambos programas daban como primera opción la mostrada en la **Fig. A.5B** con un coeficiente de



**Fig. A.5- Estructura de Epac2 inactiva resuelta mediante ME. (A)** Vistas de la estructura de Epac2 filtrada a 30 Å. **(B)** Vistas del encaje de la estructura de cristalografía de Epac2 inactiva en la estructura de ME. El código de colores es el mismo que el empleado en el capítulo 3 de Resultados. **(C)** Tabla resumen de los datos de los encajes de las estructuras resueltas mediante difracción de rayos X en el mapa de microscopía. **(D)** Encaje de la estructura de un fragmento de Sos (PDB ID. 1XD4) (Sondermann et al., 2004) en el mapa de Epac2 resuelto por ME. **(E)** Encaje de la estructura de cristalografía de la polimerasa  $\alpha$  (PDB ID. 1IH7) (Franklin et al., 2001) en la estructura de Epac2 determinada por ME.

correlación de 0,78, indicándonos un buen grado de similitud entre las estructuras tridimensionales resueltas mediante ME y difracción de rayos X, a 30 Å de resolución. Para remarcar que el buen resultado del encaje no fue casual se comparó con el encaje de dos proteínas de un tamaño similar: un fragmento de Sos (PDB ID. 1XD4) (Sondermann et al., 2004) (**Fig. A.5D**), que también es un GEF, y como ejemplo de una proteína globular del mismo tamaño se utilizó una polimerasa (PDB ID. 1IH7)

(Franklin et al., 2001) (**Fig. A.5E**). En ambos casos los coeficientes de correlación fueron inferiores al obtenido con Epac2, sobresaliendo mayor parte de las estructuras resueltas mediante cristalografía, y dejando sin ocupar más regiones del mapa de microscopía (se puede ver un resumen de los datos en la tabla de la **Fig. A.5C**).

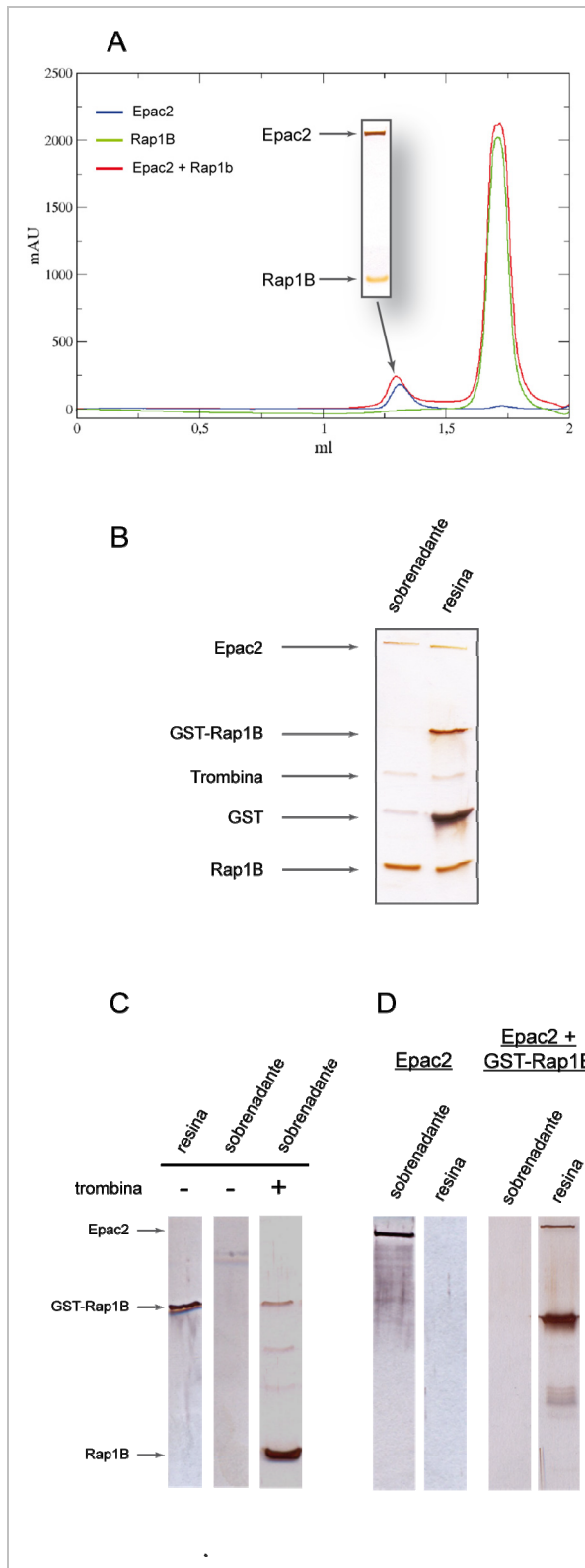
En conclusión, la reconstrucción de Epac2 en su conformación inactiva obtenida mediante ME es compatible con la estructura resuelta mediante cristalografía, por lo tanto, se decidió abordar el estudio de la conformación activa con el objeto de comprender los fundamentos estructurales de la regulación de esta proteína.

### **Estudio de la forma activa Epac2·cAMP y de Epac2 unida a el análogo de cAMP, 8-pCPT-2'-O-Me-CAMP.**

Se realizaron varios intentos para resolver la estructura de Epac2 unida a su activador, el cAMP. Las constantes de disociación de este segundo mensajero para los dominios CNB-1 y CNB-2 de Epac2 son de 87 y 1,2  $\mu\text{M}$  respectivamente (de Rooij et al., 2000), y la mitad de la actividad máxima ( $AC_{50}$ ) de Epac2 es de 20  $\mu\text{M}$  (Rehmann et al., 2008). Todos los experimentos de ME se realizaron en presencia de al menos 500  $\mu\text{M}$  de cAMP para producir la saturación de la proteína, cuya concentración siempre estuvo por debajo de 1  $\mu\text{M}$ . Se tomaron imágenes que fueron procesadas de manera similar a las de Epac2 inactiva, pero en este caso no se pudo llegar a ninguna estructura que convergiera de manera estable. Para intentar solucionarlo se decidió emplear un análogo de cAMP (8-pCPT-2'-O-Me-CAMP, (Enserink et al., 2002)), cuya  $AC_{50}$  es 25 veces inferior, e incrementa la actividad máxima de Epac 3,6 veces frente a el cAMP (Rehmann et al., 2003b). Este análogo aumenta la proporción de moléculas en su forma activa, sin embargo, pese a su utilización, no se pudo determinar la estructura de la proteína en esta conformación. Una posible causa es que, sumado a la dificultad de reconstruir una proteína sin simetría de este tamaño, hay que añadir que tanto el cAMP como su análogo puede que sólo induzcan el cambio conformacional, necesario para la activación, en un porcentaje pequeño de las partículas, elevando así el grado de heterogeneidad que existía previamente en la muestra.

### **Purificación del complejo Epac2·cAMP·Rap1B**

Los complejos formados entre un GEF y una GTPasa en ausencia de nucleótido forman interacciones estables debido a que las GTPasas que no poseen un nucleótido de guanina en su sitio de unión son muy inestables en disolución. Con esto en mente se purificó Epac2 (la proteína completa) utilizando Rap1B como anzuelo. En primer lugar se comprobó si Epac2 y Rap1B forman un complejo en presencia de cAMP y en ausencia de nucleótidos de guanina mediante una cromatografía de exclusión molecular (Superdex 200 PC3.2/30, GE Healthcare) (**Fig.**



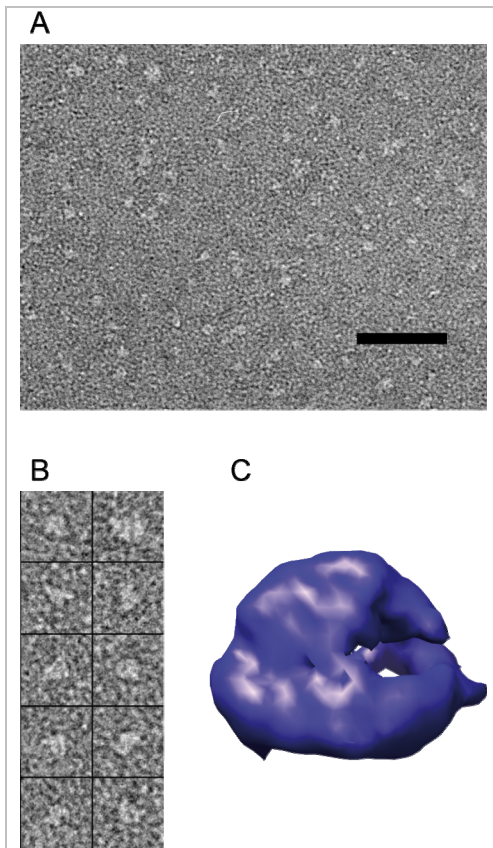
**Fig. A6- Purificación del complejo Epac2 · cAMP · Rap1B.** (A) Perfiles de elución de las cromatografías de exclusión molecular de Epac2 (azul), Rap1B (verde) y de las dos proteínas juntas (rojo). Todas las carreras se realizaron en presencia de 500  $\mu$ M de cAMP. Se muestra la calle del gel PAGE-SDS en la que se analizó el pico del complejo, donde se puede observar la presencia de Rap1B y de Epac2 en el mismo volumen de elución. (B) Gel PAGE-SDS en el que se analizó el resultado de la purificación del complejo con la resina de glutatión. Se cargó la misma cantidad de sobrenadante que de resina, por ello se observa la misma cantidad de Epac2 y de Rap1B en las dos calles. En la resina se observa GST-Rap1B que no es digerida, así como toda la GST que sí lo ha sido. También se aprecian trazas de trombina. (C) Controles realizados con GST-Rap1B. En la primera calle se observa que GST-Rap1B se une a la resina de glutatión. En la segunda calle se cargó sobrenadante sin incubar con trombina y no aparece ninguna banda. En la tercera calle se cargó la misma cantidad de sobrenadante, incubando previamente con trombina, y puede distinguirse una banda débil de GST-Rap1B que queda sin digerir y otra banda que corresponde a Rap1B. (D) Controles realizados con Epac2. En las dos primeras calles se observa que cuando Epac2 se incuba con la resina de glutatión no se produce su unión. En las dos últimas calles se aprecia que la unión de Epac2 ocurre cuando se incuba en presencia de GST-Rap1B y cAMP.

**A.6A).** En los controles se determinó el volumen de elución de Epac2 y Rap1B cuando son inyectadas aisladamente (Fig. A.6A, líneas azul y verde). Únicamente en el caso en el que las dos proteínas se añadieron juntas en presencia de cAMP se detectó, mediante electroforesis, la presencia de Rap1B en el volumen de elución de Epac2 (Fig. A.6A). De esta manera quedó patente la formación del complejo entre las dos

proteínas. Se utilizaron distintas aproximaciones para cuantificar la masa de las proteínas y la proporción entre ellas con el objetivo de determinar qué cantidad, del total de Epac2 presente en el pico del complejo, se hallaba formando parte de él: se usaron sus coeficientes de extinción molar, el análisis de sus aminoácidos, rectas patrón creadas a partir de varias proteínas, así como la cuantificación de distintas tinciones realizadas con fluoróforos como el SYPRO Ruby (Bio-Rad), que es un agente que tiñe a saturación y de forma más homogénea que el Coomassie o la tinción con plata, tanto en PAGE-SDS convencionales como en electroforesis en chip (Experion, Bio-Rad). Los errores obtenidos cuando se compararon los resultados de las distintas técnicas fueron de órdenes de magnitud, por lo que no se pudo determinar el porcentaje de Epac2 presente en la fracción del complejo de la cromatografía que se hallaba unido a Rap1B. Este punto es de especial relevancia ya que si existe Epac2 libre, la heterogeneidad puede ser tal que impida la determinación estructural del complejo. Por ello se procedió a la purificación del complejo para su observación al ME siguiendo una estrategia distinta. Se incubó, en presencia de cAMP, Epac2 con la proteína de fusión GST-Rap1B. A esta mezcla se le adicionó una resina de glutatión a la que se unió Rap1B por medio de la proteína GST, fusionada en su extremo amino-terminal. Tras varios lavados se añadió la proteasa trombina que cortó la proteína de fusión en una secuencia diana específica, lo que produjo que Rap1B se desprendiera de la resina, mientras la GST permaneció anclada (**Fig. A.6B**). En el sobrenadante se identificó la presencia de Epac2, que se mantuvo unida a Rap1B (**Fig. A.6B**). Esta muestra fue preparada inmediatamente para su observación al microscopio electrónico. Previamente se realizaron los controles en los que se comprobó que GST-Rap1B se une a la resina y que sólo se desprende tras ser digerida por la trombina (**Fig. A.6C**). Epac2 no se une a la resina a no ser en presencia de GST-Rap1B y cAMP, y sólo se encuentra en el sobrenadante, junto a Rap1B, en el caso de que finalmente se añada trombina (**Fig. A.6B y D**). Con la proteína purificada de esta manera se tuvo la certeza de que toda la proteína Epac2 que se observó al microscopio electrónico estaba unida a Rap1B, y por lo tanto su conformación era la activa, eliminando así la incertidumbre que existía en el caso de Epac2 unida a cAMP o a su análogo.

