

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUIZ EDUARDO RIZZO DE SOUZA

**Caracterização da interação entre a
Rho GTPase de baixa massa molecular Rnd1
e a proteína STI1: possíveis implicações biológicas
no desenvolvimento do sistema nervoso.**

**Curitiba
2012**

LUIZ EDUARDO RIZZO DE SOUZA

**Caracterização da interação entre a
Rho GTPase de baixa massa molecular Rnd1
e a proteína STI1: possíveis implicações biológicas
no desenvolvimento do sistema nervoso.**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Dr. Silvio Marques Zanata.

Co-orientadora: Dra. Adriana Frohlich Mercadante.

**Curitiba
2012**

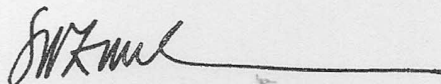
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

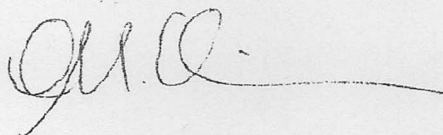
PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:

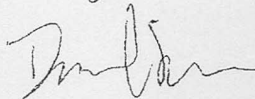
Prof. Dr. Silvio Marques Zanata
Orientador e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná - UFPR



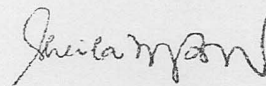
Profa. Dra. Olga Meiri Chaim
Departamento de Biologia Celular
Universidade Federal do Paraná - UFPR



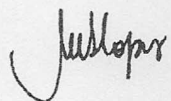
Prof. Dr. Daniel Shikanai Kerr
Faculdade de Medicina
Universidade de São Paulo - USP



Profa. Dra. Sheila Maria Brochado Winnischofer
Departamento de Bioquímica
Universidade Federal do Paraná - UFPR

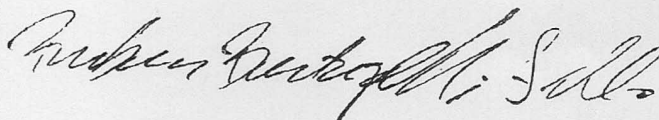


Profa. Dra. Marilene Hohmuth Lopes
Instituto de Ciências Biomédicas
Universidade de São Paulo - USP



E tendo como suplentes,

Prof. Dr. Rubens Bertazolli Filho
Universidade Federal do Paraná - UFPR

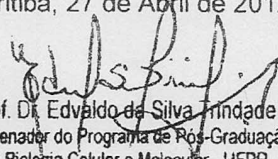


Prof. Dr. Francisco Filipak Neto
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Após arguir o candidato **Luiz Eduardo Rizzo de Souza**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Caracterização da interação entre a Rho GTPase de baixa massa molecular Rnd1 e a proteína ST11: possíveis implicações biológicas no desenvolvimento do sistema nervoso", são de parecer favorável à **APROVAÇÃO** do acadêmico, habilitando-o ao título de DOUTOR em Biologia Celular e Molecular, área de concentração Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora, bem como ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 27 de Abril de 2012


Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular - UFPR
Matr. 185795

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Silvio Marques Zanata pela orientação e confiança.

À professora Dra. Adriana Mercadante pelo fundamental apoio e incentivo durante o doutorado e principalmente na reta final deste trabalho.

Ao professor Dr. Edivaldo S. Trindade pela grande ajuda no final do meu doutorado e pela oportunidade em colaborar com a publicação da revista Toxicon.

À professora Cecília B. H. Niederheitmann pela oportunidade de acompanhá-la e de aprender muito em como ser um grande professor.

À professora Dra. Carla Wanderer pela oportunidade oferecida para a execução das minhas atividades do REUNI.

Aos professores doutores Olga Meiri Chaim, Francisco Filipak Neto e Juliana Ferreira de Moura pela participação na minha banca de qualificação.

Aos membros da minha banca de defesa de tese: Dr. Daniel Shikanai Kerr, Dra. Olga Meiri Chaim, Dra. Sheila Maria B. Winnischofer, Dr. Rubens Bertazzoli Filho e a Dra. Marilene Hohmuth Lopes.

À amiga e colaboradora professora Dra. Michele Dietrich Moura Costa.

À amiga e colaboradora Dra. Elizabeth de Moraes.

A todos os colegas do laboratório que em diversos momentos foram essenciais para o bom andamento dos meus experimentos.

Aos colegas do laboratório de Matriz Extracelular do Departamento de Biologia Celular e Molecular.

À minha família, pois são a minha fortaleza e referência de respeito e ética.

Ao meu companheiro Aleksandro Soares de Araújo por todo apoio e incentivo ao longo de todos esses anos de convívio.

A CAPES/REUNI pela bolsa de estudos.

RESUMO

A família de pequenas GTPases monoméricas compreende um grupo de moléculas que têm sua atividade regulada pela transição entre uma forma ativa ligada a GTP e uma forma inativa ligada a GDP. A subfamília de GTPases Rnd (Rnd1, Rnd2 e Rnd3) foram caracterizadas como um grupo diferente das outras Rho GTPases, pois possuem pouca atividade GTPásica intrínseca e encontram-se constitutivamente ativas. As proteínas Rnd são expressas em diferentes tecidos: Rnd1 foi identificada em fígado, cérebro e em miométrio humano durante a gravidez. Rnd2 é expressa em testículos e Rnd3 é ubiquamente expressa. Rnd1 está envolvida em uma variedade de mecanismos moleculares relacionados com a plasticidade do citoesqueleto de actina e dinâmica dos microtúbulos. A atividade de Rnd1 está envolvida com a extensão inicial de processos neuríticos em células PC-12 e com o alongamento de espinhos dendríticos e desenvolvimento de dendritos em neurônios de hipocampo de ratos. Compreender os mecanismos que regulam a atividade de Rnd1 é um desafio. A proteína STI1 foi descrita como uma proteína envolvida na formação de pseudopodia em associação com o citoesqueleto de actina, chamando por esta razão a nossa atenção. Entretanto, STI1 foi melhor caracterizada como uma molécula relacionada ao estresse térmico em leveduras e então denominada Stress-Inducible Protein 1 (STI1) e seu homólogo em humano Hop (Heat-shock organizing protein). Esta proteína desencadeia sinais intracelulares neuroprotetores e promove a neuritogênese em células neurais por interagir com a proteína prion celular. Assim, para investigar nossa hipótese ensaios de *pull-down* com diversas GTPases recombinantes, co-immunoprecipitação e ensaios de interação em placas de poliestireno foram realizados para avaliar a especificidade da interação entre Rnd1 e STI1. Células PC-12, N2a e SHSY-5Y foram utilizadas para ensaios de neuritogênese e diferenciação celular, enquanto células COS-7 foram empregadas em ensaios de contração celular. *Lipid rafts* foram purificados a partir de encéfalos de camundongos e células PC-12 biotiniladas na superfície celular, com o propósito de analisar a distribuição das proteínas Rnd1 e STI1. Os ensaios bioquímicos sugerem que Rnd1 e STI1 interagem *in vitro*. A expressão da proteína GFP-STI1 reverte a neuritogênese desencadeada pela proteína GFP-Rnd1 em células PC-12, N2a e SHSY-5Y e induz diferenciação em PC-12. A expressão da quimera GFP-STI1 e a proteína recombinante ϵ His-STI1 reduziram a contração celular em células COS-7 mediada pela interação entre GFP-Rnd1 e a porção citoplasmática da plexina-A1. STI1 e Rnd1 estão localizadas tanto nos *lipid rafts* quanto nas frações solúveis de membrana de encéfalos de camundongos. Entretanto, STI1 encontra-se predominantemente na porção intracelular dos *lipid rafts* de células PC-12. Os resultados demonstram que as proteínas Rnd1 e STI1 interagem e que tal interação promove a regulação da plasticidade do citoesqueleto.

Palavras-chave: Rnd1. STI1. Neuritogênese. Citoesqueleto. Diferenciação.

ABSTRACT

The small GTPase family of proteins comprises a group of molecules that have their activity regulated by switching between an active form GTP bound and inactive when hydrolyses the GTP to GDP. The Rnd family (Rnd1, Rnd2 and Rnd3) was first characterized as a different branch of the Rho GTPase family that has low affinity for GDP and are in a constitutively activated form. The Rnd proteins are expressed in different tissues: Rnd1 was found in liver, brain and human myometria during pregnancy. Rnd2 is expressed in testis and Rnd3 has a ubiquitously low level expression and are mainly involved in a variety of molecular mechanisms related to rearrangements of the actin cytoskeleton and microtubule dynamics. Rnd1 activity has been involved with process extension in PC-12 cells and with the elongation of dendritic spines and dendrite development in rat hippocampal neurons. Understand the mechanisms that regulate its activity are a challenge. STI1 was first characterized as a molecule related to yeast stress and so called yeast-stress-inducible protein 1 (STI-1) and its homologous proteins were then identified as the co-chaperone murine Stress-Inducible protein 1 (mSTI1) and Hop (Heat-shock organizing protein) in human. This protein triggers neuroprotective signals and promotes neuritogenesis by its characterized interaction with the prion protein. STI1 was also characterized as a molecule that was associated with pseudopodia formation in association with actin cytoskeleton. So, the main purpose of this work was biochemically characterize the interaction between Rnd1 and STI1 and analyze its biological function in the regulation of cytoskeleton plasticity and neuronal modulation. Then, to investigate our hypothesis pulldown, co-immunoprecipitation and binding assays were performed to evaluate the specificity of the interaction between Rnd1 and STI1. PC-12, N2a and SHSY-5Y cells were used for neuritogenesis assays and differentiation assays, while COS-7 cells were employed for cell contraction analysis. Lipid rafts were purified from mice brain and from surface biotinylated PC-12 cells for analysis of STI1 and Rnd1 distribution. Biochemical assays suggested that Rnd1 and STI1 can interact *in vitro*. Cellular GFP-STI1 expression reverts the neuritogenesis induced by GFP-Rnd1 on PC-12, N2a and SHSY-5Y cells and induces PC-12 differentiation. GFP-STI1 expression or soluble recombinant $_6$ His-STI1 decreases COS-7 cell contraction mediated by GFP-Rnd1 and cytoplasmic Plexin-A1. STI1 and Rnd1 are present both in lipid rafts and detergent soluble membrane fractions from mouse brain. PC-12 biotinylated rafts indicated that STI1 could be present in the cytoplasmic side of rafts. Results show that Rnd1 and STI1 interact to each other and this interaction is involved with cytoskeleton plasticity.