### **Reconstrucción tridimensional del complejo Epac2·cAMP·Rap1B.**

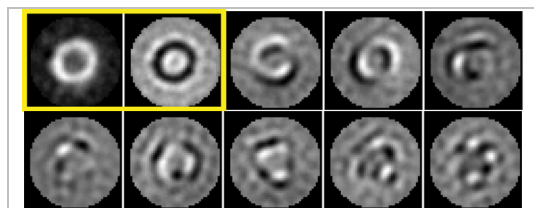
Se tomaron varias micrografías del complejo eluido de la resina teñido negativamente con formiato de uranilo al 2% (**Fig. A.7A**), que fueron tratadas de igual manera que en el caso de Epac2 en su forma inactiva descrita al comienzo de este anexo. Se obtuvieron 8712 partículas individuales (**Fig. A.7B**) que se sometieron a varios refinamientos angulares utilizando EMAN (Ludtke et al., 1999). Como modelos iniciales se usaron volúmenes generados, al igual que en caso



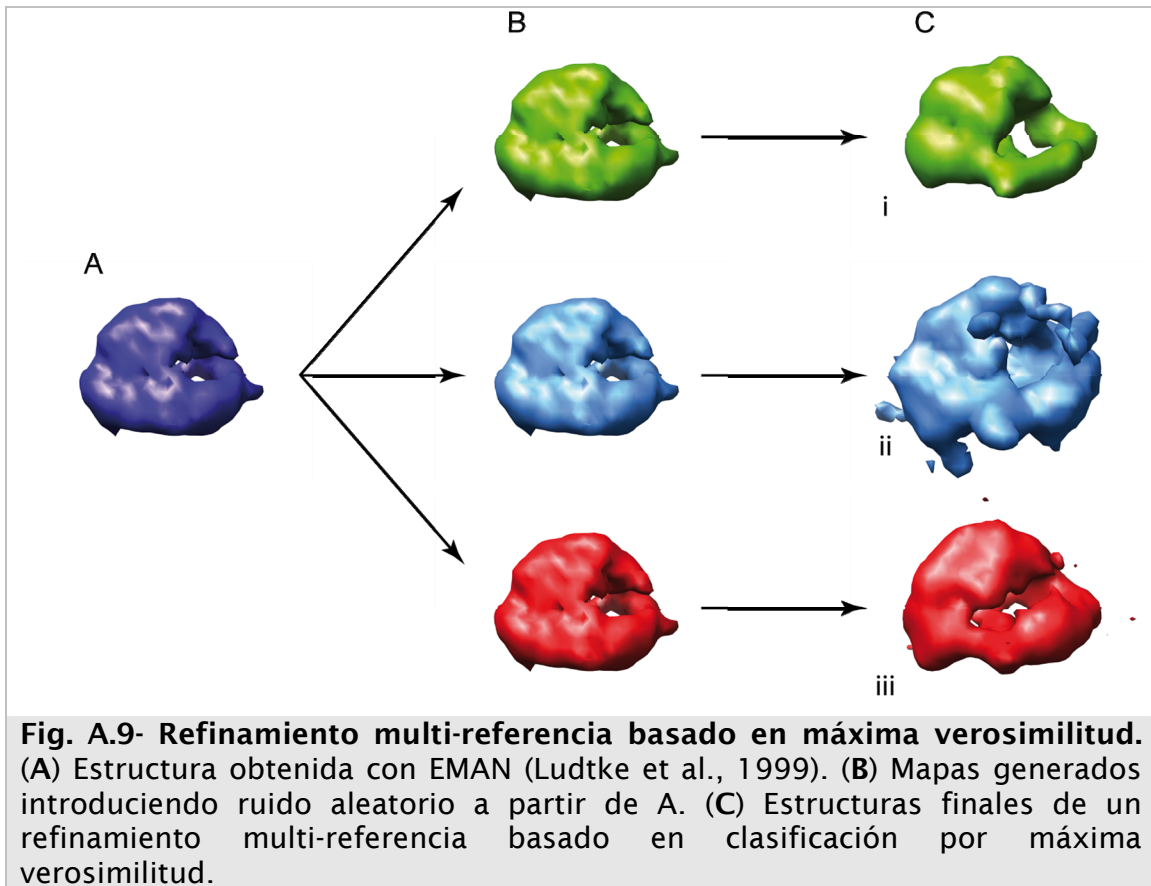
**Fig. A.7- Microscopía electrónica del complejo Epac2·cAMP·Rap1B.** (A) Campo de una micrografía del complejo. La barra de escala corresponde a 500 Å. (B) Galería de partículas del complejo. (C) Estructura del complejo obtenida a partir del refinamiento de ruido blanco gaussiano.

de Epac2 inactiva, mediante reconstitución angular (Van Heel, 1987), empleando mapas de densidad aleatorios o partiendo de ruido gaussiano. En ningún caso nos servimos de las estructuras resueltas mediante cristalografía: ni la de Epac2 en su estado inactivo (Rehmann et al., 2006), ni de la del complejo Epac2 $\Delta$ 305·cAMP·Rap1B, ni tampoco de la reconstrucción de ME de Epac2 en su conformación inactiva resuelta previamente (**Fig. A.5A**). Varios de estos procesamientos convergieron en la misma estructura (**Fig. A.7C**), si bien no obtuvimos un grado de detalle suficiente como para interpretarla sin ambigüedades. Esto sugirió la posible existencia de heterogeneidad en las partículas, como ocurrió en el caso de la proteína inactiva. Se realizó un análisis de los componentes principales que evidenció en sus dos primeras autoimágenes la presencia de diferentes poblaciones de partículas con distintos tamaños (**Fig. A.8**). A la vista de estos datos se realizó un refinamiento multi-referencia basado en clasificación por máxima verosimilitud (Scheres et al., 2007) implementado en el paquete informático Xmipp (Marabini et al., 1996; Sorzano et al., 2004) para conseguir grupos de partículas más

homogéneas. El procedimiento seguido se compuso de varios pasos: primero se filtró un mapa de densidad estabilizado, cuyo modelo inicial fue ruido gaussiano que fue refinado con EMAN (Ludtke et al., 1999) (**Fig. A.9A**), para eliminarle las altas frecuencias con la finalidad de que estas no introdujesen ningún sesgo ni creasen artefactos. Seguidamente se dividió aleatoriamente el conjunto de partículas en tres subgrupos con los que se reconstruyeron sendos volúmenes muy similares pero no idénticos (**Fig. A.9B**). Estos tres volúmenes se utilizaron como “semillas”, o volúmenes iniciales, del refinamiento multi-referencia basado en máxima verosimilitud. El esquema de este refinamiento multi-referencia es muy similar al realizado con EMAN (Ludtke et al., 1999) en el caso de



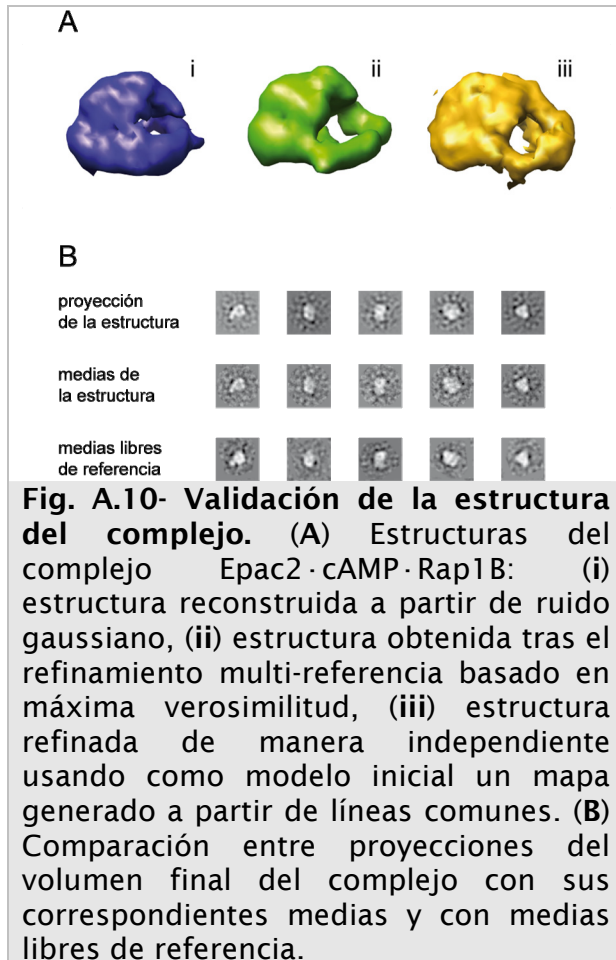
**Fig. A.8- PCA del complejo Epac2·cAMP·Rap1B.** Se muestran los diez primeros componentes principales.



**Fig. A.9- Refinamiento multi-referencia basado en máxima verosimilitud.** (A) Estructura obtenida con EMAN (Ludtke et al., 1999). (B) Mapas generados introduciendo ruido aleatorio a partir de A. (C) Estructuras finales de un refinamiento multi-referencia basado en clasificación por máxima verosimilitud.

Epac2 inactiva pero con una salvedad importante, en este caso las partículas no se asignan únicamente a la proyección con la que obtienen un mayor coeficiente de correlación, sino que cada partícula puede clasificarse en varias proyecciones a la vez, ponderando su grado de participación en función de su similitud. Cuando el refinamiento converge, la distribución de probabilidad de la mayoría de las partículas se aproxima a una función delta. Esto quiere decir que al final del multi-refinamiento la mayor parte de las partículas son asignadas a un modelo determinado. Se realizó este procedimiento varias veces y siempre se llegó a un resultado similar al mostrado en la **Fig. A.9C**; dos de los volúmenes eran muy parecidos entre sí (**Fig. A.9C**, i y iii) y el tercero era de un tamaño mayor (**Fig. A.9C**, ii). Se seleccionó la estructura mostrada en la **Fig. A.9C**, i, como la reconstrucción final del complejo Epac2·cAMP·Rap1B por varias razones: era el que estaba formado por un mayor número de partículas, el volumen se reproducía en multi-refinamientos independientes y porque existía un alto porcentaje de coincidencia en las partículas que formaban estos volúmenes independientes. Además de la reproducibilidad de los resultados de los refinamientos multi-referencia, existen otros datos que refuerzan la validez de la estructura final:

a) el volumen tiene mucho parecido con otros volúmenes reconstruidos independientemente con EMAN utilizando varias estrategias distintas (Ludtke et al., 1999) (**Fig. A.10A**).



b) se encontraron medias libres de referencia muy similares a las medias que forman el volumen y a sus correspondientes proyecciones (Fig. A.10B).

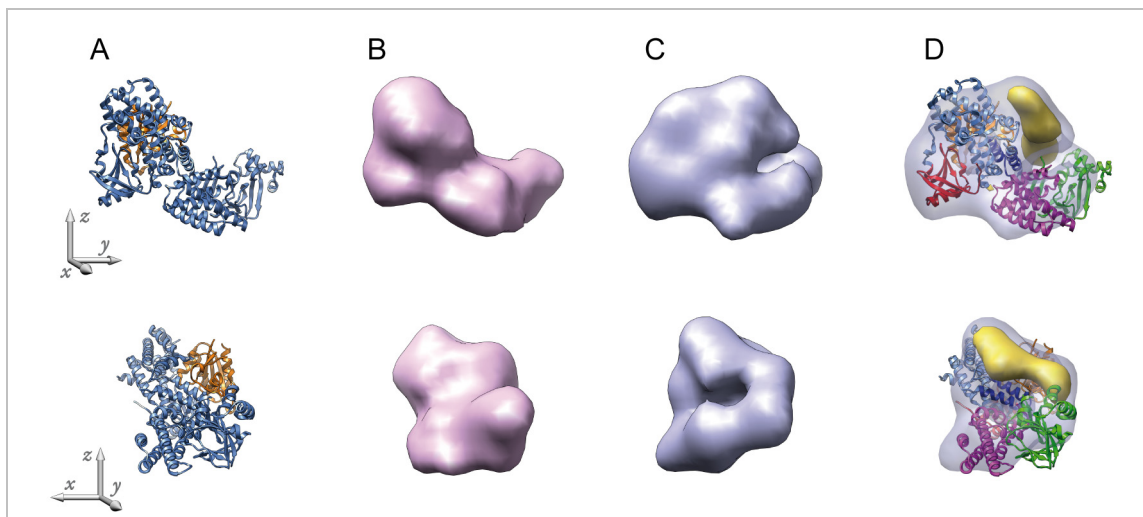
c) la gran similitud que existe entre el mapa de microscopía y la estructura del complejo con Epac2 truncada, resuelto mediante cristalografía y filtrado a una resolución comparable (Fig. A.11B y C).

### Encaje de la estructura del complejo Epac2 $\Delta$ 305·cAMP·Rap1B resuelta mediante difracción de rayos X en el mapa de ME.

Se comparó la estructura del complejo Epac2 $\Delta$ 305·cAMP·Rap1B resuelta mediante cristalografía con la reconstruida mediante ME y procesamiento de imágenes con un doble objetivo, validar la

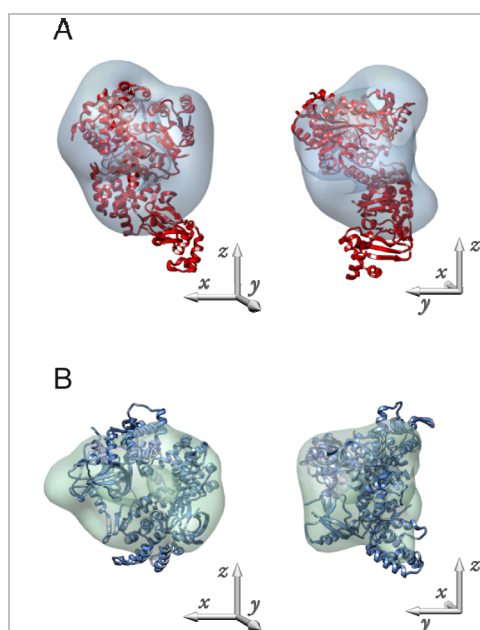
estructura de ME e identificar los dos dominios amino-terminales de Epac2 (CNB-1 y DEP), presentes en la estructura del complejo resuelta mediante ME pero no en el complejo resuelto mediante difracción de rayos X.

El encaje se realizó computacionalmente usando COLORES (Chacon y Wriggers, 2002), implementado en Situs (Wriggers et al., 1999), y ADP\_EM (Garzon et al., 2007). En ambos casos las soluciones que dieron un mayor coeficiente de correlación eran indistinguibles (Fig. A.11D). Este hecho junto al alto coeficiente de correlación obtenido (0,79), teniendo en cuenta que la estructura resuelta mediante cristalografía es un mutante de delección que no da cuenta de toda la masa reconstruida mediante ME, es un indicativo de que la estructura de ME es correcta. Como control se realizó el encaje cruzado entre la estructura de el complejo Epac2 $\Delta$ 305·cAMP·Rap1B, determinada mediante cristalografía, en el mapa de Epac2 en su conformación inactiva resuelto por ME (Fig. A.12A), que dio un coeficiente de correlación de 0,65, inferior al que se obtuvo en el encaje de la estructura atómica en su estado inactivo (0,78). También se calculó entre la estructura de Epac2 en su estado inactivo (PDB ID. 2BYV) (Rehmann et al., 2006) en el mapa del complejo Epac2·cAMP·Rap1B determinado por ME (Fig. A.12B), dando un valor de correlación de 0,74 frente al 0,79 que se obtuvo cuando el encaje se realizó con la