Key words: Rnd1. STI1. Neuritogenesis. Cytoskeleton. Differentiation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
1.1 OBJETIVO GERAL	8
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
2 REVISÃO DA LITERATURA	9
2.1 A família Rho de pequenas GTPases monoméricas	9
2.1.1 As GTPases monoméricas Rho	9
2.1.2 Caracterizando as GTPases Rnd (1, 2 e 3)	12
2.1.3 A proteína STI1 (Stress-Inducible Protein 1)	16
2.2 Os microdomínios de membrana ricos em colesterol (<i>Lipid rafts</i>)	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Reação de <i>Western Blot</i>	25
3.2 Preparação de extrato total de encéfalos	25
3.3 Preparação de membrana	26
3.4 Preparações de estirpes de <i>E. coli</i> eletrocompetentes	27
3.5 Purificações dos plasmídeos	27
3.5.1 Pequena escala (miniprep) dos vetores: pGEX 4T-2, pGEX4T2-Rnd1, pGEX4T2-Rnd2, pGEX4T2-RhoD, pGEX4T2-RhoG, pTRC-STI1 (Zanata <i>et al</i> , 2002a) contendo os fragmentos dos genes para as proteínas de interesse	27
3.5.2 Larga escala (maxiprep) dos vetores: pBK-myr-myc-Plexina-A1 (Rhom <i>et al</i> , 2000b), pEGFP-Rnd1 (Rhom <i>et al</i> , 2000b) e pEGFP-STI1 (Zanata <i>et al</i> , 2002a)	28
3.6 Expressão e purificação de proteínas recombinantes	29
3.6.1 Expressão e purificação da proteína recombinante ϵ His-STI1	29
3.6.2 Expressão e purificação da proteína recombinante GST-Rnd1	30
3.7 Produção dos anticorpos policlonais anti-GST, anti-STI1 e anti-Rnd1	31
3.8 Purificação de IgGs	32
3.9 Ensaio de bloqueio	33
3.10 Ligação covalente do anticorpo anti-STI1 em resina de proteína-A Sepharose	33
3.11 Expressão em larga escala das proteínas GST-Rnd1, GST-Rnd2, GST-RhoG, GST-RhoD e GST para ensaios de <i>pulldown</i>	34
3.11.1 Expressões das proteínas de interesse em pequena escala	34
3.12 Expressões das proteínas de interesse em larga escala para ensaio de <i>pulldown</i>	35
3.13 Co-immunoprecipitação	36
3.14 Ensaios de <i>pulldown</i>	37
3.15 Ensaio de ligação	38
3.16 Ensaios de neuritogênese em células PC-12, N2a e SHSY-5Y	38
3.17 Ensaios de diferenciação celular em PC-12	39
3.18 Ensaios de colapso do citoesqueleto em células COS-7	40
3.19 Purificação dos <i>lipid rafts</i>	40
3.20 Purificação dos <i>lipid rafts</i> a partir de células PC-12 biotiniladas na superfície celular	41
3.21 Ensaios de <i>pulldown</i> a partir de purificação de <i>lipid rafts</i> de células PC-12 biotiniladas na superfície celular	42
3.22 Espectrometria de massa (MALDI-TOF) e identificação de proteínas por PMF (<i>Peptide Mass Fingerprinting</i>)	43
3.23 Eletroforeses bidimensionais das amostras de <i>lipid rafts</i>	44
4. RESULTADOS	46
4.1 Expressão e purificação de proteínas recombinantes	46
4.1.1 ϵ His-STI1	46
4.1.2 GST-Rnd1	48
4.1.3 GST	49
4.2 Produção dos anticorpos policlonais	51
4.2.1 Anti-STI1	51
4.2.2 Anti-Rnd1	54
4.2.3 Anti-GST	55
4.3 Purificação de IgG	56
4.3.1 Teste de reatividade das IgGs anti-STI1 e anti-Rnd1 purificadas	58
4.3.1.1 Anti-STI1	58

4.3.1.2 Anti-Rnd1	59
4.4 Ligação covalente do anticorpo anti-ST11 em resina de Proteína-A Sepharose.....	61
4.5 Eficiência do anticorpo anti-ST11 covalentemente ligado em resina de proteína-A Sepharose para imunoprecipitação.....	62
4.6 Expressão em larga escala das proteínas GST-Rnd1, GST-Rnd2, GST-RhoG, GST-RhoD (Rhom <i>et al.</i> , 2000) e GST para ensaios de <i>pulldown</i>	64
4.7 Ensaios de <i>pulldown</i>	66
4.8 A proteína Rnd1 co-imunoprecipita com a proteína ST11 presente em extrato de encéfalos de camundongo adulto.....	69
4.9 Ensaio de ligação.....	70
4.10 Ensaios de neuritogênese em células PC-12, N2a e SHSY-5Y.....	73
4.10.1 Neuritogênese em células PC12.....	73
4.10.2 Neuritogênese em células N2a	76
4.10.3 Neuritogênese em células SHSY-5Y.....	78
4.11 Ensaios de diferenciação celular em PC-12.....	81
4.11.1 Expressão de neurofilamento médio (145 kDa) como marcador de diferenciação celular em células PC-12.....	81
4.11.2 Atividades das proteínas ERK 1/2.....	83
4.12 Ensaios de colapso do citoesqueleto em células COS-7	86
4.13 Ensaios de colapso do citoesqueleto em células COS-7 e o efeito da proteína ST11 recombinante.....	89
4.14 Purificação dos <i>lipid rafts</i>	91
4.14.1 A padronização da técnica	91
4.14.2 Identificações de proteínas presentes nos <i>lipid rafts</i> por espectrometria de massas.....	93
4.14.3 Camundongos selvagens para a proteína PrP ^c	96
4.14.4 Camundongos nocaute para a proteína PrP ^c	99
4.14.5 Camundongos selvagens para a proteína PrP ^c em estágio embrionário de 17 dias (E17).....	102
4.14.6 Ensaios de bloqueio com os anticorpos policlonais anti-ST11 e anti-Rnd1 para confirmação da identidade das proteínas presentes em <i>lipid rafts</i> de camundongos E17	104
4.15 Perfis eletroforéticos em duas dimensões (2-D) das amostras de <i>lipid rafts</i> e frações solúveis.....	106
4.15.1 SDS-PAGE 2-D	106
4.15.2 Reações de <i>Western blot</i> em 2-D.....	109
4.16 Purificação dos <i>lipid rafts</i> a partir de células PC-12	111
4.17 Espectrometria de massa (MALDI-TOF) e identificação de proteínas por PMF (<i>PEPTIDE MASS FINGERPRINTING</i>) presentes nos <i>lipid rafts</i> de células PC-12	114
4.18 Ensaios de <i>pulldown</i> a partir de purificação de <i>lipid rafts</i> de células PC-12 biotiniladas na superfície celular	115
4.19 Ensaio de imunoprecipitação (IP) a partir de purificação de <i>lipid rafts</i> de células PC-12 biotiniladas na superfície celular	117
5. DISCUSSÃO	118
5.1 Expressão, purificação da proteína recombinante ϵ His-ST11, produção e caracterização do anticorpo policlonal anti-ST11	118
5.2 Expressão, purificação das proteínas recombinantes GST e GST-Rnd1, produção e caracterização dos anticorpos policlonais anti-GST e anti-Rnd1	119
5.3 Ensaios de interação protéica.....	121
5.4 Ensaios biológicos	123
5.4.1 A neuritogênese	123
5.4.2 Ensaios de colapso de citoesqueleto em células COS-7	125
5.5 Análise da possível localização das proteínas ST11 e Rnd1 em microdomínios de membrana (<i>lipid rafts</i>).....	128
5.6 Hipótese para via de sinalização mediada pela interação entre as proteínas Rnd1 e ST11	136
6. CONCLUSÕES	139
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	140

1 INTRODUÇÃO

No desenvolvimento do sistema nervoso central, axônios são guiados por diversos sinais com o objetivo de estabelecerem conexões com alvos específicos, algumas vezes, muito distantes do local onde permanece o corpo celular (Mendes *et al.*, 2003). A pequena GTPase Rnd1, pertencente à família Rho de GTPases, e o ligante para a proteína príon celular (PrP^c) a proteína STI1 (Stress-Inducible-Protein 1) são ambas expressas no sistema nervoso central e estão envolvidas no crescimento de neuritos e na plasticidade do citoesqueleto. Estes dados sugerem uma possível participação destas proteínas nestes eventos celulares (Nobes *et al.*, 1998, Zanata *et al.*, 2002a; Lopes *et al.*, 2005).

A superexpressão da GTPase Rnd1 regula a formação das fibras de estresse, a plasticidade do citoesqueleto de actina em células COS-7, interage e controla a atividade da proteína SCG10 (*Superior Cervical Ganglion 10*) que por sua vez, quando ativada desorganiza os microtúbulos comprometendo a formação de axônios (Ridley *et al.*, 1992, Zanata *et al.*, 2002b, Li *et al.*, 2008).

STI1 por sua vez foi descrita como organizadora de um complexo macromolecular com a família de chaperonas (heat shock protein) Hsp70 e Hsp90 (Blatch *et al.*, 1997) e posteriormente descrita como um ligante para a proteína príon celular (PrP^c) (Zanata *et al.*, 2002a). A proteína STI1 despertou nosso interesse em função de sua participação no processo de neuritogênese (Lopes *et al.*, 2005).

Característica marcante na estrutura da proteína STI1 é a presença de três domínios TPR (TPR1, TPR2A e TPR2B) que interagem com Hsp70 e Hsp90 via suas extremidades N-terminal e domínio TPR2A, respectivamente (Lässle *et al.*, 1997 e Scheufler *et al.*, 2000) e das duas regiões DP 1 e 2 que são constituídas por repetições dos resíduos ácido aspártico e prolina (Flom *et al.*, 2007). STI1 é expressa em uma variedade de neurônios e células da glia durante o desenvolvimento do sistema nervoso, sendo sua expressão mantida no indivíduo adulto. Sua interação com a proteína príon celular promove diversos eventos celulares tais como: desenvolvimento de astrócitos, neuroproteção, diferenciação, e neuritogênese (Arantes *et al.*, 2009, Hajj, *et al.*, 2009, Lopes *et al.*, 2005, Chiarini *et al.*, 2002, Zanata *et al.*, 2002a).

STI1 é encontrada difusa no citoplasma, complexo de Golgi, em pequenas vesículas citoplasmáticas e uma pequena fração na superfície celular (Lässle *et al.*,

1997; Honoré *et al.*, 1992; Martins *et al.*, 1997). Recentemente foi caracterizada a presença de um sinal de direcionamento de STI1 para o núcleo (Daniel *et al.*, 2008, Longshaw *et al.*, 2004).

Foi demonstrada, também, a presença de STI1 em meio condicionado de astrócitos, em condições de estresse em co-cultivo com neurônios. Nesta situação a STI1 secretada, possivelmente via exossomos, dispara nos neurônios uma cascata de sinalização neuroprotetora. A STI1 é internalizada via *lipid rafts*, independentemente da presença da proteína príon celular, induzindo desta forma a ativação de sinais de neuritogênese e diferenciação (Arantes *et al.*, 2009, Caetano *et al.*, 2008, Lima *et al.*, 2007).

Estes dados tomados em conjunto levantaram a possibilidade de que Rnd1 e STI1 poderiam atuar em conjunto nos processos biológicos descritos separadamente para cada uma das moléculas. Sendo assim, o presente trabalho visou a caracterização da especificidade da interação Rnd1/STI1 e a avaliação das implicações biológicas para esta interação.

1.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar bioquimicamente a especificidade da interação Rnd1/STI1 e demonstrar sua funcionalidade biológica nos modelos de plasticidade do citoesqueleto e modulação fenotípica de células do sistema nervoso.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Expressar diferentes GTPases recombinantes que possibilitem o estudo da especificidade da interação entre Rnd1/STI1.
- Produzir anticorpos policlonais anti-GST, anti-STI1 e anti-Rnd1 utilizando proteínas recombinantes expressas e purificadas, que possibilitem estudos bioquímicos.
- Caracterizar a especificidade da interação entre Rnd1 e STI1.
- Analisar o papel desta interação em ensaios de neuritogênese e de colapso de citoesqueleto.
- Analisar a distribuição das proteínas Rnd1 e STI1 em *lipid rafts*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A família Rho de pequenas GTPases monoméricas

2.1.1 As GTPases monoméricas Rho

O citoesqueleto de actina tem um importante papel na definição da forma celular e em orquestrar muitos dos aspectos do comportamento celular como a migração, direcionamento de axônios, fagocitose e citocinese. A migração celular que é geralmente acompanhada de mudança na morfologia da célula, é de grande importância na embriogênese, mas é também crucial em adultos durante processos inflamatórios, podendo também responder pelo processo de metástase e invasão (Lin et al, 2010, Parri et al, 2010, Yamazaki et al, 2005, Ridley, 2004, Bar-Sagi, 2000).

O citoesqueleto de actina, por sua vez, fornece a força que direciona a migração celular sendo a proteína actina, regulada por diversas moléculas da família das GTPases Rho (Kinbara *et al.*, 2003, Etienne-Manneville, 2002, Bar-Sagi, 2000). Entretanto, dados ainda mais recentes da literatura sugerem que, além de intervir na plasticidade do citoesqueleto de actina, as GTPases da família Rho podem também influenciar a organização e dinâmica dos microtúbulos (Parri *et al.*, 2010, Li *et al.*, 2008).