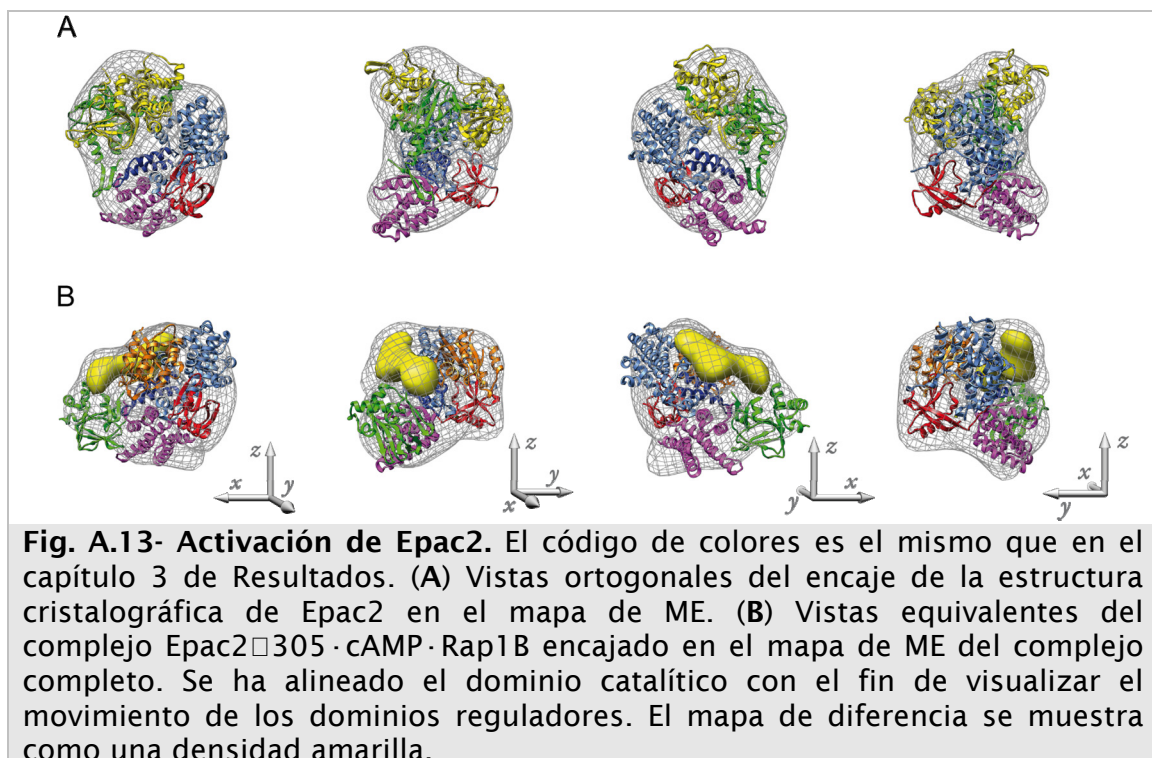
**Fig. A.11- Comparación con la estructura del complejo Epac2 $\Delta$ 305·cAMP·Rap1B resuelta mediante cristalografía con la estructura de Epac2·cAMP·Rap1B.** (A) Estructura del complejo Epac2 $\Delta$ 305·cAMP·Rap1B resuelto mediante cristalografía. Epac2 $\Delta$ 305 en azul, Rap1B en naranja. (B) Estructura del complejo resuelto por cristalografía filtrado a 23 Å. (C) Estructura de Epac2·cAMP·Rap1B resuelta mediante ME. (D) Encaje de la estructura determinada mediante difracción de rayos X en la de ME. El código de colores de la estructura cristalográfica es el mismo que el del capítulo 3 de resultados. El mapa de diferencia entre las dos estructuras se muestra en amarillo.

estructura atómica de Epac2 $\Delta$ 305·cAMP·Rap1B. Tanto los coeficientes de correlación como su inspección visual, reflejan que los encajes cruzados son de peor calidad que los encajes de las estructuras determinadas mediante difracción de rayos X en sus correspondientes mapas de ME, dando otro argumento a favor de la validez de las estructuras resueltas. Para dar respuesta al segundo objetivo se calculó el mapa de diferencia entre las dos estructuras (**Fig. A.11D**). El resultado fue una masa



**Fig. A.12- Encaje cruzado.** (A) Encaje de la estructura del complejo Epac2 $\Delta$ 305·cAMP·Rap1B determinada mediante cristalografía en el mapa de Epac2 en su conformación inactiva resuelto mediante ME. (B) Encaje entre la estructura de Epac2 en su estado inactivo (PDB ID. 2BYV) (Rehmann et al., 2006) en el mapa del complejo Epac2·cAMP·Rap1B determinado por ME.

bilobulada situada cerca de los dominios catalíticos y del dominio CNB-2 que puede dar cuenta del dominio CNB-1 y del dominio DEP. Esta disposición hace que la estructura activa siga siendo compacta y no extendida, como ocurriría si los tres dominios reguladores se movieran como un bloque con respecto a la conformación inactiva. Pese a que la resolución alcanzada no permite la identificación directa de los dominios, proponemos que la masa más cercana al dominio CNB-2 sea el dominio DEP, atendiendo a la longitud de la cadena polipeptídica y al tamaño de los dominios. En la **Fig. A.13** se muestran varias vistas del encaje de la estructura cristalográfica en el mapa de ME, tanto en su forma activa como inactiva, con los dominios catalíticos alineados, con el fin de ilustrar los cambios conformacionales que ocurren en el proceso de activación de Epac2.





# Discusión

## 4. Discusión

Muchas de las proteínas involucradas en señalización y regulación de las rutas en las que están implicadas las GTPasas de la superfamilia Ras, son proteínas modulares (formadas por múltiples dominios) que poseen una regulación muy compleja. La mayor parte del trabajo sobre la estructura de estas macromoléculas ha sido realizado mediante cristalografía y difracción de rayos X y RMN por lo que, pese al enorme avance que ha supuesto en el conocimiento de estas proteínas, la información obtenida se limita a un dominio o a un conjunto de unos pocos dominios. El estudio de fragmentos aislados, fuera del contexto global de la proteína, muchas veces no permite entender la regulación de la proteína completa. Es por eso que en esta tesis se ha analizado la estructura y regulación de tres proteínas íntegras, para lo que se ha empleado principalmente la microscopía electrónica y el procesamiento digital de imágenes.

### 4.1 Microscopía electrónica y procesamiento digital de imágenes de especímenes de tamaño pequeño

A pesar de que las muestras óptimas para la ME de partículas individuales son los grandes complejos macromoleculares (Mitra y Frank, 2006; Yu et al., 2008), también existen casos en los que se han estudiado especímenes de menor masa molecular (Martin-Benito et al., 2002; Okorokov et al., 2004; Boskovic et al., 2007). Ya se ha mencionado en la introducción que la mejor manera de preparar muestras de pequeño tamaño (< 500 kDa) es la tinción negativa (Ohi et al., 2004). Esta técnica tiene grandes ventajas, principalmente que la muestra se observa con mayor facilidad gracias al mayor contraste, pero también serios inconvenientes. Uno, al que ya hemos hecho referencia, es que el tamaño del grano de tinción limita la resolución que se puede obtener, y otro, de gran importancia, es que la tinción puede introducir una fuente adicional de variabilidad a la ya existente (bioquímica y conformacional), al producir deformaciones y aplastamiento en las moléculas de proteína. En los trabajos descritos en esta tesis se menciona que cierto porcentaje de partículas han sido descartadas para reconstruir los mapas presentados. Puede que algunas de esas partículas no se clasificasen homogéneamente debido a que su relación señal-ruido fuera baja o a otras razones. Sin embargo creemos que gran parte de esas imágenes, sobre todo en el caso de Epac2, corresponden a moléculas que han sufrido deformaciones y aplastamientos a causa de la tinción. Se menciona el caso de Epac2 porque esta muestra era especialmente pura e incluso nuestros colaboradores obtuvieron cristales con ella (Rehmann et al., 2006). No obstante, cuando se observaba al microscopio electrónico, la heterogeneidad de tamaños era evidente. En un principio se pensó en la posible existencia de dímeros, pese a que nunca habían sido descritos. Tras los resultados negativos

de las nuevas pruebas bioquímicas realizadas y la imposibilidad de conseguir una estructura coherente con esas imágenes, se descartó la hipótesis de los dímeros. Un tanto por ciento elevado de estas partículas de mayor tamaño se asignaban dentro del mismo grupo cuando se repetían los refinamientos multi-referencia descritos en el anexo al tercer capítulo de los resultados. A partir de este subconjunto se obtenían mapas de mayores dimensiones que el resto y que, procesados de manera independiente, no convergían en ningún punto. Por estos motivos se pensó que eran moléculas deformadas o aplastadas que, en cualquier caso, no eran coherentes con las demás. Parece que la presencia de partículas defectuosas en las muestras teñidas negativamente es bastante común (aunque, por supuesto, dependerá de la macromolécula estudiada), por lo que parece buena idea analizar la heterogeneidad y realizar refinamientos multi-referencia, para obtener subconjuntos de datos más coherentes entre sí.

## 4.2 La activación de Vav3 es regulada mediante interacciones intramoleculares

Los resultados obtenidos en esta tesis ayudan a entender los mecanismos que regulan la activación de Vav durante la señalización celular. Se ha resuelto la estructura de Vav3, mediante ME y procesamiento de imágenes, en tres estados de activación: inactivo, activo (fosforilado) y constitutivamente activo ( $\Delta 1-144$ ) (**Fig. 3, 4 y 6** del capítulo 1 de Resultados). En todas las estructuras se observa que la masa se distribuye de manera desigual en dos regiones; una región más voluminosa que engloba los dominios implicados en la actividad intercambiadora y su control (CH, Ac, DH, PH y ZF), y otra zona donde se localizan los dominios que participan en la interacción con otras proteínas (SH3, SH2, SH3). Por consiguiente, hay una correspondencia entre las principales funciones ejercidas por Vav3 (Tybulewicz et al., 2003) y la distribución espacial de sus dominios. El encaje de estructuras de dominios homólogos resueltos mediante cristalografía y RMN en los mapas de ME, ha hecho posible interpretar los mapas con un mayor nivel de detalle. Principalmente se ha utilizado para localizar de manera global los dominios dentro de la proteína completa, pero incluso en algunos casos ha servido para proponer zonas de interacción más precisas, siempre que fuese respaldado por datos bioquímicos. El empleo de este tipo de estrategia ha llevado a proponer al CH como un dominio clave en la regulación de la proteína. Su papel es el de estabilizar la región ácida para que se produzca la inhibición de la actividad, de hecho, en la forma constitutivamente activa ( $\Delta 1-144$ ), a la que se ha delecionado el dominio CH, la región ácida desaparece de la reconstrucción. Únicamente variando el umbral de visualización, de manera que aparezca más densidad, se es capaz de distinguir una masa difusa que despunta de la región que ocupa el DH. Esta función estabilizadora permite explicar el comportamiento paradójico de los mutantes de deleción  $\Delta 1-189$  y  $\Delta 1-144$  (**Fig. 1A** del capítulo 1 de

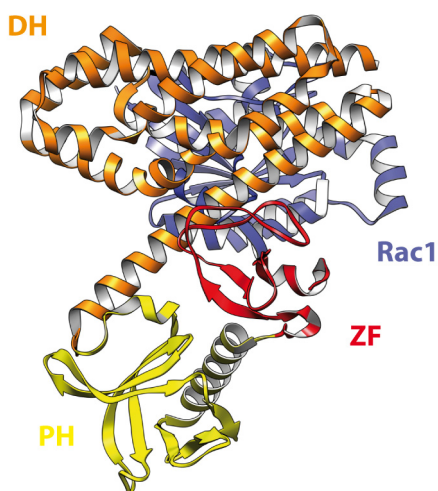
Resultados), que muestran la misma actividad independiente de fosforilación pese a que el segundo mutante conserva íntegra la región ácida (Zugaza et al., 2002) (**Fig. 5B** del capítulo 1 de Resultados). Además los mapas obtenidos por ME coinciden con datos bioquímicos publicados previamente (Zugaza et al., 2002) que sugerían que el dominio CH interacciona con el ZF en el estado inactivo. Se han identificado algunos aminoácidos importantes para el establecimiento de esta interacción, sin embargo, cuando son mutados no dan lugar a actividad oncogénica, por lo que su posible función es la de disponer a los dominios responsables de la localización e interacción con otras proteínas en una orientación diferente en la forma activa e inactiva.

La tercera estructura estudiada es la del mutante constitutivamente activo  $\Delta 1-144$  (**Fig. 6** del capítulo 1 de Resultados). La proteína adopta una conformación lineal en la que no existe ningún obstáculo observable a esta resolución que impida el acceso del sustrato al sitio activo. Es importante destacar que la disposición de los dominios no es igual que en la forma activa, lo que sugiere que los mecanismos que conducen a un comportamiento oncogénico pueden ser más complejos que la mera eliminación de las interacciones inhibitorias. Estas diferencias entre la conformación de la proteína en su estado inactivo y el mutante oncogénico pueden estar relacionadas, al menos en parte, con que la proteína mutante muestre una capacidad transformante mucho mayor que cualquiera de las mutaciones puntuales descritas que activan a la proteína (**Fig. 5B** del capítulo 1 de Resultados).

La determinación de la estructura de estos tres estados de activación de la proteína Vav3 completa ha permitido proponer un modelo de regulación (**Fig. 7** del capítulo 1 de Resultados). En la proteína inactiva el dominio CH se encuentra interaccionando con el ZF y estabilizando a la región ácida que ocupa el centro activo. Cuando se produce la estimulación celular, Vav se une a la tirosín quinasa Syk a través de su dominio SH2 (Deckert et al., 1996) y la tirosina 173 (numeración de Vav3), situada en la región ácida, es fosforilada. La introducción del grupo fosfato libera la inhibición que ejerce la región ácida y estabiliza la conformación activa. Este mecanismo de activación puede ser similar a la que ocurre con determinados mutantes puntuales que activan la proteína. Sin embargo, la delección de la parte N-terminal de la proteína tiene un efecto tan pronunciado que hace que la conformación sea distinta a la de la proteína silvestre fosforilada, lo que ayuda a explicar la alta capacidad oncogénica de este mutante.

### **Estructura atómica de los dominios DH-PH-ZF de Vav1 unidos a Rac1**

Muy recientemente han aparecido dos publicaciones simultáneas que describen la estructura resuelta por cristalografía y difracción de rayos X de los dominios de Vav1 DH-PH-ZF unidos a su sustrato, la



**Fig. 4.1- Estructura del complejo DH-PH-ZF de Vav1 unido a Rac1.** Estructura del complejo DH-PH-ZF de Vav1 unido a Rac1 mediante cristalografía y difracción de rayos X (PDB ID. 2VRW) (Rapley et al., 2008). El dominio DH (coloreado en naranja) se une a la GTPasa Rac1 (azul). El PH (amarillo) y el ZF (rojo) interactúan con la hélice  $\alpha$  C-terminal del dominio DH pero no lo hacen con la GTPasa.

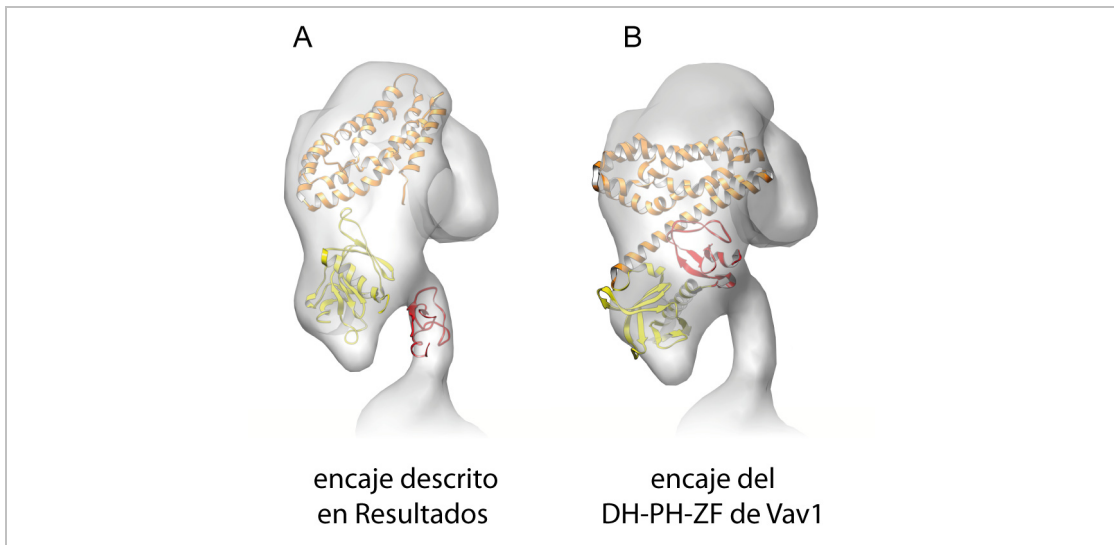
GTPasa Rac1 (Chrencik et al., 2008; Rapley et al., 2008) (Fig. 4.1). Ambas estructuras son muy similares y describen una conformación

compacta en la que el PH y el ZF interactúan con el dominio DH. Se sabía que estos dominios PH y ZF son fundamentales para la regulación de la proteína y para que se produzca el intercambio de nucleótidos (Movilla y Bustelo, 1999; Zugaza et al., 2002) y se pensaba que podían participar en la unión del sustrato. Sin embargo, debido a la posición que adoptan estos dominios en la estructura de Vav3 activa resuelta mediante ME en esta tesis, sugerimos que no puedan interactuar con la GTPasa y que realicen su función de manera indirecta. Los trabajos de cristalografía antes mencionados confirman esta hipótesis (Chrencik et al., 2008; Rapley et

al., 2008). Los dominios PH y ZF no interactúan directamente con Rac1 sino que estabilizan la hélice  $\alpha$  C-terminal del dominio DH que sí participa en la unión de la GTPasa y en el intercambio de nucleótidos. La distinta longitud y grado de flexibilidad que presenta esta hélice la hace responsable de la gran variabilidad existente en la orientación relativa entre los dominios DH y PH que encontramos en los distintos intercambiadores de nucleótidos (Worthylake et al., 2000, 2004; Chhatrivala et al., 2007).

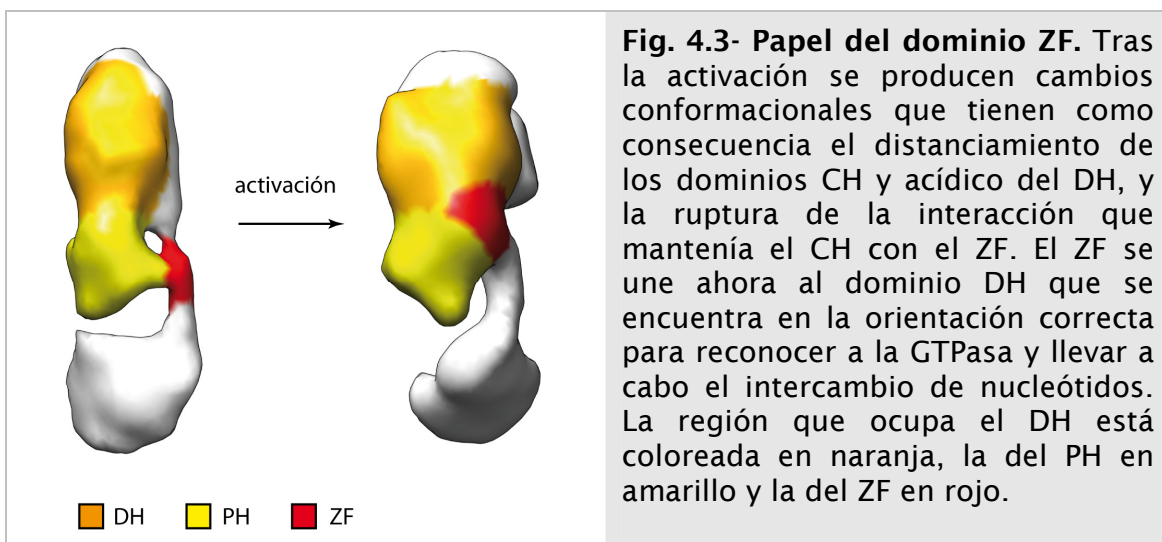
Cuando encajamos la estructura atómica de los dominios DH-PH-ZF de Vav1 (sin la GTPasa) en el mapa de microscopía de Vav3 activa, podemos observar ciertas diferencias con respecto a la orientación de los dominios propuesta en Resultados (Fig. 4.2). Estos cambios pueden resumirse en que, en la estructura resuelta mediante cristalografía, los dominios DH y ZF se encuentran más cercanos de lo que se había propuesto en base a los mapas de ME. Esta diferencia puede deberse a errores en la localización precisa de estos dominios tan pequeños en los mapas de ME, debido a su baja resolución (22 Å) y a que lo reconstruido es el molde que forma la proteína en el agente de tinción. Sin embargo, hay que tener muy presente que la diferencia observada puede deberse a otros tres factores. Primero, las estructuras analizadas corresponden a distintas isoformas (Vav1 en las de cristalografía y Vav3 en ME). Segundo, las estructuras resueltas por cristalografía sólo contienen tres dominios de los ocho que posee la proteína, por lo tanto, no están en el

contexto de la proteína completa. Y por último, las estructuras resueltas a resolución atómica han sido cocristalizadas con el sustrato, mientras que ninguno de los estudios de ME ha sido realizado en presencia de



**Fig. 4.2- Encaje de los dominios DH-PH-ZF de Vav1.** (A) Encaje, descrito en Resultados, de los dominios aislados de proteínas homólogas en el mapa de ME de Vav3 activa. (B) Encaje de la estructura de Vav1 resuelta mediante cristalografía (PDB ID. 2VRW) (Rapley et al., 2008) en el mismo mapa de ME de Vav3 activa. La GTPasa ha sido eliminada ya que la estructura de ME fue resuelta en ausencia de sustrato. DH coloreado en naranja, PH en amarillo y ZF en rojo.

GTPasas. En cualquier caso, si se reinterpretasen los mapas de ME a la luz de los nuevos datos de cristalografía, esta diferencia no afectaría al modelo de activación propuesto en esta tesis, sino que incluso lo enriquecería al detallar el papel que desempeña el ZF en los distintos estados de activación de Vav (Zugaza et al., 2002). En la proteína inactiva el dominio ZF está interaccionando con el CH. Tras producirse la activación ocurre un cambio conformacional y dicha interacción se rompe, dejando al ZF libre para unirse al dominio DH, estabilizándolo y permitiendo que tenga lugar la unión de la GTPasa y su catálisis (Chrencik et al., 2008) (**Fig. 4.3**).



**Fig. 4.3- Papel del dominio ZF.** Tras la activación se producen cambios conformacionales que tienen como consecuencia el distanciamiento de los dominios CH y ácido del DH, y la ruptura de la interacción que mantenía el CH con el ZF. El ZF se une ahora al dominio DH que se encuentra en la orientación correcta para reconocer a la GTPasa y llevar a cabo el intercambio de nucleótidos. La región que ocupa el DH está coloreada en naranja, la del PH en amarillo y la del ZF en rojo.

### 4.3 La conformación auto-inhibida de Syk es distinta a la de las quinasas de la familia Src y similar a la de Zap-70

La estructura de GST-Syk descrita en esta tesis muestra que esta tirosín quinasa tiene dos zonas bien diferenciadas: una que contiene una gran cantidad de masa y otra región bilobulada. Gracias al encaje de las estructuras resueltas de los dominios de Syk, fue posible determinar que la región masiva contiene el dominio quinasa y la proteína de fusión GST, y que los dominios reguladores SH2 se localizan en la región bilobulada (**Fig. 3B** del capítulo 2 de Resultados). Durante la redacción del capítulo 2 de Resultados, apareció publicada la estructura de Zap-70 determinada mediante cristalografía (Deindl et al., 2007). Se realizó el encaje de dicha estructura en el mapa de ME de Syk y se incluyó en el trabajo (**Fig. 3A** del capítulo 2 de Resultados). En ambos casos el encaje de los dominios SH2 es muy similar, con el interdominio A apuntando al dominio quinasa y los sitios de reconocimiento de las tirosinas fosforiladas expuestos al medio. Esta disposición de los dominios reguladores contrasta con la que encontramos en la familia de tirosín quinasas Src (ver Introducción), en las que los sitios de unión de sus dominios reguladores se encuentran orientados hacia el dominio quinasa, participando en interacciones intramoleculares que inhiben la proteína. (**Fig. 1.13**) (Xu et al., 1997; Boggon y Eck, 2004). El que los sitios de unión de las tirosinas fosforiladas de Syk sean accesibles, permite que la proteína reconozca los motivos ITAM tras la estimulación de los receptores celulares, localizándola donde es necesario que se produzca su activación.

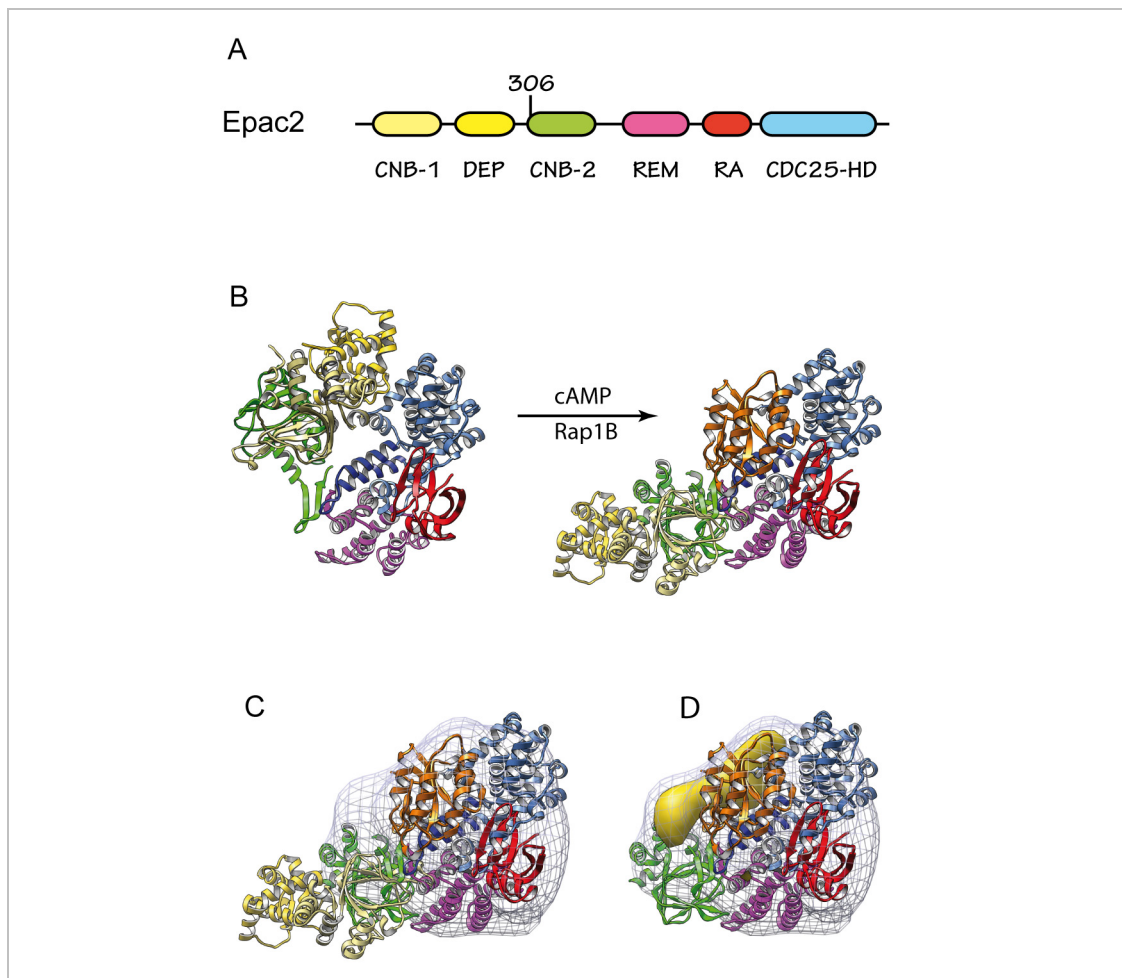
A pesar de que la conformación global de Zap-70 y de Syk es muy parecida, lo que sugiere que compartan los mismos mecanismos de regulación, encontramos algunas diferencias entre las dos proteínas. Los dominios resueltos de Syk (**Fig. 3B** del capítulo 2 de Resultados) encajan mejor en la estructura de ME que la estructura completa de la proteína homóloga Zap-70 (**Fig. 3A** del capítulo 2 de Resultados). La principal diferencia la encontramos en que los dominios aislados de Syk sufren un giro con respecto a la posición de los mismos dominios de Zap-70, que separa levemente a los dominios reguladores del quinasa. Aunque no podemos descartar que esta diferencia no sea significativa, debido a la baja resolución del mapa de ME (24 Å) y a que se ha empleado la técnica de tinción negativa (la reconstrucción es el molde de la proteína en la tinción), la relajación de los contactos entre el dominio quinasa y los SH2 podría ser consecuencia de la mayor longitud del interdominio B de Syk (23 aminoácidos), que separa ambos dominios. Si esta ligera apertura es real, podría ser la causa de la principal diferencia que existe entre Zap-70 y Syk, la dependencia que tiene cada una de la familia de quinasas Src. Syk posee la capacidad de autofosforilarse, mientras que Zap-70 requiere la participación de alguna quinasa perteneciente a la familia Src para ser activada (Chan et

al., 1995; Furlong et al., 1997). Es más, la mera unión de Syk a los motivos ITAM fosforilados o a la cola citoplasmática de las integrinas es capaz de activarla o de aumentar su actividad (Neumeister et al., 1995; Rowley et al., 1995; Shiue et al., 1995; Woodside et al., 2001). Incluso se ha descrito que Syk, pero no Zap-70, es capaz de fosforilar los motivos ITAM en ausencia de quinasas de la familia Src (Latour et al., 1997; Zoller et al., 1997). Por lo tanto, cabe considerar que la inhibición que ejerce la región reguladora sobre el dominio catalítico de Syk sea más laxa que la de Zap-70, permitiéndole transitar de una manera más fácil entre el estado activo y auto-inhibido del equilibrio de activación. Esta relajación en su regulación sería la responsable de la actividad basal de Syk y de su mayor independencia de la familia de quinasas Src.

#### **4.4 El cAMP induce la activación de Epac2 mediante el desplazamiento de su región reguladora**

En el año 2003, Holger Rehmann y colaboradores propusieron un mecanismo de activación general para todos los dominios de unión a nucleótido cíclico, que ha sido descrito en la introducción (Rehmann et al., 2003a). Consiste en que la unión del cAMP provoca un cambio conformacional en el PBC que desplaza a un residuo de leucina determinado. Este movimiento deja libre un espacio que es ocupado por una fenilalanina que se encuentra situada en la región bisagra, reposicionando la región de la tapa que ahora interacciona con la base nitrogenada del cAMP, estabilizando esta conformación (**Fig. 1.20**). Este modelo de activación fue confirmado experimentalmente cuando se publicaron las estructuras, resueltas en ausencia de ligando, del canal iónico de potasio regulado por nucleótido cíclico (Clayton et al., 2004), y de los dominios reguladores de PKA (Kim et al., 2005). En el tercer capítulo de la sección de Resultados se ha demostrado que Epac2 también comparte este mecanismo de activación (**Fig. 2A y Fig. sup. 6** del capítulo 3 de Resultados). La unión del cAMP desplaza el equilibrio conformacional de Epac2 hacia la forma activa (**Fig. 1B** del capítulo 3 de Resultados). El cAMP no sólo suelta el resorte que desencadena el cambio conformacional (Leu-Phe), sino que también participa en el mantenimiento de la estructura en el estado activo. Se pueden resumir en tres los elementos que participan en la estabilización de la estructura activa: la interacción del cAMP con la tapa, las interacciones que se forman entre la tapa y el dominio de unión a nucleótido cíclico, y la interacción de dicho dominio con el REM.