As GTPases Rho fazem parte da superfamília Ras de GTPases. As mais de 60 proteínas caracterizadas nesta superfamília são agrupadas em cinco subfamílias distintas: Ras, Rho, Rab, Arf e Ran (Etienne-Manneville, 2002). Tais proteínas são de interesse especial por serem responsáveis por acoplar vias de transdução de sinais intracelulares a mudanças no meio extracelular, promovendo alterações morfológicas nos mais diversos tipos celulares e influenciando a migração celular (Schwamborn *et al.*, 2004, Burrige *et al.*, 2004, Kinbara *et al.*, 2003, Da Silva *et al.*, 2002, Wittmann *et al.*, 2001, Ridley, 2000).

As proteínas da família Rho participam de muitos outros processos celulares além daqueles envolvidos com o citoesqueleto, como por exemplo, regulação da polaridade celular, transcrição gênica, progressão da fase G1 do ciclo celular, vias de transporte de vesículas e uma variedade de atividades enzimáticas indo desde

NADPH oxidase em fagócitos à glucan sintase em leveduras (Etienne-Manneville et al, 2002). Existem evidências de que proteínas Rho podem alterar a expressão de genes codificantes de proteínas envolvidos na proteólise da matriz extracelular (Ridley, 2004). Rho, Rac e CDC42 são usualmente proteínas citoplasmáticas, estando normalmente complexadas a uma proteína inibidora, Rho-GDI (GDP *dissociation inhibitor*). Quando ativadas por fatores extracelulares, são recrutadas para a membrana plasmática e ativadas por uma GEF (*guanine nucleotide exchange factors*) (Etienne-Manneville et al, 2002).

Como quase todas as GTPases, as proteínas Rho existem em uma forma inativa (ligada a GDP) e ativa (ligada a GTP). GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*) que catalizam a troca de GDP por GTP, o qual existe em uma concentração intracelular maior que a de GDP (Harada *et al.*, 2005, Etienne-Manneville, 2002, Bar-Sagi *et al.*, 2000). Na sua forma ativa, ligada a GTP, as GTPases Ras e Rho interagem com suas proteínas alvo, promovendo diversas respostas celulares (Yamauchi *et al.*, 2004, Ishikawa et al., 2003, Ongusaha *et al.*, 2006, Del Pozo *et al.*, 2000). Finalmente, proteínas ativadoras da função GTPásica intrínseca das GTPases (GAPs - GTPase activating proteins), completam o ciclo funcional e a GTPase retorna ao seu estado inativo ligado a GDP (Bernards *et al.*, 2005).

A maioria das proteínas pertencentes à família de GTPases Rho possuem um domínio C-terminal (CAXX) que sofre modificação pós-traducional, recebendo uma inserção lipídica, o que proporciona a distribuição em diversos compartimentos subcelulares, e associação com membranas celulares e organelas (Bosco *et al.*, 2009, Nobes *et al.*, 1998). As principais modificações lipídicas sofridas pelas GTPases são geralmente, palmitoilação, prenilação, farnesilação e geranilgeranilação (Bosco *et al.*, 2009).

O gene para *rho* foi identificado em 1985 (Etienne-Manneville, 2002), mas foi somente em 1992 em artigos publicados por Ridley e Hall (1992 a e b) que as GTPases Rho saíram da sombra das GTPases Ras. Este trabalho atraiu os olhares dos pesquisadores para o universo do citoesqueleto. Naquele momento, entretanto, pouco se sabia sobre a organização de estruturas como fibras de estresse, lamelipodia e filopodia. Ridley e Hall não só estabeleceram que a organização destas estruturas são reguladas por Rho, Rac e Cdc42 respectivamente (Parri *et al.* 2010, Ridley e Hall 1992a, Ridley e Hall,1992c) mas que estas GTPases podem atuar regulando negativamente vias de sinalização a partir de fatores de crescimento

e outros agentes que atuam sobre receptores na superfície celular (Parri *et al.* 2010, Burridge, 2004).

Muito progresso tem sido obtido no estudo dos mecanismos moleculares envolvidos no controle da organização do citoesqueleto de actina e já está bem estabelecido que membros da família de GTPases monoméricas Rho são reguladores fundamentais do citoesqueleto de vários tipos celulares (Parri *et al.*, 2010, Fukata *et al.*, 2003, Price *et al.*, 2001). Tal regulação envolve também moléculas de adesão celular, como as integrinas sendo que tal comunicação é responsável por induzir mudanças conformacionais no citoesqueleto das células em resposta a estímulos extracelulares (Kinbara *et al.*, 2003, Price *et al.*, 2001, Ridley, 2000).

Em células tumorais, as GTPases têm o potencial de regular a capacidade invasiva de tumores. Intermediário entre atividade de GTPases e integrinas é a fosfatidilinositol quinase 3 (PI-3K). PI3K é ativada a partir da adesão mediada por integrinas e seus produtos promovem a ativação de certas GEFs (proteínas trocadoras de nucleotídeos) que por sua vez, ativam GTPases da família Rho (Han *et al.*, 1998, Khwaja *et al.*, 1997, Miyamoto *et al.*, 1995).

Até o momento já foram descritas pelo menos 20 proteínas Rho em mamíferos: Rho (A, B e C), Rac (1, 2 e 3), Cdc42, TC10, TCL, Wrch, Chp/Wrch2, RhoG, RhoD, Rif, RhoH/TTF, RhoBTB (1 e 2) e Rnd (1, 2 e 3). Dentre as proteínas Rho, as funções de Rho, Rac e Cdc42 tem sido mais extensivamente caracterizadas (Chardin, 2006, Burridge, 2004, Ettienne-Manneville, 2002, Bar-Sagi, 2000). Em células neurais, a ativação de Rac e Cdc42 induz a formação de lamelopodia e filopodia em cones de crescimento e estimula o crescimento de neuritos (Chardin,2006, Huber,2003). Por outro lado, a ativação de Rho induz a inibição da neuritogênese e retração de neuritos. Estudos recentes têm revelado o envolvimento de GTPases da família Rho na regulação negativa de vias de sinalização de uma variedade de neurotrofinas e moléculas guia de axônios para regular o citoesqueleto de actina (Kato, 2002).

2.1.2 Caracterizando as GTPases Rnd (1, 2 e 3)

A família de GTPases Rnd (Rnd1/Rho6, Rnd2 e Rnd3/RhoE) foram caracterizadas por Nobes e colaboradores em 1998. Este grupo mostrou que as Rnds não possuem afinidade por GDP e estão constitutivamente ativas. Além desta particularidade, que as difere das demais GTPases, as Rnds têm expressão diferenciadas, Rnd1 é expressa em diversos tecidos, como cérebro, ovário de ratas prenhas, miométrio de mulheres durante a gravidez, pulmão, fígado e células endoteliais (Kin *et al.*, 2005, Warton, 2004, Kin *et al.*, 2003, Nobes *et al.*, 1998). Rnd2 é muito expressa em espermátides e espermatócitos, localizando-se na vesícula acrossômica, endossomos primários em células HeLa e cérebro (Naud *et al.*, 2003, Fujita *et al.*, 2002, Tanaka *et al.*, 2002, Nobes *et al.*, 1998). Rnd3 é ubiquamente expressa, entretanto o seu nível de expressão varia muito dependendo do tecido analisado (Ishikawa, 2003, Nobes *et al.*, 1998, Gausch *et al.*, 1998).

As proteínas Rnd compartilham 54-63% de homologia entre seus membros, aproximadamente 45-49% de identidade com Rho, e pouca semelhança com outros membros da família Rho (Rac, Cdc42 e etc) levando a conclusão que as três proteínas Rnd (Rnd1, 2 e 3) formam uma nova ramificação da família Rho (Nobes *et al.*, 1998). As proteínas Rnd mostram diferenças significativas de outros membros da família Rho em relação ao seu tamanho, carga, e propriedades bioquímicas. Suas massas moleculares esperadas são altas devido a extensões NH₂-terminal para Rnd1 e Rnd3/RhoE e COOH-terminal de aproximadamente 30 aminoácidos para as três. Suas massas moleculares aparentes observadas a partir de SDS-PAGE são 32kDa, apesar de Rho migrar a aproximadamente a 24kDa. (Nobes, 1998).

Estudos biológicos iniciais têm sugerido que as proteínas Rnd têm papel fundamental na regulação celular por neutralizar as funções biológicas da GTPase RhoA, mas a base molecular deste antagonismo é desconhecido. Possíveis mecanismos através dos quais as proteínas Rnd podem funcionar como antagonistas da RhoA incluem seqüestro de efetores moleculares da RhoA, inibição de GEFs e ativação de GAPs para RhoA - como a p190RhoGAP (Wennenberg *et al.*, 2003). Em precursores neurais, a superexpressão da GTPase Rnd1 inibe a formação das fibras de estresse e induz a desorganização do citoesqueleto de actina e adesões focais, causando a perda de adesão à matriz extracelular (Vayssière, 2000). Wennenberg e colaboradores em 2003 demonstraram que

Socius, um efetor de proteínas Rnds (Katho *et al.*, 2002), induz o colapso das fibras de estresse de actina atuando como parceiro molecular desta GTPase.

A organização do sistema nervoso é um evento complexo e muito bem orquestrado. Neurônios migram para seus locais característicos estendendo axônios e dendritos sobre alvos específicos, induzindo a formação de espinhos dendríticos e conexões sinápticas com parceiros apropriados. A dinâmica das alterações morfológicas em neurônios, associadas a estes eventos, está na dependência da plasticidade do citoesqueleto (Ishikawa *et al.*, 2003). A proteína Rnd1 está envolvida nos mecanismos relacionados à morfologia de neurônios, como a extensão de neuritos em células PC-12 transfectadas, axônios e neuritos em neurônios do hipocampo de ratos e durante o estágio de formação de sinapses induzindo o alongamento de espinhos dendríticos (Li *et al.*, 2009, Ishikawa *et al.*, 2006, Ishikawa *et al.*, 2003, Aoki *et al.*, 2000).

Em 2000, Vayssière e colaboradores identificaram por ensaios de duplo-híbrido a partir de uma biblioteca de cDNA de embrião de camundongo, a interação entre Rnd1 e a proteína adaptadora Grb7. Essa interação específica com Grb7 foi confirmada através de ensaios de *pull-down* com uma linhagem celular de tumor de mama (SK-BR3) que superexpressa a proteína Grb7. Entretanto, os efeitos celulares dessa interação não foram estudados, sendo que os autores propuseram que a interação Rnd1/Grb7 regule a migração celular induzida por fatores de crescimento e adesão (Vayssière, 2000). Reforçando a hipótese levantada por Vayssière e colegas, Rnd1 foi caracterizada como proteína reguladora da adesão celular e morfogênese durante o desenvolvimento de embriões de *Xenopus laevis* quando interage com as proteínas FLRT3 e Unc5B (Karaulanov *et al.*, 2009, Ogata *et al.*, 2007). Entretanto, mais estudos precisariam ser feitos com o objetivo de encontrar mais parceiros moleculares envolvidos na sinalização desencadeada pela Rnd1.

Foi demonstrado por Zanata e colaboradores (2002b) que a proteína Rnd1 interage com o domínio citoplasmático da proteína Plexina-A1, um receptor para a semaforina-3A, induzindo o colapso do citoesqueleto em células COS-7 e rearranjo dos cones de crescimento de neurônios da raiz ganglionar. As semaforinas atuam como sinais repulsores, que induzem o colapso de cones de crescimento ou induzem a mudança de direção migratória de axônios, em relação às células que expressam tanto as formas ligadas à membrana quanto às secretadas (Püschel, 2010, Fierce *et al.*, 2001). A atividade desencadeada pelas semaforinas é

normalmente mediada pela interação com um complexo de receptores constituído pela neuropilinas-1 e 2 (Nrp1 e Nrp2) e as plexinas da subfamília A (para as semaforinas secretadas da classe 3) ou por interação direta entre semaforina e plexina (Sema3E-plexina-D1, Sema-4D-plexina-B1, Sema-5A-plexina-B3, Sema-6D-plexina-A1, Sema-7A-plexinaC1) (revisto por Püschel, 2010).