Nuestros colaboradores sólo obtuvieron cristales de Epac2 en su estado activo (unido a cAMP y Rap1B) con el mutante Epac2 $\Delta$ 305 (**Fig. 4.4**). A este mutante le falta el primer dominio de unión a cAMP (CNB-1) y el dominio DEP, de manera que los datos de cristalografía no aportan información acerca de lo que ocurre con estos dominios durante la activación. En la **Fig. 1B** del capítulo 3 de Resultados se muestran la estructuras de Epac2 en su estado inactivo y activo con el fin de ilustrar



**Fig. 4.4- Cambios conformacionales en la región reguladora de Epac2.** (A) Estructura primaria de Epac2. Se indica el punto en el que comienza el mutante Epac2 $\Delta$ 305 empleado en la determinación estructural del complejo mediante cristalografía. (B) Modelo de activación considerando a los dominios reguladores como un bloque rígido. A la izquierda se muestra la estructura de Epac2 completa (PDB ID. 2BYV) (Rehmann et al., 2006). A la derecha se muestra la estructura del complejo Epac2 $\Delta$ 305·cAMP·Rap1B (Rehmann et al., 2008) al que se le han modelado los dominios CNB-1 y DEP, como si los dominios reguladores se hubieran movido como un bloque rígido. (C) Superposición del mapa del complejo Epac2·cAMP·Rap1B, resuelto mediante ME (malla azul), al modelo descrito en B (panel derecho). Se puede observar que las dos estructuras no correlacionan bien. (D) Mapa de diferencia (masa amarilla) entre el mapa reconstruido mediante ME y la estructura determinada por cristalografía.

el cambio conformacional que sufre el dominio CNB-2. Para hacer que las estructuras sean comparables, se han ocultado los dominios CNB-1 y DEP de la estructura inactiva, de los que sí existe información (recordemos que se logró cristalizar la proteína completa en su estado inactivo (Rehmann et al., 2006)). ¿Qué ocurriría con estos dos dominios N-terminales de Epac2 si durante la activación se comportasen como cuerpos rígidos? Esto es lo que se pretende ilustrar en la **Fig. 4.4B**. En esta figura sí que se muestran todos los dominios en la estructura de Epac2 inactiva (izquierda). La parte derecha es un modelo en el que se han colocado los dominios CNB-1 y DEP en la posición que ocuparían si

toda la región reguladora se moviera de manera rígida. Podemos observar que la estructura activa completa tendría una forma alargada, con el dominio DEP a continuación del CNB-2, y el CNB-1 delante de éste. Sin embargo, cuando superponemos el mapa resuelto mediante ME del complejo, en el que Epac2 sí tiene todos los dominios, es evidente que el modelo de activación en el que los dominios reguladores se mueven como un cuerpo rígido no encaja correctamente (**Fig. 4.4C**). En lo único en que difieren, bioquímicamente hablando, las estructuras resueltas mediante ME y cristalografía es en la ausencia de estos dos dominios N-terminales en la estructura cristalográfica, por lo que si se generara un mapa de diferencia entre las dos estructuras deberían aparecer. Efectivamente, cuando se resta la estructura de Epac2 $\Delta$ 305·cAMP·Rap1B, resuelta por cristalografía y difracción de rayos X, a la del complejo Epac2·cAMP·Rap1B, resuelta mediante ME, se obtiene una masa bilobulada cercana al dominio CNB-2 que podría dar cuenta de los dominios ausentes (**Fig. 4.4D**). Debido a la baja resolución obtenida en la reconstrucción de microscopía (23 Å), sería muy arriesgado asignar un dominio a cada parte de la masa. No obstante, si tenemos en cuenta la longitud y la continuidad de la cadena polipeptídica, parece más probable que la masa cercana al CNB-2 corresponda al dominio DEP, y la masa distal al CNB-1.

En resumen, el mapa de microscopía es más compacto que el modelo de la forma activa en el que los dominios reguladores se comportan como un cuerpo rígido, lo que indica que en la estructura de Epac2 activa, los dominios reguladores no ocupan las mismas posiciones que en la forma inactiva. Esto no es sorprendente ya que al menos el dominio CNB-1 no puede ocupar la misma posición que en el estado inactivo porque ocluiría el sitio de unión del cAMP (**Fig. 1.19**) (Rehmann et al., 2003a). Ya se ha comentado en la Introducción que los sitios de unión a cAMP de los dominios CNB-1 y CNB-2 se encuentran enfrentados y que no permiten la unión del nucleótido cíclico. No obstante, a causa de una pequeña diferencia en la secuencia del CNB-1 con la consenso, la leucina implicada en el mecanismo de regulación de este dominio no se encuentra en la posición esperada, por lo que la fenilalanina puede moverse libremente. Por consiguiente, el movimiento estocástico del CNB-1 permitiría la unión del cAMP al sitio de unión del CNB-2. Esta unión apartaría a la leucina del PBC del CNB-2 de su posición inhibitoria, permitiendo que la fenilalanina de la región bisagra ocupe su lugar. Como consecuencia de este cambio conformacional los dominios reguladores se retirarían de la posición que ocupan en la estructura inactiva, permitiendo finalmente la unión del sustrato y su catálisis.

## 4.5 Epílogo

En el transcurso de esta tesis se ha estudiado la estructura y regulación de tres proteínas relacionadas con las rutas de señalización que controla la superfamilia Ras. Las estructuras resueltas muestran que la activación o inhibición de estas proteínas tienen un mecanismo

común basado en grandes cambios conformacionales, cuya regulación requiere el contexto de la proteína completa. Entre los mecanismos de regulación encontramos: (1) interacciones proteína-proteína o proteína lípido (como ocurre en el caso de Sos (Aronheim et al., 1994; Waters et al., 1995)), (2) unión de segundos mensajeros (proteínas Epac (de Rooij et al., 1998) o RasGRP (Ebinu et al., 1998)) y (3) modificaciones post-traduccionales (véanse las fosforilaciones necesarias para la activación de Syk y Vav descritas previamente). Estos factores desencadenan la activación de la proteína al menos de una de las siguientes maneras: (1) translocación de la proteína a un sitio subcelular específico (por ejemplo Vav se une a través de su dominio DH a Rap1, localizándose en zonas de adhesión celular (Arthur et al., 2004)), (2) liberación de la auto-inhibición producida por un dominio o región adyacente (los casos estudiados en esta tesis de Vav3 y Epac2), o (3) la producción de cambios alostéricos en el dominio catalítico (descritos en Sos (Margarit et al., 2003; Sondermann et al., 2004), la quinasa Src (Cowan-Jacob et al., 2005), y que posiblemente ocurran también en Zap-70 y Syk (Deindl et al., 2007)). La microscopía electrónica y el procesamiento digital de imágenes, combinada con el encaje de estructuras resueltas a alta resolución y ensayos bioquímicos, puede ser una herramienta útil para el estudio de la estructura y regulación de proteínas modulares que son, en gran medida, responsables de entretejer la intrincada red que es la señalización intracelular.



# Conclusiones

## 5. Conclusiones

- El dominio CH de Vav3 es clave en el mantenimiento del estado inactivo, contribuyendo junto con la región ácida al bloqueo del centro catalítico. El dominio CH se une al ZF, aunque esta interacción no es esencial para el mantenimiento de la inhibición.
- Tras la fosforilación de la proteína Vav3 mediada por las quinasas de la familia Syk o Src se producen grandes cambios conformacionales que rompen la conformación auto-inhibitoria.
- La actividad intercambiadora de nucleótidos del mutante de Vav3 con una delección en la región amino-terminal es la misma que la de la proteína nativa fosforilada, pero sin embargo, su capacidad transformante es mucho mayor. Este hecho correlaciona con que las dos proteínas tengan conformaciones distintas.
- La estructura de la tirosín quinasa Syk revela una conformación similar a la de Zap-70.
- Los sitios de unión de Syk a tirosinas fosforiladas se encuentran expuestos al exterior, permitiendo el reconocimiento de fosfoproteínas. Esto contrasta con la disposición de los dominios de otras tirosín quinasas como las de la familia Src.
- El dominio regulador CNB-2 de Epac2 sufre un cambio conformacional inducido por la unión del cAMP que posibilita la unión del sustrato. El cAMP participa también en el mantenimiento de la estructura activa.
- El mecanismo molecular de regulación de la activación de Epac2 por cAMP, es similar al descrito para algunos canales iónicos y las subunidades reguladoras de PKA.
- Los dominios reguladores de Epac2 no se comportan como un cuerpo rígido sino que su estructura cambia entre el estado activo e inactivo para permitir la entrada del segundo mensajero necesario para la activación.



# Bibliografía

## 6. Bibliografía

- Abtahian, F., Guerriero, A., Sebzda, E., Lu, M.M., Zhou, R., Mocsai, A., Myers, E.E., Huang, B., Jackson, D.G., Ferrari, V.A., *et al.* (2003). Regulation of blood and lymphatic vascular separation by signaling proteins SLP-76 and Syk. *Science (New York, NY)* 299, 247-251.
- Adachi, T., Wienands, J., Tsubata, T., y Kurosaki, T. (2007). Interdomain A is crucial for ITAM-dependent and -independent regulation of Syk. *Biochemical and biophysical research communications* 364, 111-117.
- Aghazadeh, B., Zhu, K., Kubiseski, T.J., Liu, G.A., Pawson, T., Zheng, Y., y Rosen, M.K. (1998). Structure and mutagenesis of the Dbl homology domain. *Nature structural biology* 5, 1098-1107.
- Aghazadeh, B., Lowry, W.E., Huang, X.Y., y Rosen, M.K. (2000). Structural basis for relief of autoinhibition of the Dbl homology domain of proto-oncogene Vav by tyrosine phosphorylation. *Cell* 102, 625-633.
- Aronheim, A., Engelberg, D., Li, N., al-Alawi, N., Schlessinger, J., y Karin, M. (1994). Membrane targeting of the nucleotide exchange factor Sos is sufficient for activating the Ras signaling pathway. *Cell* 78, 949-961.
- Arthur, W.T., Quilliam, L.A., y Cooper, J.A. (2004). Rap1 promotes cell spreading by localizing Rac guanine nucleotide exchange factors. *The Journal of cell biology* 167, 111-122.
- Atwell, S., Adams, J.M., Badger, J., Buchanan, M.D., Feil, I.K., Froning, K.J., Gao, X., Hendle, J., Keegan, K., Leon, B.C., *et al.* (2004). A novel mode of Gleevec binding is revealed by the structure of spleen tyrosine kinase. *The Journal of biological chemistry* 279, 55827-55832.
- Bajpai, M., Chopra, P., Dastidar, S.G., y Ray, A. (2008). Spleen tyrosine kinase: a novel target for therapeutic intervention of rheumatoid arthritis. *Expert opinion on investigational drugs* 17, 641-659.
- Bar-Sagi, D., y Hall, A. (2000). Ras and Rho GTPases: a family reunion. *Cell* 103, 227-238.
- Berthet, J., Sutherland, E.W., y Rall, T.W. (1957). The assay of glucagon and epinephrine with use of liver homogenates. *The Journal of biological chemistry* 229, 351-361.
- Bishop, A.L., y Hall, A. (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *The Biochemical journal* 348 Pt 2, 241-255.
- Boggon, T.J., y Eck, M.J. (2004). Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene* 23, 7918-7927.
- Booden, M.A., Campbell, S.L., y Der, C.J. (2002). Critical but distinct roles for the pleckstrin homology and cysteine-rich domains as positive

modulators of Vav2 signaling and transformation. *Molecular and cellular biology* 22, 2487-2497.

- Boriack-Sjodin, P.A., Margarit, S.M., Bar-Sagi, D., y Kuriyan, J. (1998). The structural basis of the activation of Ras by Sos. *Nature* 394, 337-343.
- Bos, J.L. (2003). Epac: a new cAMP target and new avenues in cAMP research. *Nature reviews* 4, 733-738.
- Bos, J.L. (2005). Linking Rap to cell adhesion. *Current opinion in cell biology* 17, 123-128.
- Bos, J.L., Rehmann, H., y Wittinghofer, A. (2007). GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* 129, 865-877.
- Boskovic, J., Coloma, J., Aparicio, T., Zhou, M., Robinson, C.V., Mendez, J., y Montoya, G. (2007). Molecular architecture of the human GINS complex. *EMBO reports* 8, 678-684.
- Bourne, H.R., Sanders, D.A., y McCormick, F. (1990). The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* 348, 125-132.
- Braselmann, S., Taylor, V., Zhao, H., Wang, S., Sylvain, C., Baluom, M., Qu, K., Herlaar, E., Lau, A., Young, C., *et al.* (2006). R406, an orally available spleen tyrosine kinase inhibitor blocks fc receptor signaling and reduces immune complex-mediated inflammation. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 319, 998-1008.
- Burgess, S.A., Walker, M.L., Thirumurugan, K., Trinick, J., y Knight, P.J. (2004). Use of negative stain and single-particle image processing to explore dynamic properties of flexible macromolecules. *Journal of structural biology* 147, 247-258.
- Bustelo, X.R., Suen, K.L., Michael, W.M., Dreyfuss, G., y Barbacid, M. (1995). Association of the vav proto-oncogene product with poly(rC)-specific RNA-binding proteins. *Molecular and cellular biology* 15, 1324-1332.
- Bustelo, X.R. (2000). Regulatory and signaling properties of the Vav family. *Molecular and cellular biology* 20, 1461-1477.
- Caloca, M.J., Zugaza, J.L., Matallanas, D., Crespo, P., y Bustelo, X.R. (2003). Vav mediates Ras stimulation by direct activation of the GDP/GTP exchange factor Ras GRP1. *The EMBO journal* 22, 3326-3336.
- Caloca, M.J., Zugaza, J.L., Vicente-Manzanares, M., Sanchez-Madrid, F., y Bustelo, X.R. (2004). F-actin-dependent translocation of the Rap1 GDP/GTP exchange factor RasGRP2. *The Journal of biological chemistry* 279, 20435-20446.