As plexinas, o receptor de membrana responsável por transmitir o sinal desencadeado pelas semaforinas, interagem diretamente com diversas GTPases através de seus domínios GAP, ou recrutando GEFs e GAPs para membrana (Püschel, 2010, Rhom *et al.*, 2000a). A ausência de ligantes promove uma mudança conformacional na plexina que compromete sua capacidade de ativação de GTPases (Takahashi *et al.*, 2001). A ligação da semaforina à plexina, tanto diretamente (Sema-4D) quanto indiretamente, via co-receptor Nrp-1 (Sema-3A) promove alteração conformacional que desativa a autoinibição conformacional e ativa o receptor (Zanata *et al.*, 2002b, Rhom *et al.*, 2000a, Rhom *et al.*, 2000b, Takahashi *et al.*, 1999). Entretanto, a deleção da porção citoplasmática do domínio semaforina ou de todo o domínio extracelular da plexina-A1 resulta na sua atividade constitutiva (revisto por Püschel, 2010). Assim, confirmando este dado em 2002, foi demonstrado que aproximadamente 60% das células COS-7 co-transfectadas com a porção citoplasmática da plexina-A1 e a quimera GFP-Rnd1 sofriam colapso de citoesqueleto, independentemente o estímulo da Sema-3A (Zanata *et al.*, 2002b).

Dois modelos heterólogos de estudos das propriedades das semaforinas sobre seus receptores, que mimetizam seus efeitos sobre os cones de crescimento de neurônios são a cultura primária de neurônios sensoriais ou de hipocampo com com exposição às proteínas Sema-3A, Sema-4A ou Sema-4D (Yukawa *et al.*, 2010, Rhom *et al.*, 2000a). O segundo modelo é baseado na reconstituição dos receptores funcionais em células COS-7 (Takahashi *et al.*, 1999). Esta linhagem celular não expressa os receptores nem responde naturalmente às semaforinas (Oinuma *et al.*, 2003, Rhom *et al.*, 2000a), sendo necessária a transfecção desta células com os receptores adequados à semaforina a ser estudada. Assim, este modelo é de grande relevância, pois permite o controle por diversas formas da ação da semaforina e da regulação dos efeitos citoplasmáticos das GTPases sobre o citoesqueleto das células.

Apesar de diversas tentativas, ainda é obscura a forma como a GTPase Rnd1 é regulada. Diversas publicações, relacionadas à tentativas de explicar os

prováveis mecanismos de atuação e regulação da atividade da Rnd1, sugerem que a interação com outras moléculas, inibidoras ou ativadoras, possam ser o caminho para a compreensão dos mecanismos relacionados com a regulação da proteína Rnd1. Curiosamente, em 1996, a proteína STI1 foi inicialmente denominada extendina, devido sua parcial localização em pseudópodos em associação com o citoesqueleto de actina (Blatch *et al.* 1995; Gross *et al.*, 1996). Tal associação com o citoesqueleto chamou nossa atenção. Somando-se à estes dados, diversos trabalhos têm associado STI1 com a neuritogênese, neuroproteção, desenvolvimento de astrócitos e migração celular e localização em *lipid rafts* (Lin *et al.*, 2009, Arantes *et al.*, 2009, Caetano *et al.*, 2008, Lopes *et al.*, 2005). Assim, como as proteínas Rnd estão relacionadas com a regulação do citoesqueleto de actina durante a migração celular, invasão e neuritogênese, decidimos investigar uma possível interação entre STI1 e membros da família Rho de GTPases.

2.1.3 A proteína STI1 (Stress-Inducible Protein 1)

A proteína STI1 foi descrita pela primeira vez em 1989 por Nicolet e colaboradores como uma proteína relacionada à atividade da chaperona Hsp70 em resposta a estresse térmico em células de *Saccharomyces cerevisiae*. Tal proteína mais tarde foi identificada como homóloga das proteínas STI1 humana (hSTI1 ou Hop) e de camundongo (mSTI1) em função da identidade das seqüências de seus aminoácidos (cerca de 42%) (Honoré et al., 1992). Trabalhos subseqüentes caracterizaram as proteínas STI1/Hop organizadoras do complexo Hsp70/Hsp90 como pertencentes à família de cochaperonas. Tal interação foi descrita por Hernandez e colaboradores (2002) como facilitadora da transferência de substratos (proteínas) da Hsp70 para a Hsp90, sendo este evento fundamental para dobramento e maturação correta de proteínas. Entretanto, por si só STI1 não possui atividade chaperonina (Schumacker *et al.*, 1994).

Notavelmente, existe uma seqüência de motivos encontrada em todas as proteínas homólogas a STI1 descritas até o momento, este motivo se chama tetratricopeptideo (TPR) e está relacionado com a formação dos macrocomplexos moleculares já mencionados (Smith *et al.*, 1993). O domínio TPR é uma seqüência degenerada de 34 aminoácidos identificada em uma grande variedade de proteínas, organizadas em conjuntos de 3-16 motivos. Estes motivos formam suportes para proporcionar interações do tipo proteína-proteína e a organização dos complexos multiprotéicos (Blatch e Lässle, 1999).

Nas células, as proteínas contendo domínios TPR estão localizadas em diversos compartimentos subcelulares, incluindo núcleo, citoplasma e mitocôndria. Diversos eventos celulares e moleculares estão relacionados a proteínas da família TPR. A promoção da anáfase durante o ciclo celular pelas proteínas CDC16, 23 e 27 que fazem parte do complexo promotor da anáfase (APC), a regulação da síntese de mRNA pelas proteínas Ssn6 e SKI3 e a regulação do transporte de proteínas em mitocôndrias pela proteína MAS70 são bons exemplos (Goebel *et al.*, 1991, Yanagida, 1991; Sikorski *et al.*, 1991; Lamb *et al.*, 1995). Embora não haja evidências de que motivos TPR de diferentes proteínas TPR possam interagir diretamente, eles são importantes para promover as interações entre proteínas TPR e proteínas sem tal domínio. Característica marcante na estrutura da proteína STI1 é a presença de três domínios TPR (TPR1, TPR2A e TPR2B) que interagem com Hsp70 e Hsp90 via

suas extremidades N-terminal e domínio TPR2A, respectivamente (Lässle *et al.*, 1997 e Scheufler *et al.*, 2000, Caetano *et al.*, 2008) e das duas regiões DP 1 e 2 (Flom *et al.*, 2007). O domínio TPR1 de STI1 compreende os aminoácidos 4-19, o domínio TPR2A os aminoácidos 225-347 e o domínio TPR2B os aminoácidos 360-475.

STI1 é expressa em uma variedade de neurônios e células da glia durante o desenvolvimento do sistema nervoso e também sua expressão se mantém no indivíduo adulto. Já é descrita a sua participação em diversos eventos celulares tais como: desenvolvimento de astrócitos, diferenciação de neurônios, neuroproteção por prevenir apoptose via ativação de PKA em neurônios da retina de ratos, neuritogênese, formação da memória em ratos e proliferação celular em tumor de ovário (Wang *et al.*, 2010, Hajj *et al.*, 2009, Arantes *et al.*, 2009, Caetano *et al.*, 2008, Coitinho *et al.*, 2007, Lopes *et al.*, 2005, Chiarini *et al.*, 2002, Zanata *et al.*, 2000a). Em 2005, Sakudo e colaboradores, mostraram a existência de uma cooperação entre a proteína PrP^C e a enzima superóxido dismutase (SOD). Neste trabalho a associação de STI1 com PrP^C parece modular a atividade da enzima SOD. Assim a STI1 estaria indiretamente envolvida na modulação antioxidante da célula (Sakudo *et al.*, 2005).

STI1 é encontrada difusa no citoplasma, complexo de Golgi, em pequenas vesículas citoplasmáticas e uma pequena fração na superfície celular (Lässle *et al.*, 1997; Honoré *et al.*, 1992; Martins *et al.*, 1997). Recentemente foi caracterizada a presença de um sinal de direcionamento de STI1 para o núcleo (Daniel *et al.*, 2008, Longshaw *et al.*, 2004). Foi demonstrada sua secreção por astrócitos, em condições de estresse, em co-cultivo com neurônios disparando nestes últimos uma cascata de sinalização neuroprotetora. Sugere-se que a secreção de STI1 possa ocorrer via exossomos, já que a proteína não possui descrita, até o momento, nenhum sinal de secreção (Lima *et al.*, 2007; Caetano *et al.*, 2008, Arantes *et al.*, 2009). Seu direcionamento para a membrana plasmática se dá provavelmente por associação com proteínas de membrana (Honoré *et al.*, 1992) ou possível secreção via exossomos em associação com as proteínas Hsp70 ou Hsp90 (Tsutsumi *et al.*, 2007, Calderwood *et al.*, 2007, Gastpar *et al.*, 2005, Sidera *et al.*, 2004, Mathew *et al.*, 1995). Interessantemente, as pequenas GTPases monoméricas da família Rho sofrem modificações pós-traducionais do motivo CAXX (Nobes *et al.*, 1998) durante o seu processamento, e são direcionadas para a porção citoplasmática da membrana

plasmática, região onde também é encontrada a STI1. Esse dado reforça a possibilidade de interação entre tais proteínas.

Em 2002 Zanata e colaboradores caracterizaram a interação entre a proteína STI1 e a proteína PrP^C. Neste trabalho os autores mostraram por diversas técnicas, dentre elas ensaios de interação como *pull-down* e co-imunoprecipitação a especificidade da interação entre STI1-PrP^C. Neste mesmo trabalho foi demonstrado que o domínio de interação em STI1 (aminoácidos 230-245) era responsável pela atividade neuroprotetora desencadeada pela interação tanto da proteína STI1 inteira quanto o peptídeo de interação com PrP^C (aminoácidos 230-245) em neurônios.

Posteriormente, foi caracterizado o mecanismo de neuroproteção desencadeado pela interação PrP^C-STI1, quando Lopes e colaboradores (2005) demonstraram que diversas vias de sinalização associadas com neuroproteção e neuritogênese em neurônios do hipocampo de camundongo estariam sob a regulação da interação PrP^C/STI1. Sendo que a ativação da via de ERK 1/2 seria a responsável pela neuritogênese induzida pela ligação de STI1-PrP^C e a neuroproteção dependeria da atividade da via de PKA (Lopes *et al.*, 2005). Entretanto, a neuroproteção e neuritogênese induzida por PrP^C, não dependeria somente da sua interação com STI1 (Lopes *et al.*, 2005, Chiarini *et al.*, 2002, Zanata *et al.*, 2002a), pois Hajj e colaboradores, em 2007, mostraram que a interação de PrP^C com a proteína vitronectina, no sistema nervoso periférico, também está envolvida neste eventos celulares.

A proteína STI1 expressa por células da glia (astrócitos) é detectada no meio extracelular atuando como molécula neuroprotetora em neurônios em co-cultura de astrócitos, por promover a ativação da via de PKA (Arantes *et al.*, 2009, Lima *et al.*, 2007; Chiarini *et al.*, 2002; Lopes *et al.*, 2005). A proteína STI1 pode estimular, também, a via de ERK 1/2 em neurônios de explantes de retina de rato (Chiarini *et al.*, 2002) assim como em neurônios de hipocampo (Lopes *et al.*, 2005). Tal ativação induz a diferenciação e síntese de proteínas nestas células, não só por ativação de ERK 1/2, mas também com a ativação da via AKT/PI3K/mTOR (Roffé *et al.*, 2010, Lopes *et al.*, 2005). Curiosamente, a STI1 secretada também é responsável pela ativação da via de ERK 1/2 por interação com proteínas de superfície celular como a proteína PrP^C, o que promove sua internalização por endocitose induzindo assim a neuritogênese (Caetano *et al.*, 2008). Contudo, no mesmo trabalho de Caetano e colaboradores (2008), os autores relataram que a

proteína STI1 pode também ser endocitada independentemente da presença da proteína PrP^C. O mais intrigante nesta atividade da STI1 é entender como sua interação, na dependência ou não de PrP^C, poderia ativar uma via de sinalização dependente de receptores.

Na tentativa de explicar o possível mecanismo envolvido na ativação de vias de sinalização intracelulares envolvendo ERK e PKA, Beraldo e colaboradores (2010), mostraram em estudo que a interação entre PrP^C e STI1 promove um aumento intracelular nos níveis de Ca⁺² em neurônios do hipocampo de embrião de camundongos, e que tal influxo se dá via o receptor α -7- nicotínico de acetilcolina (α -7nAChR). Os dados deste trabalho, indicam que o influxo de Ca⁺² é dependente da interação de STI1 com PrP^C, já que neurônios de camundongos deficientes para PrP^C, não responderam ao estímulo com a STI1. Assim, os autores mostraram que após o estímulo das células com a STI1, foi possível associar o aumento do influxo de Ca⁺², à ativação das vias de ERK 1/2 e PKA, responsáveis por diferenciação celular e neuroproteção respectivamente. Entretanto, esses dados não explicam o envolvimento da internalização do complexo STI-PrP^C na ativação da via de neuritogênese e diferenciação.

Desta forma, pensando na possível regulação da atividade de GTPases pela interação com a proteína STI1, o mecanismo proposto por Caetano e colaboradores (2008), que envolve a internalização de STI1, independente da presença de PrP^C, via *lipid rafts*, parece mais coerente. Isso pelo simples fato de que as GTPases, pelo menos até o momento, são caracterizadas como moléculas intracelulares. Portanto, investir na análise da possível interação entre STI1 e GTPases, bem como a regulação da atividade das GTPases por STI1, parece caminhar para o mecanismo de sinalização proposto por Caetano e colaboradores. O fato de os *lipid rafts* estarem associados à atividade de STI1 via sua internalização ou presença nestes microdomínios de membrana (Lin *et al.*, 2010, Caetano *et al.*, 2008), chamou a nossa atenção. Evidências na literatura sugerem que tais estruturas estariam envolvidas em eventos relacionados a neuritogênese e a diversos processos de sinalização intracelulares e que proteínas miristoiladas e/ou palmitoiladas, tal como as diversas GTPases, estariam localizadas na porção intracelular destes microdomínios de membrana (Limpert *et al.*, 2007, Allen *et al.*, 2007, Mishra *et al.*, 2007, Resh, 1999, Prinetti *et al.*, 1999). Esses dados, analisados em conjunto,

levantaram a hipótese de que os *lipid rafts* pudessem atuar como uma plataforma para uma possível interação entre GTPases e a proteína STI1.

2.2 Os microdomínios de membrana ricos em colesterol (*Lipid rafts*)

A existência dos *lipid rafts* foi proposta por Simons e Ikonen em 1997. Desde então esta região da membrana plasmática rica em lipídios como colesterol, esfingolipídios e glicosfingolipídios, vem sendo amplamente estudada (Lingwood *et al.*, 2010, Pike, 2003). Baseado nas propriedades fisicoquímicas, os *lipid rafts* vêm sendo isolados bioquimicamente como frações flutuantes de membrana de baixa densidade e resistentes a detergentes (como por exemplo Triton X-100) em baixas temperaturas (Williamson *et al.*, 2010, Zhao *et al.*, 2009, Diesbach *et al.*, 2008, Limpert *et al.*, 2007, Naslavsky *et al.*, 1997).

Definido como um microdomínio heterogêneo que pode compartimentalizar diversos processos celulares, tais como sinalização celular, endocitose e trânsito de membranas, os *lipid rafts* compreendem regiões mais organizadas da membrana plasmática (Pike, 2006, Rajendan *et al.*, 2005, Simons *et al.*, 2000). Os *lipid rafts* são considerados domínios de membrana mais fortemente organizados que as regiões de membranas adjacentes (Rajendan *et al.*, 2005). Esta maior organização se deve à presença de cadeias de hidrocarbonetos saturados nos esfingolipídios e fosfolipídios, presentes nos *lipid rafts*, se comparados aos ácidos graxos insaturados presentes nos fosfolipídios das outras regiões da membrana celular (Simons e Vaz, 2004).

Uma das mais importantes características dos *lipid rafts* é que eles podem incluir ou excluir uma variedade de proteínas, sendo que tal afirmação tem suporte nos diversos trabalhos sobre proteômica de *lipid rafts* publicados nos últimos anos (Williamson *et al.*, 2010, Lin *et al.*, 2009, Mannová *et al.*, 2006, Foster *et al.*, 2003, Nebl *et al.*, 2002). A literatura a cada dia traz mais evidências que de fato, estes domínios de membrana são altamente heterogêneos, variando muito sua composição, tanto lipídica quanto protéica a depender do tipo celular estudado ou do contexto fisiológico das células analisadas (Williamson *et al.*, 2010, Lin *et al.*, 2009, Limpert *et al.*, 2007, Matallanas *et al.*, 2006, Radeva *et al.*, 2004, Prinetti *et al.*, 1999, Naslavsky *et al.*, 1997).

Proteínas com afinidade e residentes dos *lipid rafts* incluem proteínas GPI-ancoradas, tais como PrPc, Thy-1 e a fosfatase-alcalina, as duplamente aciladas como as proteínas quinases da família Src (como Lck, Fyn e Lyn), as subunidades α das proteínas G heterotriméricas, a flotilina-1 que é acilada, proteínas palmitoiladas, como a GTPase Ras, e proteínas com afinidade a colesterol como as caveolinas (Zhao *et al.*, 2008, Matallanas *et al.*, 2006, Yuyama *et al.*, 2007, Misha *et al.*, 2007, Simons *et al.*, 2000, Madore *et al.*, 1999). Além desta heterogeneidade de componentes protéicos, os *lipid rafts* em membranas biológicas variam muito em tamanho e tempo de vida, pois são estruturas dinâmicas, sendo geralmente pequenos e de curta duração (Jacobson *et al.*, 2007, Kenworthy *et al.*, 2000). Como consequência, tanto proteínas quanto lipídios são capazes de se moverem para dentro ou para fora destes microdomínios de membrana, com componentes cinéticos distintos (Edidin, 2003).

Uma estrutura característica dos *lipid rafts* são as cavéolas (Kurzchalia e Parton, 1999). Cavéolas são pequenas invaginações da membrana encontradas nas membranas plasmáticas de diversos tipos celulares e revestidas e enriquecidas das proteínas caveolinas. A superexpressão destas proteínas em células com ausência de cavéolas tais como linfócitos e células neurais, pode induzir a formação de cavéolas (Fra *et al.*, 1995). As flotilinas que se localizam nos *lipid rafts*, mas não em cavéolas, funcionam provavelmente como moléculas envolvidas na organização dos *lipid rafts* (Rajendan *et al.*, 2005). As cavéolas estão associadas também a processos de endocitose dependente de *lipid rafts*, sendo responsáveis pela internalização de moléculas GPI ancoradas nestes microdomínios de membrana (Revisto por Rajendan e Simons, 2005). Entretanto, outros mecanismos de internalização independentes de cavéolas também já foram descritos, como via clatrina ou flotilina (Nichols, 2003, Glebov *et al.*, 2006, Harder, 1997).

Os *lipid rafts* são bastante estudados em razão de serem considerados plataformas de sinalização por agregarem receptores de membranas para diversos ligantes (Moretti *et al.*, 2008, Allen *et al.*, 2007, Limperte *et al.*, 2007, Simons *et al.*, 2000). Em 2008, Moretti e colaboradores mostraram que a proteína semaforina-3A (Sema-3A) em células Jurkat funciona como uma molécula pró-apoptótica, e que a Nrp-1 é uma molécula residente dos *lipid rafts* destas células. A Sema-3A estimula o deslocamento e concentração da proteína Fas (CD95) nos *lipid rafts* das células Jurkat provavelmente em associação com plexina-A1, também deslocada para os

lipid rafts. A concentração da proteína Fas (CD95) nos microdomínios de membrana ativa nestas células a via de sinalização da apoptose (Moretti *et al.*, 2008). A desorganização dos *lipid rafts* com M β CD, uma droga capaz de retirar o colesterol da membrana (Rodal *et al.*, 1999), reduziu a resposta das células Jurkat ao estímulo de morte programada da Sema-3A, conseqüentemente evidenciando a importância da integridade dos *lipid rafts* para o controle da proliferação celular (Moretti *et al.*, 2008).

Em 1999, Takahashi e colaboradores já mostravam que em cones de crescimento de neurônios da raiz gáglionar as proteínas plexina-1 e Nrp-1 co-localizavam. Entretanto, os mesmos autores perceberam que o estímulo destes neurônios com a Sema-3A promovia uma clusterização entre plexina-1 e Nrp-1, com o conseqüente colapso do cone de crescimento. Assim, em 1999 Takahashi e colegas propuseram, pela primeira vez, que a clusterização dos receptores para a Sema-3A deveria mediar a ação desta proteína sobre os cones de crescimento de neurônios. A desorganização dos *lipid rafts* foi responsável por bloquear o efeito repulsor da Sema-3A sobre cones de crescimento de neurônios de *Xenopus laevis* em ensaios de migração (Guirland *et al.*, 2004). Guirland e colaboradores também detectaram aumento na atividade de ERK 1/2 em neurônios de *Xenopus* expostos ao BDNF, à netrina-1, Sema-3A e glutamato. Os autores confirmaram a dependência da integridade dos *lipid rafts* para esta via de sinalização, pois o tratamento dos neurônios com a M β CD diminuiu significativamente a atividade de ERK 1/2.

Pelas razões descritas anteriormente, fica plausível levantar a hipótese de que os *lipid rafts* participam, de forma essencial na sinalização mediada pela Sema-3A/Nrp-1/Plexina-A1. Para reforçar ainda mais esta hipótese, em 2004 Schwamborn e colegas mostraram a importância da semaforina-3A em estimular a neuritogênese e regulação da expressão gênica em células PC-12. Estes autores mostraram que células PC-12 tratadas com a semaforina-3A recombinante diferenciaram em células semelhantes a neurônios simpáticos. Tal diferenciação foi detectada pela avaliação da atividade de ERK 1/2 aumentada nas células tratadas com a Sema-3A e o controle positivo NGF. Assim, temos mais uma importante relação entre *lipid rafts* e sinalização da Sema-3A/Nrp-1/Plexina-A1, já que tanto os receptores para Sema-3A quanto os para NGF estão localizados nos *lipid rafts* (Moretti *et al.*, 2008, Guirland *et al.*, 2004, Limpert *et al.*, 2007).

Cruzando os dados da literatura, curiosamente podemos observar uma convergência de atividades entre STI1 e a GTPase Rnd1 (Caetano *et al.*, 2008, Moretti *et al.*, 2008, Lopes *et al.*, 2005, Zanata *et al.*, 2002b, Aoki *et al.*, 2000). Tanto uma proteína quanto a outra podem ser relacionadas a regulação da via de sinalização responsável por promover diferenciação celular e neuritogênese. Para justificar a afirmação acima, Carcea e colaboradores (2010) levantaram a hipótese, baseados em dados da literatura, que a internalização de receptores pode ser um mecanismo seletivo de controle à resposta ao estímulo repulsor da Sema-3A em diferentes populações de neurônios corticais. Estes autores demonstraram que axônios de neurônios corticais na ausência (*knock-down*) da proteína Satb2 são mais sensíveis ao estímulo da Sema-3A. Tal sensibilidade estaria a cargo da capacidade de internalização da Sema-3A via *lipid rafts*, independente de dinamina, e da conseqüente ativação da via de regulação do citoesqueleto de LIMK. O silenciamento da expressão da flotilina-1 com o uso de RNA de interferência reduziu significativamente a internalização da Sema-3A com conseqüente redução no colapso do citoesqueleto de cones de crescimento.