- Casey, P.J., Solski, P.A., Der, C.J., y Buss, J.E. (1989). p21ras is modified by a farnesyl isoprenoid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 8323-8327.
- Clark, E.A., King, W.G., Brugge, J.S., Symons, M., y Hynes, R.O. (1998). Integrin-mediated signals regulated by members of the rho family of GTPases. *The Journal of cell biology* 142, 573-586.
- Clayton, G.M., Silverman, W.R., Heginbotham, L., y Morais-Cabral, J.H. (2004). Structural basis of ligand activation in a cyclic nucleotide regulated potassium channel. *Cell* 119, 615-627.
- Colon-Gonzalez, F., y Kazanietz, M.G. (2006). C1 domains exposed: from diacylglycerol binding to protein-protein interactions. *Biochimica et biophysica acta* 1761, 827-837.
- Coopman, P.J., Do, M.T., Barth, M., Bowden, E.T., Hayes, A.J., Basyuk, E., Blancato, J.K., Vezza, P.R., McLeskey, S.W., Mangeat, P.H., *et al.* (2000). The Syk tyrosine kinase suppresses malignant growth of human breast cancer cells. *Nature* 406, 742-747.
- Cowan-Jacob, S.W., Fendrich, G., Manley, P.W., Jahnke, W., Fabbro, D., Liebetanz, J., y Meyer, T. (2005). The crystal structure of a c-Src complex in an active conformation suggests possible steps in c-Src activation. *Structure* 13, 861-871.
- Crespo, P., Schuebel, K.E., Ostrom, A.A., Gutkind, J.S., y Bustelo, X.R. (1997). Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the vav proto-oncogene product. *Nature* 385, 169-172.
- Crowther, R.A., Amos, L.A., Finch, J.T., De Rosier, D.J., y Klug, A. (1970). Three dimensional reconstructions of spherical viruses by fourier synthesis from electron micrographs. *Nature* 226, 421-425.
- Chacon, P., y Wriggers, W. (2002). Multi-resolution contour-based fitting of macromolecular structures. *Journal of molecular biology* 317, 375-384.
- Chan, A.C., Dalton, M., Johnson, R., Kong, G.H., Wang, T., Thoma, R., y Kurosaki, T. (1995). Activation of ZAP-70 kinase activity by phosphorylation of tyrosine 493 is required for lymphocyte antigen receptor function. *The EMBO journal* 14, 2499-2508.
- Chaudhary, A., King, W.G., Mattaliano, M.D., Frost, J.A., Diaz, B., Morrison, D.K., Cobb, M.H., Marshall, M.S., y Brugge, J.S. (2000). Phosphatidylinositol 3-kinase regulates Raf1 through Pak phosphorylation of serine 338. *Curr Biol* 10, 551-554.
- Chen, D.H., Song, J.L., Chuang, D.T., Chiu, W., y Ludtke, S.J. (2006). An expanded conformation of single-ring GroEL-GroES complex encapsulates an 86 kDa substrate. *Structure* 14, 1711-1722.

- Cheng, A.M., Rowley, B., Pao, W., Hayday, A., Bolen, J.B., y Pawson, T. (1995). Syk tyrosine kinase required for mouse viability and B-cell development. *Nature* 378, 303-306.
- Cherfils, J., Menetrey, J., Mathieu, M., Le Bras, G., Robineau, S., Beraud-Dufour, S., Antony, B., y Chardin, P. (1998). Structure of the Sec7 domain of the Arf exchange factor ARNO. *Nature* 392, 101-105.
- Cherfils, J., y Chardin, P. (1999). GEFs: structural basis for their activation of small GTP-binding proteins. *Trends in biochemical sciences* 24, 306-311.
- Chhatriwala, M.K., Betts, L., Worthylake, D.K., y Sondek, J. (2007). The DH and PH domains of Trio coordinately engage Rho GTPases for their efficient activation. *Journal of molecular biology* 368, 1307-1320.
- Chrencik, J.E., Brooun, A., Zhang, H., Mathews, II, Hura, G.L., Foster, S.A., Perry, J.J., Streiff, M., Ramage, P., Widmer, H., *et al.* (2008). Structural basis of guanine nucleotide exchange mediated by the T-cell essential Vav1. *Journal of molecular biology* 380, 828-843.
- Chu, D.H., Morita, C.T., y Weiss, A. (1998). The Syk family of protein tyrosine kinases in T-cell activation and development. *Immunological reviews* 165, 167-180.
- Das, B., Shu, X., Day, G.J., Han, J., Krishna, U.M., Falck, J.R., y Broek, D. (2000). Control of intramolecular interactions between the pleckstrin homology and Dbl homology domains of Vav and Sos1 regulates Rac binding. *The Journal of biological chemistry* 275, 15074-15081.
- de Rooij, J., Zwartkruis, F.J., Verheijen, M.H., Cool, R.H., Nijman, S.M., Wittinghofer, A., y Bos, J.L. (1998). Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* 396, 474-477.
- de Rooij, J., Rehmann, H., van Triest, M., Cool, R.H., Wittinghofer, A., y Bos, J.L. (2000). Mechanism of regulation of the Epac family of cAMP-dependent RapGEFs. *The Journal of biological chemistry* 275, 20829-20836.
- Deckert, M., Tartare-Deckert, S., Couture, C., Mustelin, T., y Altman, A. (1996). Functional and physical interactions of Syk family kinases with the Vav proto-oncogene product. *Immunity* 5, 591-604.
- Deindl, S., Kadlecsek, T.A., Brdicka, T., Cao, X., Weiss, A., y Kuriyan, J. (2007). Structural basis for the inhibition of tyrosine kinase activity of ZAP-70. *Cell* 129, 735-746.
- DerMardirossian, C., y Bokoch, G.M. (2005). GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends in cell biology* 15, 356-363.
- Diller, T.C., Madhusudan, Xuong, N.H., y Taylor, S.S. (2001). Molecular basis for regulatory subunit diversity in cAMP-dependent protein kinase:

- crystal structure of the type II beta regulatory subunit. *Structure* 9, 73-82.
- Dong, Z., Liu, Y., Lu, S., Wang, A., Lee, K., Wang, L.H., Revelo, M., y Lu, S. (2006). Vav3 oncogene is overexpressed and regulates cell growth and androgen receptor activity in human prostate cancer. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md 20, 2315-2325.
  - Dubochet, J., Adrian, M., Chang, J.J., Homo, J.C., Lepault, J., McDowell, A.W., y Schultz, P. (1988). Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Quarterly reviews of biophysics* 21, 129-228.
  - Ebinu, J.O., Bottorff, D.A., Chan, E.Y., Stang, S.L., Dunn, R.J., y Stone, J.C. (1998). RasGRP, a Ras guanyl nucleotide- releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs. *Science* (New York, NY 280, 1082-1086.
  - Enserink, J.M., Christensen, A.E., de Rooij, J., van Triest, M., Schwede, F., Genieser, H.G., Doskeland, S.O., Blank, J.L., y Bos, J.L. (2002). A novel Epac-specific cAMP analogue demonstrates independent regulation of Rap1 and ERK. *Nature cell biology* 4, 901-906.
  - Etienne-Manneville, S., y Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629-635.
  - Faccio, R., Teitelbaum, S.L., Fujikawa, K., Chappel, J., Zallone, A., Tybulewicz, V.L., Ross, F.P., y Swat, W. (2005). Vav3 regulates osteoclast function and bone mass. *Nature medicine* 11, 284-290.
  - Fan, W.T., Koch, C.A., de Hoog, C.L., Fam, N.P., y Moran, M.F. (1998). The exchange factor Ras-GRF2 activates Ras-dependent and Rac-dependent mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Biol* 8, 935-938.
  - Fernandez-Zapico, M.E., Gonzalez-Paz, N.C., Weiss, E., Savoy, D.N., Molina, J.R., Fonseca, R., Smyrk, T.C., Chari, S.T., Urrutia, R., y Billadeau, D.D. (2005). Ectopic expression of VAV1 reveals an unexpected role in pancreatic cancer tumorigenesis. *Cancer cell* 7, 39-49.
  - Folmer, R.H., Geschwindner, S., y Xue, Y. (2002). Crystal structure and NMR studies of the apo SH2 domains of ZAP-70: two bikes rather than a tandem. *Biochemistry* 41, 14176-14184.
  - Frank, J., Shimkin, B., y Dowse, H. (1981). SPIDER—a modular software system for electron image processing. *Ultramicroscopy* 6, 343-358.
  - Frank, J. (2002). Single-particle imaging of macromolecules by cryo-electron microscopy. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 31, 303-319.
  - Frank, J. (2006). *Three-dimensional electron microscopy of macromolecular assemblies* (New York, Oxford University Press).

- Franklin, M.C., Wang, J., y Steitz, T.A. (2001). Structure of the replicating complex of a pol alpha family DNA polymerase. *Cell* 105, 657-667.
- Frost, J.A., Xu, S., Hutchison, M.R., Marcus, S., y Cobb, M.H. (1996). Actions of Rho family small G proteins and p21-activated protein kinases on mitogen-activated protein kinase family members. *Molecular and cellular biology* 16, 3707-3713.
- Fujikawa, K., Inoue, Y., Sakai, M., Koyama, Y., Nishi, S., Funada, R., Alt, F.W., y Swat, W. (2002). Vav3 is regulated during the cell cycle and effects cell division. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 4313-4318.
- Furlong, M.T., Mahrenholz, A.M., Kim, K.H., Ashendel, C.L., Harrison, M.L., y Geahlen, R.L. (1997). Identification of the major sites of autophosphorylation of the murine protein-tyrosine kinase Syk. *Biochimica et biophysica acta* 1355, 177-190.
- Futterer, K., Wong, J., Gruzca, R.A., Chan, A.C., y Waksman, G. (1998). Structural basis for Syk tyrosine kinase ubiquity in signal transduction pathways revealed by the crystal structure of its regulatory SH2 domains bound to a dually phosphorylated ITAM peptide. *Journal of molecular biology* 281, 523-537.
- Gakidis, M.A., Cullere, X., Olson, T., Wilsbacher, J.L., Zhang, B., Moores, S.L., Ley, K., Swat, W., Mayadas, T., y Brugge, J.S. (2004). Vav GEFs are required for beta2 integrin-dependent functions of neutrophils. *The Journal of cell biology* 166, 273-282.
- Garzon, J.I., Kovacs, J., Abagyan, R., y Chacon, P. (2007). ADP\_EM: fast exhaustive multi-resolution docking for high-throughput coverage. *Bioinformatics (Oxford, England)* 23, 427-433.
- Goldberg, J. (1998). Structural basis for activation of ARF GTPase: mechanisms of guanine nucleotide exchange and GTP-myristoyl switching. *Cell* 95, 237-248.
- Goodman, P.A., Wood, C.M., Vassilev, A., Mao, C., y Uckun, F.M. (2001). Spleen tyrosine kinase (Syk) deficiency in childhood pro-B cell acute lymphoblastic leukemia. *Oncogene* 20, 3969-3978.
- Groesch, T.D., Zhou, F., Mattila, S., Geahlen, R.L., y Post, C.B. (2006). Structural basis for the requirement of two phosphotyrosine residues in signaling mediated by Syk tyrosine kinase. *Journal of molecular biology* 356, 1222-1236.
- Han, J., Das, B., Wei, W., Van Aelst, L., Mosteller, R.D., Khosravi-Far, R., Westwick, J.K., Der, C.J., y Broek, D. (1997). Lck regulates Vav activation of members of the Rho family of GTPases. *Molecular and cellular biology* 17, 1346-1353.
- Han, J., Luby-Phelps, K., Das, B., Shu, X., Xia, Y., Mosteller, R.D., Krishna, U.M., Falck, J.R., White, M.A., y Broek, D. (1998). Role of substrates and

products of PI 3-kinase in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav. *Science* (New York, NY) **279**, 558-560.

- Hanks, S.K. (2003). Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective. *Genome biology* **4**, 111.
- Heo, J., Thapar, R., y Campbell, S.L. (2005). Recognition and activation of Rho GTPases by Vav1 and Vav2 guanine nucleotide exchange factors. *Biochemistry* **44**, 6573-6585.
- Heymann, J.B. (2001). Bsoft: image and molecular processing in electron microscopy. *Journal of structural biology* **133**, 156-169.
- Hirabayashi, A., Mukaiyama, H., Kobayashi, H., Shiohara, H., Nakayama, S., Ozawa, M., Miyazawa, K., Misawa, K., Ohnota, H., y Isaji, M. (2008). A novel Syk family kinase inhibitor: Design, synthesis, and structure-activity relationship of 1,2,4-triazolo[4,3-c]pyrimidine and 1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidine derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry*.
- Hisamichi, H., Naito, R., Toyoshima, A., Kawano, N., Ichikawa, A., Orita, A., Orita, M., Hamada, N., Takeuchi, M., Ohta, M., *et al.* (2005). Synthetic studies on novel Syk inhibitors. Part 1: Synthesis and structure-activity relationships of pyrimidine-5-carboxamide derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry* **13**, 4936-4951.
- Hoeller, C., Thallinger, C., Pratscher, B., Bister, M.D., Schicher, N., Loewe, R., Heere-Ress, E., Roka, F., Sexl, V., y Pehamberger, H. (2005). The non-receptor-associated tyrosine kinase Syk is a regulator of metastatic behavior in human melanoma cells. *The Journal of investigative dermatology* **124**, 1293-1299.
- Hoffman, G.R., y Cerione, R.A. (2002). Signaling to the Rho GTPases: networking with the DH domain. *FEBS letters* **513**, 85-91.
- Holsinger, L.J., Graef, I.A., Swat, W., Chi, T., Bautista, D.M., Davidson, L., Lewis, R.S., Alt, F.W., y Crabtree, G.R. (1998). Defects in actin-cap formation in Vav-deficient mice implicate an actin requirement for lymphocyte signal transduction. *Curr Biol* **8**, 563-572.
- Huse, M., y Kuriyan, J. (2002). The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* **109**, 275-282.
- Inatome, R., Yanagi, S., Takano, T., y Yamamura, H. (2001). A critical role for Syk in endothelial cell proliferation and migration. *Biochemical and biophysical research communications* **286**, 195-199.
- Itzen, A., Pylypenko, O., Goody, R.S., Alexandrov, K., y Rak, A. (2006). Nucleotide exchange via local protein unfolding--structure of Rab8 in complex with MSS4. *The EMBO journal* **25**, 1445-1455.
- Jiang, W., y Ludtke, S.J. (2005). Electron cryomicroscopy of single particles at subnanometer resolution. *Current opinion in structural biology* **15**, 571-577.