Assim, analisados em conjunto, os dados do grupo de Carcea e colaboradores mostram que a internalização de Sema-3A via *lipid rafts* dependente de flotilina-1 gera endossomos tardios que sinalizam para o citoesqueleto via ativação de LIMK, iniciando desta forma a resposta axonal. Curiosamente, em 2002(b), Zanata e colaboradores mostraram que a GTPase RhoD antagoniza os efeitos de outra GTPase, a Rnd1, por competir pelo domínio GAP da plexina-A1. Tal domínio é ativado pela interação Sema-3A/Nrp-1/plexina-A1. Plexina-A1 ativada recruta Rnd1 para seu domínio GAP e induz o colapso de cones de crescimento em neurônios e em células COS-7 (Zanata *et al.*, 2002b). Os eventos intracelulares sugeridos pelos autores citados anteriormente, em 2002, baseados em dados da literatura envolvem um desequilíbrio na atividade de Rac e Rho, que atuam na via de sinalização de LIMK-1 e cofilina-1 para promover a despolimerização do citoesqueleto de actina em cones de crescimento, após estímulo das células com a Sema-3A.

Interessantemente, oito anos depois da publicação dos dados de Zanata e colegas a respeito do mecanismo de sinalização da semaforina-3A via seus ligantes, Carcea e colaboradores sugerem que tal via seria regulada pela internalização de Sema-3A via *lipid rafts*. Em concordância com os dados da literatura expostos até o

momento nesta tese, que mostraram a relevante participação dos *lipid rafts* na regulação da sinalização intracelular, ativando vias de sinalização envolvidas na diferenciação celular e regulação do citoesqueleto, encontramos dados que evidenciam a internalização de STI1, por mecanismo semelhante (Caetano *et al.*, 2008). Neste trabalho, os autores mostraram que a endocitose de STI1 é dependente tanto dos *lipid rafts* como de flotilina-1. Evidenciaram inclusive que tal internalização é independente da proteína príon celular, pois tanto a STI1 recombinante mutante, sem o domínio de interação com PrP^C, quanto a selvagem, em células nocaute para PrP^C, são internalizadas e acumulam-se em endossomos tardios, tal como a Sema-3A.

Apesar da internalização de STI1 ser independente de PrP^C, a ativação da via de ERK 1/2 (Lopes *et al.*, 2005, Chiarini *et al.*, 2002) parece estar associada à endocitose de PrP^C (Caetano *et al.*, 2008) assim como o envolvimento dos *lipid rafts* na atividade de ERK 1/2 (Patra, 2008). Estes dados são de grande importância, pois justificam uma possível atividade biológica para a interação STI1 e a GTPase Rnd1, dando pistas de uma provável participação dos *lipid rafts* como plataforma para a atividade fisiológica promovida pela interação entre estas duas proteínas. Deve-se ressaltar também que uma grande variedade de dados da literatura aponta para uma relevante participação dos *lipid rafts* no desenvolvimento e fisiologia do sistema nervoso (Williamson *et al.*, 2010, Allen *et al.*, 2007, Limpert *et al.*, 2007, Guirland *et al.*, 2004, Foster *et al.*, 2003).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reação de *Western Blot*

As amostras de interesse foram separadas por SDS-PAGE e submetidas à reação de *Western blotting*. Brevemente, as amostras foram eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose durante 40 minutos sob corrente constante 15V em tampão de transferência gelado (39mM de glicina, 48mM de Tris-base, 0,037% de SDS e 20% metanol) para aparato Trans-Blot Semi-Dry (Bio-Rad). As membranas foram então bloqueadas (durante 1 hora à temperatura ambiente) com tampão de bloqueio TBST (120mM de NaCl, 20mM de Tris-base e 0,05% de Tween 20) contendo 5% de leite desnatado liofilizado (Molico, Nestlé). Após bloqueio, as membranas foram então incubadas com os anticorpos primários de interesse, previamente diluídos em tampão de bloqueio.

As reações com os anticorpos primários foram feitas a 4°C por 16 horas sob agitação. As membranas, após cinco lavagens de 3 minutos com TBST foram incubadas com anticorpo secundário adequado conjugado com peroxidase diluído em tampão de bloqueio por 1 hora à temperatura ambiente. Para verificação da presença da banda de interesse, foram feitas nova seqüência de lavagens com TBST para então revelar as membranas com substrato adequado para reação de quimioluminescência (PIERCE) expondo-as a filme radiográfico (Kodak ou Amersham Bioscience) até obtenção de sinal adequado.

3.2 Preparação de extrato total de encéfalos

Encéfalos de camundongos após serem removidos e lavados rapidamente com PBS gelado, foram homogeneizados em tampão de lise (50mM Tris-HCl pH 7,4, 0,2% de deoxicolato de sódio, 0,5% de Triton X-100, 5mM Na₃VO₄, 1mM Naf, 1mM NaPPi e 1mM de PMSF) em tubo Dalce com pistilo de teflon, em ciclos de 30 segundos, seguido de repouso em gelo por 30 minutos. O homogenato foi centrifugado a 9000xg por 30 minutos a 4°C. Após aliquotar as amostras realizou-se reação de Bradford para determinação da concentração de proteínas. As amostras

foram armazenadas a -80°C para posterior utilização para ensaios de *pull-down* e co-imunoprecipitação.

3.3 Preparação de membrana

Encéfalos, cérebro ou cerebelo de camundongos foram obtidos, lavados rapidamente com PBS gelado, pesados e homogeneizados em tampão de sacarose (50mM Tris-HCl pH 7,4, 320mM sacarose, 5mM EDTA, 1mM de PMSF, 5mM Na_3VO_4 , 1mM Naf, 1mM NaPPi) em tubo Dalce com pistilo de teflon. Utilizou-se volume de tampão de lise 5 vezes maior que a massa das amostras (considerando que cada mg equivale a $1\mu\text{L}$). Foram feitos ciclos de homogeneizações de 30 segundos, seguido de repouso em gelo por 10 minutos durante 40 minutos. O homogenato foi centrifugado a $3000\times g$ por 10 minutos a 4°C . Em seguida, o sobrenadante foi coletado e reservado. Obteve-se neste momento o primeiro precipitado, o qual foi novamente homogeneizado em volume igual ao inicial seguido de nova centrifugação nas mesmas condições da primeira. O segundo precipitado foi descartado, enquanto os sobrenadantes da primeira e segunda centrifugação foram combinados. A combinação destes sobrenadantes foi submetida a uma centrifugação de $40000\times g$ por 1 hora a 4°C .

O sedimento da última centrifugação (a preparação de membranas) foi solubilizado em tampão de lise gelado (50mM Tris-HCl pH 7,4, 0,2% de deoxicolato de sódio, 0,5% de Triton X-100, 5mM Na_3VO_4 , 1mM Naf, 1mM NaPPi e 1mM de PMSF) ou tampão TNE para purificação de *lipid rafts* a partir de preparação de membranas. A preparação de membrana teve sua concentração protéica determinada pelo método de Bradford (1976) quando solubilizada em tampão de lise.

3.4 Preparações de estirpes de *E. coli* eletrocompetentes

As estirpes de *E. coli* utilizadas foram preparadas segundo o protocolo descrito por Sambrook et al. (2001). Uma colônia da cepa de interesse crescida em LB-ágar (10 g/L de peptona de soja; 5 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de NaCl e 15 g/L de ágar) acrescido ou não de antibiótico (dependendo da estirpe utilizada) foi inoculada em 5 mL de LB e cultivada por 16 horas a 37°C sob agitação constante de 200rpm (pré-inóculo).

Uma alíquota de 1 mL do pré-inóculo foi utilizado para inocular 100 mL de LB. A cultura foi incubada a 37°C sob agitação até a absorbância 0,4-0,5 a 600nm. Após esse tempo a cultura foi resfriada no gelo por 10 minutos, e as células coletadas por centrifugação a 4000xg por 15 minutos a 4°C. Então o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 200 mL de água ultrapura, estéril e gelada. Em seguida as células foram coletadas por centrifugação nas mesmas condições anteriores. As células foram ressuspensas em 100 mL de solução de glicerol 10% (v:v) estéril gelada. A suspensão celular foi novamente centrifugada a 4000xg por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. O sedimento bacteriano foi ressuspensado em 240 µL de glicerol 10% estéril e gelado. Alíquotas de 40µL desta suspensão bacteriana foram feitas e armazenadas a -80°C.

3.5 Purificações dos plasmídeos

3.5.1 Pequena escala (miniprep) dos vetores: pGEX 4T-2, pGEX4T2-Rnd1, pGEX4T2-Rnd2, pGEX4T2-RhoD, pGEX4T2-RhoG, pTRC-STI1 (Zanata et al, 2002a) contendo os fragmentos dos genes para as proteínas de interesse

Os vetores pGEX 4T-2 , vazio e contendo os insertos para as GTPases de baixa massa molecular Rnd1, Rnd2, RhoD e RhoG foram gentilmente cedidos pelo Dr. Andreas W. Püschel do Max-Planck-Institute for Brain Research, Frankfurt-Alemanha.

Bactérias eletrocompetentes da estirpe DH5 α foram transformadas com os vetores de interesse (pGEX 4T-2, pGEX4T2-Rnd1, pGEX4T2-Rnd2, pGEX4T2-RhoD, pGEX4T2-RhoG ou pTRC-STI1) com pulso de 1,4 kV em eletroporador (BioRad). As bactérias, após transformação, foram recuperadas em 1mL de meio LB (10g/L peptona de soja, 5g/L de extrato de levedura e 10g/L de NaCl) ou 2XYT (16g/L de peptona de caseína, 10g/L de extrato de levedura, 5g/L de NaCl) para os vetores do sistema pGEX 4T2 sem antibiótico por 1 hora a 37°C em estufa. Após 1 hora alíquotas de 10, 20, 50 e 100 μ L da suspensão de bactérias foram plaqueadas em meio sólido LB-ágar (10g/L de peptona de soja; 5g/L de extrato de levedura e 10g/L de NaCl e 15g/L de ágar) acrescido do antibiótico ampicilina (100 μ g/mL) e crescidas por 16 horas a 37°C em estufa.

Para inocular em 5mL de meio LB líquido acrescido de antibiótico, foram escolhidas colônias diferentes e isoladas, as quais foram cultivadas por 16 horas a 37°C sob agitação constante (agitador Certomat-BS1). Centrifugou-se 3mL da cultura saturada a 12000xg por 1 minuto para obtenção de um sedimento de células. Já as bactérias DH5 α transformadas com os vetores do sistema pGEX-4T-2 (Pharmacia) contendo os insertos para as GTPases foram crescidas em meio 2xyTA contendo e 100 μ g/mL de ampicilina, nas mesmas condições. Centrifugando-se 3mL da cultura saturada a por 12000xg 1 minuto para obtenção do um sedimento de células. Procedeu-se, então, a produção das purificações em pequena escala de acordo com o protocolo do Kit Eppendorff (FastPlasmidTM Mini, Hamburg-Alemanha) para Minipreparações tanto para pTRC-STI1 quanto para pGEX 4T2.

3.5.2 Larga escala (maxiprep) dos vetores: pBK-myr-myc-Plexina-A1 (Rhom *et al*, 2000b), pEGFP-Rnd1 (Rhom *et al*, 2000b) e pEGFP-STI1 (Zanata *et al*, 2002a)

Todo o protocolo para transformação das bactérias eletrocompetentes e obtenção das culturas de bactérias foi realizado como descrito no item 5.1. As purificações foram realizadas como descrito pelo protocolo do Kit da QIAGEN para purificação em larga escala de plasmídios (QIAGEN Plasmid Maxi Kit – QIAGEN).

3.6 Expressão e purificação de proteínas recombinantes

3.6.1 Expressão e purificação da proteína recombinante ϵ His-STI1

Bactérias eletrocompetentes da estirpe DH5 α foram transformadas por eletroporação com o vetor pTrc-A-His (Invitrogen) contendo o inserto para a proteína STI1 de camundongo (Zanata et al., 2002a). Após a eletroporação as bactérias foram recuperadas em 1mL de meio LB (extrato de levedura 5%, peptona 1%, NaCl 1%, pH7,4) sem antibiótico e então incubadas por 1 hora a 37°C em estufa. Após 1 hora, as bactérias foram plaqueadas em meio LB/Agar contendo 100 μ g/mL de ampicilina.

Colônias que cresceram no meio sólido foram selecionadas (8) desde que estivessem isoladas e inoculadas em 5mL do em meio LB acrescido de 100 μ g/mL de ampicilina. As culturas foram obtidas após 16 horas de incubação a 37°C sob agitação. A cultura saturada foi diluída 1:100 em 10mL de meio LB e incubadas a 37°C sob agitação constante até atingirem a absorbância de 0,5-0,6 a 600nm. Após atingirem a absorbância desejada coletou-se 1mL para controle não-induzido da expressão e adicionou-se IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo) na concentração final de 1mM para a indução da expressão da proteína recombinante por 4 horas a 30°C. Amostras das culturas induzidas e não induzidas foram separadas em SDS-PAGE e o gel corado com azul de *Coomassie*. Após análise dos géis, o clone com maior expressão foi selecionado e utilizado para a expressão em larga escala.

Pré-inóculo de meio LB (50mL) foi inoculado com o clone de interesse e incubado por 16 horas a 37°C sob agitação. Diluição de 1:100 da cultura saturada foi feita em meio LB novo e quando as culturas bacterianas atingiram absorbância entre 0,5-0,6 a expressão da proteína recombinante foi induzida com a adição de IPTG na concentração final de 1mM por 4 horas a 30°C.

Após as 4 horas de indução as bactérias foram lisadas em tampão de lise (NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 300mM, imidazol 10mM e Tris-HCl pH 8,0 20mM acrescido de PMSF 2mM) gelado em prensa de French (1000psi).

Após a lise, realizou-se centrifugação do lisado a 9000xg a 4°C por 30 minutos para clareamento. A purificação da proteína recombinante foi feita por IMAC

com resina de Ni-NTA agarose (Qiagen) previamente equilibrada em tampão de lise. A proteína foi devidamente expressa e purificada e amostras das etapas da purificação foram resolvidas em SDS-PAGE 10% e o gel corado com azul de comassie.

A proteína recombinante foi dialisada contra PBS e sua concentração determinada pelo método de Bradford (1976). Alíquotas da proteína ₆His-STI1 purificada foram estocadas a -80°C.

3.6.2 Expressão e purificação da proteína recombinante GST-Rnd1

As expressões em pequena escala foram realizadas como descrito no item 6.1 com diferenças restritas à estirpe de bactéria utilizada e ao meio de cultura.

Bactérias BL21 (DE3) pLysS foram previamente transformadas com o vetor pGEX-4T-2 (Pharmacia) contendo o inserto Rnd1 e plaqueadas em meio 2XYT/Agar acrescido de 34µg/mL de clorafenicol e 100µg/mL de ampicilina. O clone com melhor expressão, observada a partir da expressão em pequena escala foi inoculado em 50mL de meio 2XYT-A (16g/L de peptona de caseína, 10g/L de extrato de levedura, 5g/L de NaCl) contendo 34µg/mL de clorafenicol e 100µg/mL de ampicilina, a 37°C por 16 horas.

Diluição de 1:100 da cultura saturada foi feita em 400mL de meio 2XYT-A novo. Quando as culturas bacterianas atingiram absorbância entre 0,5-0,6 em 600nm, a expressão da proteína recombinante foi induzida com a adição de 0,1mM de IPTG (isopropil-β-D-thiogalactopiranosídio) por 2 horas a 30 °C sob agitação.

Após as 2 horas, as bactérias foram então sedimentadas por centrifugação a 4000xg por 30 minutos a 4°C. O precipitado foi ressuspenso em tampão de lise nativo gelado (PBS acrescido de 1mM PMSF – fenilmetil-sulfonil fluoreto), em banho de gelo e em seguida feita a lise mecânica (1000psi) em prensa de French. Adicionou-se ao lisado o detergente Triton X-100 na concentração final de 1% e os mesmos foram incubados por 30 minutos, sob agitação, a 4°C. Em seguida, realizou-se centrifugação do lisado a 9000xg a 4°C por 30 minutos para clareamento.

A purificação da proteína foi feita incubando 600µL da matriz cromatográfica de glutathiona-Sepharose 4B (Pharmacia, Biotech) previamente equilibrada com PBS e 1% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) e o lisado da cultura de *E coli* BL21 (DE3) pLys S induzida.

Em seguida recuperou-se a matriz por centrifugação a 800xg e realizou-se seqüência de seis lavagens com PBS gelado. A proteína ligada na resina de glutathiona-Sepharose foi eluída com tampão de glutathiona reduzida (10mM de glutathiona reduzida em 50mM de Trisi-HCl pH 8,0) em cinco frações de 1mL.

As três primeiras frações foram combinadas em uma e as duas últimas em outra. As frações alíquotadas foram dialisadas contra 6L de PBS a 4°C para a retirada da glutathiona livre. A proteína GST-Rnd1 dializada foi separada em SDS-PAGE 10% e corado com *Coomassie* para verificação da presença da banda de aproximadamente 56 kDa. A concentração protéica após diálise foi medida pelo método de Bradford (1976).

Bactérias DH5α foram transformadas com o vetor pGEX4T2 vazio. O mesmo protocolo descrito acima para expressar e purificar GST-Rnd1 foi utilizado para expressar e purificar a proteína GST com o propósito de produzir o anticorpo policlonal anti-GST e ter a proteína devidamente purificada para usar como controle nos ensaios bioquímicos.

3.7 Produção dos anticorpos policlonais anti-GST, anti-STI1 e anti-Rnd1

Para a produção do anticorpo policlonal, coelhos da raça neozelandesa foram imunizados como descrito por Harlow e Lane (1998) com pequena modificação. Brevemente, foi feita a coleta de soro pré-imune dos animais para serem utilizados como controle negativo nos ensaios realizados com os anticorpos produzidos. Foi utilizado para a primeira imunização (vias intramuscular e subcutânea) 500µg da proteína recombinante de interesse, devidamente purificada e emulsificada com adjuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich) e 1mg de hidróxido de alumínio.

As imunizações seguintes foram conduzidas a cada 30 dias com 250µg da proteína recombinante emulsificada com o adjuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich) e 1mg de hidróxido de alumínio.

Após coleta do sangue, o mesmo foi mantido em estufa a 37°C por 1 hora para retração do coágulo. O soro foi então separado do coágulo por centrifugação a 2000xg por 10 minutos a 4 °C, sendo em seguida coletado, identificado e estocado a -20 °C. Os anticorpos produzidos foram testados contra extratos de encéfalos, extratos celulares (N2a) e proteína recombinante purificada (GST) por *Western blot*.

3.8 Purificação de IgGs

Após coleta e teste da especificidade dos anticorpos anti-Rnd1 e anti-STI1 os soros hiperimunes foram usados para a purificação de imunoglobulinas do tipo IgG. Para controle negativo de eventuais ensaios o soro não imune de coelho também foi utilizado para a purificação de IgG. Portanto, será descrito o protocolo geral usado para todas as amostras de soro.

Misturou-se 3,5mL de soro com 3,5mL de uma solução contendo 100mM Tris-HCl pH 7,8 (concentração final 50mM) gelada e previamente filtrada em filtro de 0,45µm. Incubou-se a mistura do soro mais o tampão Tris-HCl por 16 horas a 4°C com a resina de proteína A Sepharose, previamente equilibrada com o tampão 50mM Tris-HCl pH 7,8. Em seguida, a resina foi lavada com 100mL de 50mM Tris-HCl pH 7.8.

As IgGs foram eluídas da coluna com solução de 0,1M de glicina pH 3. As frações eluídas foram coletadas em tubos de 1,5mL contendo 100µL de uma solução de Tris 1M pH 9.0, com o propósito de neutralizar o pH da glicina e evitar a degradação das IgGs. Foram feitas alíquotas de 1mL. Após as coletas as frações foram dialisadas contra 6L de PBS gelado. Após a diálise a concentração protéica foi determinada por leitura da absorbância a 280nm.

A resina foi lavada com 50mL de 50mM Tris-HCl pH 7.8 seguido de 50mL de uréia 3M. Na seqüência lavou-se a resina com mais 50mL de 50mM Tris-HCl pH 7.8 e em seguida com solução de 0,1% Triton X-100 por exatamente 1 minuto, passando-se em seguida para nova lavagem com 100mL de 50mM Tris-HCl pH 7.8 e por fim uma lavagem com uma solução de 20% de etanol, solução na qual a resina é estocada. Este protocolo foi aplicado antes de cada uma das purificações de IgG realizadas.

Após a purificação as IgGs hiperimune purificadas foram testadas por *Western blot* contra extrato total de encéfalos de camundongos para STI1 e preparação de membranas para a Rnd1.

3.9 Ensaio de bloqueio

O ensaio de bloqueio foi realizado incubando-se o anticorpo de interesse por 1 hora a 4°C com 100µg de proteína recombinante. Após o bloqueio do anticorpo, o mesmo foi utilizado para reação de *Western blot*.

3.10 Ligação covalente do anticorpo anti-STI1 em resina de proteína-A Sepharose

O acoplamento de Ig em matriz de proteína-A Sepharose foi feita como descrito por Harlow e Lane (1998) com ligeiras modificações. Brevemente, 100µL da resina de proteína-A Sepharose foi equilibrada em PBS gelado. A IgG purificada (0,2mg) foi incubada com a resina por 2 horas a 4°C sob agitação orbital. A resina foi centrifugada por 5 minutos a 3000xg a 4°C e a solução descartada. Ressuspendeu-se a resina em 1mL de tampão borato de sódio 0,2M pH 9.0 seguido de centrifugação da resina a 3000xg a 4°C por 5 minutos. Nova lavagem foi realizada e coletou-se 10µL da resina para controle não ligado de IgG.

Para promover a reação de ligação covalente da IgG na resina a mesma foi incubada com o borato de sódio pH 9.0 acrescido de DMP (dimetil pimelimidato – PIERCE) 20mM por 16 horas a 4°C sob agitação orbital. Coletou-se 10µL da resina para controle ligado de IgG. A reação de ligação foi parada lavando-se a resina com 0,2M de etanolamina (Sigma-Aldrich) pH 8.0 e em seguida incubando-se a resina com 0,2M de etanolamina (Sigma-Aldrich) pH 8.0 por 4 horas a 4°C sob agitação. Para remover qualquer IgG ligada na resina de forma não covalente, a mesma foi lavada 3 vezes com solução de 100mM de glicina pH 3.0 seguido de 3 lavagens com PBS. A resina com os anticorpos covalentemente ligados foram estocadas em PBS acrescido de 0,01% de timerosol (Sigma-Aldrich) a 4°C até momento do uso.

3.11 Expressão em larga escala das proteínas GST-Rnd1, GST-Rnd2, GST-RhoG, GST-RhoD e GST para ensaios de *pull-down*

3.11.1 Expressões das proteínas de interesse em pequena escala

Bactérias eletrecompetentes da estirpe BL21 (DE3)pLysS (Invitrogen) foram transformadas com aproximadamente 25ng do vetor contendo o inserto de interesse. Após a eletroporação as bactérias foram recuperadas em 1mL de meio 2XYT sem antibiótico e então incubadas por 1 hora a 37°C em estufa. Em seguida as bactérias foram plaqueadas em meio 2XYT/Agar contendo 34µg/mL de clorafenicol e 100µg/mL de ampicilina.

Colônias (oito) que cresceram no meio sólido foram selecionadas desde que estivessem isoladas e inoculadas em 5mL do em meio 2XYT-A (contendo 34µg/mL de clorafenicol e 100µg/mL de ampicilina). As culturas foram obtidas após 16 horas de incubação a 37°C sob agitação. A cultura saturada foi diluída 1:100 em 10mL de meio 2XYT-A e incubadas a 37°C sob agitação constante até atingirem a absorbância de 0,5-0,6 a 600nm. Após atingirem a absorbância desejada coletou-se 1mL para controle não-induzido da expressão e adicionou-se IPTG na concentração final de 0,1mM para a indução da expressão da proteína recombinante.