- Journak, F. (1985). Structure of the GDP domain of EF-Tu and location of the amino acids homologous to ras oncogene proteins. *Science (New York, NY)* 230, 32-36.
- Kaneko, M., y Takahashi, T. (2004). Presynaptic mechanism underlying cAMP-dependent synaptic potentiation. *J Neurosci* 24, 5202-5208.
- Kang, G., Joseph, J.W., Chepurny, O.G., Monaco, M., Wheeler, M.B., Bos, J.L., Schwede, F., Genieser, H.G., y Holz, G.G. (2003). Epac-selective cAMP analog 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP as a stimulus for Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release and exocytosis in pancreatic beta-cells. *The Journal of biological chemistry* 278, 8279-8285.
- Kashima, Y., Miki, T., Shibasaki, T., Ozaki, N., Miyazaki, M., Yano, H., y Seino, S. (2001). Critical role of cAMP-GEFII--Rim2 complex in incretin-potentiated insulin secretion. *The Journal of biological chemistry* 276, 46046-46053.
- Kastner, B., Fischer, N., Golas, M.M., Sander, B., Dube, P., Boehringer, D., Hartmuth, K., Deckert, J., Hauer, F., Wolf, E., *et al.* (2008). GraFix: sample preparation for single-particle electron cryomicroscopy. *Nature methods* 5, 53-55.
- Katzav, S., Martin-Zanca, D., y Barbacid, M. (1989). vav, a novel human oncogene derived from a locus ubiquitously expressed in hematopoietic cells. *The EMBO journal* 8, 2283-2290.
- Kawasaki, H., Springett, G.M., Mochizuki, N., Toki, S., Nakaya, M., Matsuda, M., Housman, D.E., y Graybiel, A.M. (1998). A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science (New York, NY)* 282, 2275-2279.
- Kazanietz, M.G., Bustelo, X.R., Barbacid, M., Kolch, W., Mischak, H., Wong, G., Pettit, G.R., Bruns, J.D., y Blumberg, P.M. (1994). Zinc finger domains and phorbol ester pharmacophore. Analysis of binding to mutated form of protein kinase C zeta and the vav and c-raf proto-oncogene products. *The Journal of biological chemistry* 269, 11590-11594.
- Kelley, G.G., Reks, S.E., Ondrako, J.M., y Smrcka, A.V. (2001). Phospholipase C(epsilon): a novel Ras effector. *The EMBO journal* 20, 743-754.
- Kelley, G.G., Reks, S.E., y Smrcka, A.V. (2004). Hormonal regulation of phospholipase Cepsilon through distinct and overlapping pathways involving G12 and Ras family G-proteins. *The Biochemical journal* 378, 129-139.
- Kim, C., Xuong, N.H., y Taylor, S.S. (2005). Crystal structure of a complex between the catalytic and regulatory (R1alpha) subunits of PKA. *Science (New York, NY)* 307, 690-696.

- King, A.J., Sun, H., Diaz, B., Barnard, D., Miao, W., Bagrodia, S., y Marshall, M.S. (1998). The protein kinase Pak3 positively regulates Raf-1 activity through phosphorylation of serine 338. *Nature* 396, 180-183.
- Kitayama, H., Sugimoto, Y., Matsuzaki, T., Ikawa, Y., y Noda, M. (1989). A ras-related gene with transformation suppressor activity. *Cell* 56, 77-84.
- Kooistra, M.R., Dube, N., y Bos, J.L. (2007). Rap1: a key regulator in cell-cell junction formation. *Journal of cell science* 120, 17-22.
- la Cour, T.F., Nyborg, J., Thirup, S., y Clark, B.F. (1985). Structural details of the binding of guanosine diphosphate to elongation factor Tu from *E. coli* as studied by X-ray crystallography. *The EMBO journal* 4, 2385-2388.
- Latour, S., Fournel, M., y Veillette, A. (1997). Regulation of T-cell antigen receptor signalling by Syk tyrosine protein kinase. *Molecular and cellular biology* 17, 4434-4441.
- Latour, S., Zhang, J., Siraganian, R.P., y Veillette, A. (1998). A unique insert in the linker domain of Syk is necessary for its function in immunoreceptor signalling. *The EMBO journal* 17, 2584-2595.
- Lee, J.H., Kim, J.W., Ko, N.Y., Mun, S.H., Her, E., Kim, B.K., Han, J.W., Lee, H.Y., Beaven, M.A., Kim, Y.M., *et al.* (2008a). Curcumin, a constituent of curry, suppresses IgE-mediated allergic response and mast cell activation at the level of Syk. *The Journal of allergy and clinical immunology* 121, 1225-1231.
- Lee, K., Liu, Y., Mo, J.Q., Zhang, J., Dong, Z., y Lu, S. (2008b). Vav3 oncogene activates estrogen receptor and its overexpression may be involved in human breast cancer. *BMC cancer* 8, 158.
- Leschziner, A.E., y Nogales, E. (2006). The orthogonal tilt reconstruction method: an approach to generating single-class volumes with no missing cone for ab initio reconstruction of asymmetric particles. *Journal of structural biology* 153, 284-299.
- Li, Y., Asuri, S., Rebhun, J.F., Castro, A.F., Parnavitana, N.C., y Quilliam, L.A. (2006). The RAP1 guanine nucleotide exchange factor Epac2 couples cyclic AMP and Ras signals at the plasma membrane. *The Journal of biological chemistry* 281, 2506-2514.
- Lietha, D., Cai, X., Ceccarelli, D.F., Li, Y., Schaller, M.D., y Eck, M.J. (2007). Structural basis for the autoinhibition of focal adhesion kinase. *Cell* 129, 1177-1187.
- Lipkin, D., Cook, W.H., y Markham, R. (1959). Adenosine-3':5'-phosphoric acid: a proof of structure. *J Am Chem Soc* 81, 6198-6203.
- Liu, X., Wang, H., Eberstadt, M., Schnuchel, A., Olejniczak, E.T., Meadows, R.P., Schkeryantz, J.M., Janowick, D.A., Harlan, J.E., Harris,

- E.A., *et al.* (1998). NMR structure and mutagenesis of the N-terminal Dbp1 homology domain of the nucleotide exchange factor Trio. *Cell* 95, 269-277.
- Lopez-Lago, M., Lee, H., Cruz, C., Movilla, N., y Bustelo, X.R. (2000). Tyrosine phosphorylation mediates both activation and downmodulation of the biological activity of Vav. *Molecular and cellular biology* 20, 1678-1691.
  - Lopez, I., Mak, E.C., Ding, J., Hamm, H.E., y Lomasney, J.W. (2001). A novel bifunctional phospholipase c that is regulated by G $\alpha$ 12 and stimulates the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway. *The Journal of biological chemistry* 276, 2758-2765.
  - Ludtke, S.J., Baldwin, P.R., y Chiu, W. (1999). EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions. *Journal of structural biology* 128, 82-97.
  - Lyons, L.S., y Burnstein, K.L. (2006). Vav3, a Rho GTPase guanine nucleotide exchange factor, increases during progression to androgen independence in prostate cancer cells and potentiates androgen receptor transcriptional activity. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md) 20, 1061-1072.
  - Llorca, O. (2005). Introduction to 3D reconstruction of macromolecules using single particle electron microscopy. *Acta pharmacologica Sinica* 26, 1153-1164.
  - Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T., y Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science* (New York, NY) 298, 1912-1934.
  - Marabini, R., Masegosa, I.M., San Martin, M.C., Marco, S., Fernandez, J.J., de la Fraga, L.G., Vaquerizo, C., y Carazo, J.M. (1996). Xmipp: An Image Processing Package for Electron Microscopy. *Journal of structural biology* 116, 237-240.
  - Margarit, S.M., Sondermann, H., Hall, B.E., Nagar, B., Hoelz, A., Pirruccello, M., Bar-Sagi, D., y Kuriyan, J. (2003). Structural evidence for feedback activation by Ras.GTP of the Ras-specific nucleotide exchange factor SOS. *Cell* 112, 685-695.
  - Martin-Benito, J., Boskovic, J., Gomez-Puertas, P., Carrascosa, J.L., Simons, C.T., Lewis, S.A., Bartolini, F., Cowan, N.J., y Valpuesta, J.M. (2002). Structure of eukaryotic prefoldin and of its complexes with unfolded actin and the cytosolic chaperonin CCT. *The EMBO journal* 21, 6377-6386.
  - Matsubara, S., Koya, T., Takeda, K., Joetham, A., Miyahara, N., Pine, P., Masuda, E.S., Swasey, C.H., y Gelfand, E.W. (2006). Syk activation in dendritic cells is essential for airway hyperresponsiveness and inflammation. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 34, 426-433.

- Mei, F.C., Qiao, J., Tsygankova, O.M., Meinkoth, J.L., Quilliam, L.A., y Cheng, X. (2002). Differential signaling of cyclic AMP: opposing effects of exchange protein directly activated by cyclic AMP and cAMP-dependent protein kinase on protein kinase B activation. *The Journal of biological chemistry* 277, 11497-11504.
- Memon, A.R. (2004). The role of ADP-ribosylation factor and SAR1 in vesicular trafficking in plants. *Biochimica et biophysica acta* 1664, 9-30.
- Milburn, M.V., Tong, L., deVos, A.M., Brunger, A., Yamaizumi, Z., Nishimura, S., y Kim, S.H. (1990). Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins. *Science (New York, NY)* 247, 939-945.
- Mindell, J.A., y Grigorieff, N. (2003). Accurate determination of local defocus and specimen tilt in electron microscopy. *Journal of structural biology* 142, 334-347.
- Miranti, C.K., Leng, L., Maschberger, P., Brugge, J.S., y Shattil, S.J. (1998). Identification of a novel integrin signaling pathway involving the kinase Syk and the guanine nucleotide exchange factor Vav1. *Curr Biol* 8, 1289-1299.
- Mitin, N., Rossman, K.L., y Der, C.J. (2005). Signaling interplay in Ras superfamily function. *Curr Biol* 15, R563-574.
- Mitra, K., y Frank, J. (2006). Ribosome dynamics: insights from atomic structure modeling into cryo-electron microscopy maps. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 35, 299-317.
- Movilla, N., y Bustelo, X.R. (1999). Biological and regulatory properties of Vav-3, a new member of the Vav family of oncoproteins. *Molecular and cellular biology* 19, 7870-7885.
- Murphy, G.A., Graham, S.M., Morita, S., Reks, S.E., Rogers-Graham, K., Vojtek, A., Kelley, G.G., y Der, C.J. (2002). Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase, but not RalGDS, in TC21/R-Ras2-mediated transformation. *The Journal of biological chemistry* 277, 9966-9975.
- Nagar, B., Hantschel, O., Young, M.A., Scheffzek, K., Veach, D., Bornmann, W., Clarkson, B., Superti-Furga, G., y Kuriyan, J. (2003). Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase. *Cell* 112, 859-871.
- Neumeister, E.N., Zhu, Y., Richard, S., Terhorst, C., Chan, A.C., y Shaw, A.S. (1995). Binding of ZAP-70 to phosphorylated T-cell receptor zeta and eta enhances its autophosphorylation and generates specific binding sites for SH2 domain-containing proteins. *Molecular and cellular biology* 15, 3171-3178.

- Nimnual, A.S., Yatsula, B.A., y Bar-Sagi, D. (1998). Coupling of Ras and Rac guanosine triphosphatases through the Ras exchanger Sos. *Science* (New York, NY 279, 560-563).
- Nobes, C.D., y Hall, A. (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81, 53-62.
- Ohi, M., Li, Y., Cheng, Y., y Walz, T. (2004). Negative Staining and Image Classification - Powerful Tools in Modern Electron Microscopy. *Biol Proced Online* 6, 23-34.
- Okorokov, A.L., Orlova, E.V., Kingsbury, S.R., Bagneris, C., Gohlke, U., Williams, G.H., y Stoeber, K. (2004). Molecular structure of human geminin. *Nature structural & molecular biology* 11, 1021-1022.
- Olofsson, B. (1999). Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cellular signalling* 11, 545-554.
- Ozaki, N., Shibasaki, T., Kashima, Y., Miki, T., Takahashi, K., Ueno, H., Sunaga, Y., Yano, H., Matsuura, Y., Iwanaga, T., *et al.* (2000). cAMP-GEFII is a direct target of cAMP in regulated exocytosis. *Nature cell biology* 2, 805-811.
- Pai, E.F., Krengel, U., Petsko, G.A., Goody, R.S., Kabsch, W., y Wittinghofer, A. (1990). Refined crystal structure of the triphosphate conformation of H-ras p21 at 1.35 Å resolution: implications for the mechanism of GTP hydrolysis. *The EMBO journal* 9, 2351-2359.
- Penczek, P.A., Yang, C., Frank, J., y Spahn, C.M. (2006). Estimation of variance in single-particle reconstruction using the bootstrap technique. *Journal of structural biology* 154, 168-183.
- Ponsioen, B., Zhao, J., Riedl, J., Zwartkruis, F., van der Krogt, G., Zaccolo, M., Moolenaar, W.H., Bos, J.L., y Jalink, K. (2004). Detecting cAMP-induced Epac activation by fluorescence resonance energy transfer: Epac as a novel cAMP indicator. *EMBO reports* 5, 1176-1180.
- Price, L.S., Leng, J., Schwartz, M.A., y Bokoch, G.M. (1998). Activation of Rac and Cdc42 by integrins mediates cell spreading. *Molecular biology of the cell* 9, 1863-1871.
- Radon, J. (1917). Ueber die Bestimmung von Funktionen durch ihre Integralwerte laengs gewisser Mannigfaltigkeiten. *Berichte ueber die Verhandlungen der Koeniglich Saechsischen Gesellschaft der Wissenschaften zu Leipzig. Math Phys Klasse* 69, 262-277.
- Rapley, J., Tybulewicz, V.L., y Rittinger, K. (2008). Crucial structural role for the PH and C1 domains of the Vav1 exchange factor. *EMBO reports* 9, 655-661.

- Rehmann, H., Prakash, B., Wolf, E., Rueppel, A., de Rooij, J., Bos, J.L., y Wittinghofer, A. (2003a). Structure and regulation of the cAMP-binding domains of Epac2. *Nature structural biology* *10*, 26-32.
- Rehmann, H., Schwede, F., Doskeland, S.O., Wittinghofer, A., y Bos, J.L. (2003b). Ligand-mediated activation of the cAMP-responsive guanine nucleotide exchange factor Epac. *The Journal of biological chemistry* *278*, 38548-38556.
- Rehmann, H., Das, J., Knipscheer, P., Wittinghofer, A., y Bos, J.L. (2006). Structure of the cyclic-AMP-responsive exchange factor Epac2 in its auto-inhibited state. *Nature* *439*, 625-628.
- Rehmann, H., Wittinghofer, A., y Bos, J.L. (2007). Capturing cyclic nucleotides in action: snapshots from crystallographic studies. *Nature reviews* *8*, 63-73.
- Rehmann, H., Arias-Palomo, E., Hadders, M.A., Schwede, F., Llorca, O., y Bos, J.L. (2008). Structure of Epac2 in complex with a cyclic AMP analogue and RAP1B. *Nature* *455*, 124-127.
- Renault, L., Nassar, N., Vetter, I., Becker, J., Klebe, C., Roth, M., y Wittinghofer, A. (1998). The 1.7 Å crystal structure of the regulator of chromosome condensation (RCC1) reveals a seven-bladed propeller. *Nature* *392*, 97-101.
- Renault, L., Kuhlmann, J., Henkel, A., y Wittinghofer, A. (2001). Structural basis for guanine nucleotide exchange on Ran by the regulator of chromosome condensation (RCC1). *Cell* *105*, 245-255.
- Repasky, G.A., Chenette, E.J., y Der, C.J. (2004). Renewing the conspiracy theory debate: does Raf function alone to mediate Ras oncogenesis? *Trends in cell biology* *14*, 639-647.
- Ridley, A.J., Paterson, H.F., Johnston, C.L., Diekmann, D., y Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* *70*, 401-410.
- Rossman, K.L., Der, C.J., y Sondek, J. (2005). GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nature reviews* *6*, 167-180.
- Rowley, R.B., Burkhardt, A.L., Chao, H.G., Matsueda, G.R., y Bolen, J.B. (1995). Syk protein-tyrosine kinase is regulated by tyrosine-phosphorylated Ig alpha/Ig beta immunoreceptor tyrosine activation motif binding and autophosphorylation. *The Journal of biological chemistry* *270*, 11590-11594.
- Sada, K., Takano, T., Yanagi, S., y Yamamura, H. (2001). Structure and function of Syk protein-tyrosine kinase. *Journal of biochemistry* *130*, 177-186.

- Sakaba, T., y Neher, E. (2003). Direct modulation of synaptic vesicle priming by GABA(B) receptor activation at a glutamatergic synapse. *Nature* 424, 775-778.
- Salojin, K.V., Zhang, J., Meagher, C., y Delovitch, T.L. (2000). ZAP-70 is essential for the T cell antigen receptor-induced plasma membrane targeting of SOS and Vav in T cells. *The Journal of biological chemistry* 275, 5966-5975.
- Sander, E.E., van Delft, S., ten Klooster, J.P., Reid, T., van der Kammen, R.A., Michiels, F., y Collard, J.G. (1998). Matrix-dependent Tiam1/Rac signaling in epithelial cells promotes either cell-cell adhesion or cell migration and is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase. *The Journal of cell biology* 143, 1385-1398.
- Sauzeau, V., Sevilla, M.A., Rivas-Elena, J.V., de Alava, E., Montero, M.J., Lopez-Novoa, J.M., y Bustelo, X.R. (2006). Vav3 proto-oncogene deficiency leads to sympathetic hyperactivity and cardiovascular dysfunction. *Nature medicine* 12, 841-845.
- Scheres, S.H., Gao, H., Valle, M., Herman, G.T., Eggermont, P.P., Frank, J., y Carazo, J.M. (2007). Disentangling conformational states of macromolecules in 3D-EM through likelihood optimization. *Nature methods* 4, 27-29.
- Schlaepfer, D.D., Hanks, S.K., Hunter, T., y van der Geer, P. (1994). Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature* 372, 786-791.
- Schmidt, M., Evellin, S., Weernink, P.A., von Dorp, F., Rehmann, H., Lomasney, J.W., y Jakobs, K.H. (2001). A new phospholipase-C-calcium signalling pathway mediated by cyclic AMP and a Rap GTPase. *Nature cell biology* 3, 1020-1024.
- Schuebel, K.E., Movilla, N., Rosa, J.L., y Bustelo, X.R. (1998). Phosphorylation-dependent and constitutive activation of Rho proteins by wild-type and oncogenic Vav-2. *The EMBO journal* 17, 6608-6621.
- Schymeinsky, J., Sindrilaru, A., Frommhold, D., Sperandio, M., Gerstl, R., Then, C., Mocsai, A., Scharffetter-Kochanek, K., y Walzog, B. (2006). The Vav binding site of the non-receptor tyrosine kinase Syk at Tyr 348 is critical for beta2 integrin (CD11/CD18)-mediated neutrophil migration. *Blood* 108, 3919-3927.
- Seifert, J.P., Wing, M.R., Snyder, J.T., Gershburg, S., Sondek, J., y Harden, T.K. (2004). RhoA activates purified phospholipase C-epsilon by a guanine nucleotide-dependent mechanism. *The Journal of biological chemistry* 279, 47992-47997.
- Shiue, L., Zoller, M.J., y Brugge, J.S. (1995). Syk is activated by phosphotyrosine-containing peptides representing the tyrosine-based activation motifs of the high affinity receptor for IgE. *The Journal of biological chemistry* 270, 10498-10502.

- Snyder, J.T., Worthylake, D.K., Rossman, K.L., Betts, L., Pruitt, W.M., Siderovski, D.P., Der, C.J., y Sondek, J. (2002). Structural basis for the selective activation of Rho GTPases by Dbl exchange factors. *Nature structural biology* 9, 468-475.
- Soisson, S.M., Nimnual, A.S., Uy, M., Bar-Sagi, D., y Kuriyan, J. (1998). Crystal structure of the Dbl and pleckstrin homology domains from the human Son of sevenless protein. *Cell* 95, 259-268.
- Sondermann, H., Soisson, S.M., Boykevisch, S., Yang, S.S., Bar-Sagi, D., y Kuriyan, J. (2004). Structural analysis of autoinhibition in the Ras activator Son of sevenless. *Cell* 119, 393-405.
- Song, C., Satoh, T., Edamatsu, H., Wu, D., Tadano, M., Gao, X., y Kataoka, T. (2002). Differential roles of Ras and Rap1 in growth factor-dependent activation of phospholipase C epsilon. *Oncogene* 21, 8105-8113.
- Sorzano, C.O., Marabini, R., Velazquez-Muriel, J., Bilbao-Castro, J.R., Scheres, S.H., Carazo, J.M., y Pascual-Montano, A. (2004). XMIPP: a new generation of an open-source image processing package for electron microscopy. *Journal of structural biology* 148, 194-204.
- Takai, Y., Sasaki, T., y Matozaki, T. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiological reviews* 81, 153-208.
- Taniguchi, T., Kobayashi, T., Kondo, J., Takahashi, K., Nakamura, H., Suzuki, J., Nagai, K., Yamada, T., Nakamura, S., y Yamamura, H. (1991). Molecular cloning of a porcine gene syk that encodes a 72-kDa protein-tyrosine kinase showing high susceptibility to proteolysis. *The Journal of biological chemistry* 266, 15790-15796.
- Tarakhovskiy, A., Turner, M., Schaal, S., Mee, P.J., Duddy, L.P., Rajewsky, K., y Tybulewicz, V.L. (1995). Defective antigen receptor-mediated proliferation of B and T cells in the absence of Vav. *Nature* 374, 467-470.
- Tsuboi, T., da Silva Xavier, G., Holz, G.G., Jouaville, L.S., Thomas, A.P., y Rutter, G.A. (2003). Glucagon-like peptide-1 mobilizes intracellular Ca<sup>2+</sup> and stimulates mitochondrial ATP synthesis in pancreatic MIN6 beta-cells. *The Biochemical journal* 369, 287-299.
- Tsuchida, S., Yanagi, S., Inatome, R., Ding, J., Hermann, P., Tsujimura, T., Matsui, N., y Yamamura, H. (2000). Purification of a 72-kDa protein-tyrosine kinase from rat liver and its identification as Syk: involvement of Syk in signaling events of hepatocytes. *Journal of biochemistry* 127, 321-327.
- Tsujimura, T., Yanagi, S., Inatome, R., Takano, T., Ishihara, I., Mitsui, N., Takahashi, S., y Yamamura, H. (2001). Syk protein-tyrosine kinase is involved in neuron-like differentiation of embryonal carcinoma P19 cells. *FEBS letters* 489, 129-133.

- Turner, H., Gomez, M., McKenzie, E., Kirchem, A., Lennard, A., y Cantrell, D.A. (1998). Rac-1 regulates nuclear factor of activated T cells (NFAT) C1 nuclear translocation in response to Fcepsilon receptor type 1 stimulation of mast cells. *The Journal of experimental medicine* 188, 527-537.
- Turner, M., Mee, P.J., Costello, P.S., Williams, O., Price, A.A., Duddy, L.P., Furlong, M.T., Geahlen, R.L., y Tybulewicz, V.L. (1995). Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk. *Nature* 378, 298-302.
- Tybulewicz, V.L., Ardouin, L., Prisco, A., y Reynolds, L.F. (2003). Vav1: a key signal transducer downstream of the TCR. *Immunological reviews* 192, 42-52.
- Tybulewicz, V.L. (2005). Vav-family proteins in T-cell signalling. *Current opinion in immunology* 17, 267-274.
- Ulanova, M., Duta, F., Puttagunta, L., Schreiber, A.D., y Befus, A.D. (2005). Spleen tyrosine kinase (Syk) as a novel target for allergic asthma and rhinitis. *Expert opinion on therapeutic targets* 9, 901-921.
- Underhill, D.M., y Goodridge, H.S. (2007). The many faces of ITAMs. *Trends in immunology* 28, 66-73.
- Valencia, A., Chardin, P., Wittinghofer, A., y Sander, C. (1991). The ras protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *Biochemistry* 30, 4637-4648.
- Van Heel, M. (1987). Angular reconstitution: a posteriori assignment of projection directions for 3D reconstruction. *Ultramicroscopy* 21, 111-123.
- van Heel, M., Gowen, B., Matadeen, R., Orlova, E.V., Finn, R., Pape, T., Cohen, D., Stark, H., Schmidt, R., Schatz, M., *et al.* (2000). Single-particle electron cryo-microscopy: towards atomic resolution. *Quarterly reviews of biophysics* 33, 307-369.
- Vetter, I.R., y Wittinghofer, A. (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science (New York, NY)* 294, 1299-1304.
- Walsh, D.A., Perkins, J.P., y Krebs, E.G. (1968). An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. *The Journal of biological chemistry* 243, 3763-3765.
- Wang, L., Devarajan, E., He, J., Reddy, S.P., y Dai, J.L. (2005). Transcription repressor activity of spleen tyrosine kinase mediates breast tumor suppression. *Cancer research* 65, 10289-10297.
- Wang, S., Ding, Y.B., Chen, G.Y., Xia, J.G., y Wu, Z.Y. (2004). Hypermethylation of Syk gene in promoter region associated with

- oncogenesis and metastasis of gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* *10*, 1815-1818.
- Waters, S.B., Yamauchi, K., y Pessin, J.E. (1995). Insulin-stimulated disassociation of the SOS-Grb2 complex. *Molecular and cellular biology* *15*, 2791-2799.
  - Weis, K. (2003). Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell* *112*, 441-451.
  - Wennerberg, K., Rossman, K.L., y Der, C.J. (2005). The Ras superfamily at a glance. *Journal of cell science* *118*, 843-846.
  - White, H.E., Saibil, H.R., Ignatiou, A., y Orlova, E.V. (2004). Recognition and separation of single particles with size variation by statistical analysis of their images. *Journal of molecular biology* *336*, 453-460.
  - Wing, M.R., Houston, D., Kelley, G.G., Der, C.J., Siderovski, D.P., y Harden, T.K. (2001). Activation of phospholipase C-epsilon by heterotrimeric G protein betagamma-subunits. *The Journal of biological chemistry* *276*, 48257-48261.
  - Winter-Vann, A.M., y Casey, P.J. (2005). Post-prenylation-processing enzymes as new targets in oncogenesis. *Nat Rev Cancer* *5*, 405-412.
  - Woodside, D.G., Obergfell, A., Leng, L., Wilsbacher, J.L., Miranti, C.K., Brugge, J.S., Shattil, S.J., y Ginsberg, M.H. (2001). Activation of Syk protein tyrosine kinase through interaction with integrin beta cytoplasmic domains. *Curr Biol* *11*, 1799-1804.
  - Worthylake, D.K., Rossman, K.L., y Sondek, J. (2000). Crystal structure of Rac1 in complex with the guanine nucleotide exchange region of Tiam1. *Nature* *408*, 682-688.
  - Worthylake, D.K., Rossman, K.L., y Sondek, J. (2004). Crystal structure of the DH/PH fragment of Dbs without bound GTPase. *Structure* *12*, 1078-1086.
  - Wriggers, W., Milligan, R.A., y McCammon, J.A. (1999). Situs: A package for docking crystal structures into low-resolution maps from electron microscopy. *Journal of structural biology* *125*, 185-195.
  - Wu, J., Motto, D.G., Koretzky, G.A., y Weiss, A. (1996). Vav and SLP-76 interact and functionally cooperate in IL-2 gene activation. *Immunity* *4*, 593-602.
  - Xu, W., Harrison, S.C., y Eck, M.J. (1997). Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature* *385*, 595-602.
  - Xu, W., Doshi, A., Lei, M., Eck, M.J., y Harrison, S.C. (1999). Crystal structures of c-Src reveal features of its autoinhibitory mechanism. *Molecular cell* *3*, 629-638.

- Yamada, T., Fujieda, S., Yanagi, S., Yamamura, H., Inatome, R., Sunaga, H., y Saito, H. (2001). Protein-tyrosine kinase Syk expressed in human nasal fibroblasts and its effect on RANTES production. *J Immunol* 166, 538-543.
- Yamamoto, N., Hasegawa, H., Seki, H., Ziegelbauer, K., y Yasuda, T. (2003). Development of a high-throughput fluoroimmunoassay for Syk kinase and Syk kinase inhibitors. *Analytical biochemistry* 315, 256-261.
- Ye, Z.S., y Baltimore, D. (1994). Binding of Vav to Grb2 through dimerization of Src homology 3 domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 12629-12633.
- Yu, X., Jin, L., y Zhou, Z.H. (2008). 3.88 Å structure of cytoplasmic polyhedrosis virus by cryo-electron microscopy. *Nature* 453, 415-419.
- Zerial, M., y McBride, H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nature reviews* 2, 107-117.
- Zhang, X., Settembre, E., Xu, C., Dormitzer, P.R., Bellamy, R., Harrison, S.C., y Grigorieff, N. (2008a). Near-atomic resolution using electron cryomicroscopy and single-particle reconstruction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 1867-1872.
- Zhang, Y., Oh, H., Burton, R.A., Burgner, J.W., Geahlen, R.L., y Post, C.B. (2008b). Tyr130 phosphorylation triggers Syk release from antigen receptor by long-distance conformational uncoupling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Zheng, Y. (2001). Dbl family guanine nucleotide exchange factors. *Trends in biochemical sciences* 26, 724-732.
- Zhong, N., y Zucker, R.S. (2005). cAMP acts on exchange protein activated by cAMP/cAMP-regulated guanine nucleotide exchange protein to regulate transmitter release at the crayfish neuromuscular junction. *J Neurosci* 25, 208-214.
- Zhou, Z.H. (2008). Towards atomic resolution structural determination by single-particle cryo-electron microscopy. *Current opinion in structural biology* 18, 218-228.
- Zioncheck, T.F., Harrison, M.L., Isaacson, C.C., y Geahlen, R.L. (1988). Generation of an active protein-tyrosine kinase from lymphocytes by proteolysis. *The Journal of biological chemistry* 263, 19195-19202.
- Zoller, K.E., MacNeil, I.A., y Brugge, J.S. (1997). Protein tyrosine kinases Syk and ZAP-70 display distinct requirements for Src family kinases in immune response receptor signal transduction. *J Immunol* 158, 1650-1659.

- Zugaza, J.L., Lopez-Lago, M.A., Caloca, M.J., Dosil, M., Movilla, N., y Bustelo, X.R. (2002). Structural determinants for the biological activity of Vav proteins. *The Journal of biological chemistry* 277, 45377-45392.
- Zugaza, J.L., Caloca, M.J., y Bustelo, X.R. (2004). Inverted signaling hierarchy between RAS and RAC in T-lymphocytes. *Oncogene* 23, 5823-5833.