As culturas induzidas e não-induzidas foram incubadas por 2h a 30°C sob agitação constante. Após final das 2h coletou-se 1mL das culturas induzidas e juntamente com as culturas não-induzidas realizou-se centrifugação por 5 minutos a 4000xg, seguido de descarte do meio de cultura. O sedimento de células foi ressuspenso em 100µL de tampão de amostra redutor (62mM Tris-HCl pH 6.8, 2% de SDS, 40% de glicerol, 0,2% de azul de bromofenol e 200mM de β-mercaptoetanol) e fervido por 20 minutos a 100°C e 30µL de cada amostra foi submetida a SDS-PAGE e o gel corado em seguida com azul de *Coomassie* para posterior análise das colônias com melhor expressão.

Diversas construções foram utilizadas para expressar as diferentes GTPases. Foi necessário padronizar as expressões para cada proteína, como descrito na tabela 1, pois a eficiência da expressão com o protocolo básico, descrito acima, aplicado nas expressões em pequena escala mostrou-se ineficiente.

As padronizações envolveram a análise de curva de concentração de IPTG e curva de tempo de indução, após escolher colônia proveniente de expressão em pequena escala. Após padronização escolheu-se as condições descritas na tabela 1 para as expressões em larga escala.

Condições de expressão das proteínas recombinantes	GST	RhoG	RhoD	Rnd2	Rnd1
Temperatura de crescimento das culturas	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C
Concentração de IPTG	0,1mM	0,4mM	0,4mM	0,1mM	0,1mM
Temperatura de indução	30°C	30°C	30°C	30°C	30°C
Tempo de indução	2h	2h	4h	2h	2h

Tabela 1.

3.12 Expressões das proteínas de interesse em larga escala para ensaio de *pulldown*

Os clones com maiores taxas de expressão das proteínas recombinantes (tabela 1) foram utilizados para expressões em larga escala.

Pré-inóculos de 50mL de meio 2XYT-A foram feitos para cada clone de construções distintas (as expressões não foram feitas em paralelo, mas uma de cada vez, entretanto serão descritas juntas). Os inóculos foram incubados por 16 horas a 37°C sob agitação. Ao final das 16h, foram diluídos 1:100 em 400mL do meio 2XYT-A novo e incubados a 37°C até atingirem absorvância entre 0,5-0,6 a 600nm. Após alcançarem a absorvância desejada, as culturas foram induzidas a expressar as proteínas recombinantes de interesse como descrito na tabela 1.

Após indução, as culturas foram centrifugadas a 4000xg por 20 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos celulares ressuspensos em tampão de lise gelado (PBS: 140mM NaCl; 2,7mM KCl; 10mM Na₂HPO₄; 1,8mM KH₂PO₄ acrescido de 2mM MgCl₂, 2mM DTT (PlusOne), 1mM PMSF e 10% de glicerol). A suspensão de células foi então lisada em prensa de French (1000 psi) e em seguida adicionou-se ao lisado Triton X-100 (Sigma-Aldrich)

na concentração final de 1%. Os lisados foram então incubados por 30 minutos a temperatura ambiente sob agitação. Em seguida, foram submetidos à centrifugação por 20 minutos a 9000xg a 4°C com o propósito de clarear as amostras. Recuperou-se o sobrenadante das amostras e foram feitas alíquotas de 1mL que em seguida foram estocadas a -80°C até o momento do uso.

3.13 Co-imunoprecipitação

Para o ensaio de co-imunoprecipitação foram utilizados 500µg de extrato total de encéfalos de camundongos adultos (item 2). Para clareamento das amostras o extrato de encéfalo foi incubado por 1 hora a 4°C com 20µL da resina de proteína-A Sepharose previamente equilibrada em tampão de lise (item 2). Após este período as amostras foram centrifugadas a 3000xg e o sobrenadante transferido para novo tubo de 1,5mL. A imunoprecipitação foi realizada com o anticorpo anti-STI1 covalentemente ligado na resina de proteína-A Sepharose e como controle negativo usou-se a IgG não imune também ligada covalentemente à resina. Utilizou-se 20 µL de cada resina contendo as IgGs não imune e anti-STI1 ligadas. As amostras foram incubadas por 2 horas a 4°C sob agitação orbital.

Após o período de incubação da reação de imunoprecipitação as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 2000xg e o sobrenadante descartado. As resinas contendo os imunocomplexos foram lavadas 4 vezes com o tampão de lise utilizados neste ensaio. Após centrifugação de 3000xg removeu-se totalmente o tampão de lise e adicionou-se 30µL de tampão de amostra redutor. As amostras foram fervidas por 5 minutos em placa aquecedora a 100°C. As amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 8000xg e as amostras aplicadas em SDS-PAGE 12%. Em seguida realizou-se eletrotransferência das proteínas para membrana de nitrocelulose e reação de *Western blot* (como descrito no ítem 1) com o anticorpo anti-STI1 (1:3000) e anti-Rnd1 (1:800).

3.14 Ensaio de *pull-down*

Os ensaios de *pull-down* foram realizados como descrito por Rohm et al, 2000 e Zanata et al, 2002b. Para tanto, 30µL da matriz de glutathiona-Sepharose 4B (Amersham-Biosciences) previamente equilibrada com tampão de ligação (25mM NaCl, 20mM Tris-HCl pH 7.4, 0,1mM DTT) foi incubada por 1 hora a 4°C sob agitação orbital com as proteínas recombinantes GST-Rnd1, GST-Rnd2, GST-RhoD e GST-RhoG. Após etapa de ligação das proteínas recombinantes nas resinas uma seqüência de cinco lavagens com tampão de ligação foi realizada.

As GTPases GST-RhoD e GST-RhoG foram previamente ligadas à GTPyS (Sigma-Aldrich), uma forma não hidrolizável do GTP. O GTPyS (concentração final de 10mM) foi preparado em tampão de ligação acrescido de 5mM EDTA e incubado com as proteínas GST-RhoG e GST-RhoD previamente ligadas na resina de glutathiona-Sepharose 4B. As recombinantes foram incubadas com o GTPyS por 30 minutos a 30°C e a reação bloqueada com 0,1mM de MgCl₂.

As resinas contendo as proteínas de interesse ligadas foram incubadas com os extratos de encéfalos (200µg) de camundongos adultos e embrionários (E17), por 2h a 4°C. Em seguida, as resinas foram lavadas cinco vezes com tampão de lavagem (50mM Tris-HCL ph 7.4; 150mM NaCl; 1mM DTT; 1,5mM MgCl₂; 5mM EDTA; 10% glicerol; 0,1% Triton-X100). Outro controle utilizado, além de GST-glutathiona-sepharose, foi a incubação das diversas amostras apenas com a resina de glutathiona-Sepharose 4B.

Após seqüência de lavagens centrifugou-se as resinas a 200xg, descartando-se todo o tampão de lavagem. As resinas foram ressuspendidas em 40µL de tampão de amostra redutor e fervidas por 5 minutos a 100°C em placa aquecedora. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 3000xg por 10 minutos e as proteínas eluídas foram separadas em SDS-PAGE 12%, seguido de eletrotransferência das proteínas para membrana de nitrocelulose e reação de *Western blot* (como descrito no item 1) com o anticorpo anti-STI1 (1:3000) e anti-GST (1:2000).

3.15 Ensaio de ligação

Este ensaio foi realizado como descrito por Costa e colaboradores (2009). Brevemente, 1 μ g de BSA, GST e GST-Rnd1 foram previamente adsorvidas em placa de poliestireno de 96 poços por 2 horas a temperatura ambiente (T.A.). Em seguida os sítios inespecíficos foram bloqueados com BSA 1% por 2 h (T.A.). Diferentes concentrações de 6 His-STI1 foram adicionadas aos poços e incubadas por 16 horas a 37°C. Após série de lavagens com PBS foi adicionado o anticorpo anti-STI1 (1:3000) por 2 horas a T.A. seguido de reação com o secundário anti-coelho-HRP (1:4000, KPL) por 1 hora a T.A.. A reação foi revelada com o substrato o-fenilenediamina (OPD)/peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A leitura da absorbância foi feita a 490nm e a análise estatística feita com o programa Prisma (ANOVA com pós-teste de Bonferroni, * significa diferença estatística para p<0,05 em relação ao controle GST).

3.16 Ensaios de neuritogênese em células PC-12, N2a e SHSY-5Y

As células PC-12, N2a e SHSY-5Y (3x10⁴ células) foram cultivadas em meio RPMI (GIBCO) e DEMEM (GIBCO) respectivamente. As células foram plaqueadas sobre lamínulas de vidro com 24 horas de antecedência e cotransfectadas, exceto as células transfectadas com o vetor vazio (pEGFP), com os vetores de interesse (GFP/GFP-Rnd1, GFP/GFP-STI1 e GFP-STI1/GFP-Rnd1), com a mesma massa total de DNA com o reagente Lipofectamina 2000 (Invitrogen) como descrito pelo fabricante.

Após 72 horas de cultivo das células transfectadas, as células foram fixadas por 15 minutos em vapor de formaldeído 3,7% seguido de substituição do meio de cultura por paraformaldeído 4% por mais 15 minutos, sendo as duas etapas realizadas a temperatura ambiente. Após etapa de fixação, as células foram lavadas 3 vezes com PBS, permeabilizadas com PBS acrescido de 0,05% de Triton X-100 e marcadas com faloidina-FITC (Invitrogen), de acordo com o protocolo do fabricante para a quantificação da extensão de neuritos (Schwamborn et al, 2004). Os núcleos foram marcados com DAPI. As lamínulas foram montadas com meio de montagem (Fluorescent Mounting Medium - Dako).

Foram capturados 10 campos aleatórios para cada condição experimental em objetiva de 20x em microscópio de fluorescência Olympus. Foram contadas de 300 a 600 células por condição experimental com o auxílio do programa ImageJ. As análises morfométricas foram realizadas como descrito por Lopes e colaboradores (2005). Brevemente, Percentual de células com neuritos (número de células com neuritos de qualquer tamanho dividido pelo número total de células), número de neuritos por célula (número total de neuritos dividido pelo número de células com neuritos), comprimento médio dos neuritos por célula (comprimento total dos neuritos dividido pelo número de células com neuritos), percentual de células com neuritos maiores que 70 ou 100 μ m (número total de células com neuritos maiores que 70 ou 100 μ m divididos pelo número total de células). Foram contadas aproximadamente 400 a 600 células por condição experimental. A análise estatística feita com o programa Prisma aplicando-se o teste ANOVA com pós-teste de Tukey.

3.17 Ensaios de diferenciação celular em PC-12

Células PC-12 (5×10^4) foram plaqueadas, cultivadas e transfectadas como descrito no item 13. Após 72 horas de cultivo as células foram lisadas em tampão de lise gelado (50mM Tris-HCl pH 7,4, 0,2% deoxicolato de sódio, 0,5% de Triton X-100, 1mM PMSF, 1mM Na₃VO₄, 1mM Naf, 1mM NaPPi) e processadas como descrito no item 1. Como controle positivo neste ensaio utilizou-se células PC-12 diferenciadas com 100ng/mL de NGF (Sigma-Aldrich) por 72 horas e como controle negativo células cultivadas nas mesmas condições experimentais e não transfectadas.

Após determinação da concentração protéica das amostras, 200 μ g de extrato total foi utilizado para ensaio de imunoprecipitação da forma fosforilada (ativa) das proteínas ERK 1/2. Para tanto se utilizou o anticorpo contra a forma ativa da proteína ERK 1/2 covalentemente ligado á resina de hidrazida-agarose (Cell Signaling), previamente equilibrado com tampão de lise. As amostras foram incubadas por 2 horas a 4°C sob agitação orbital, seguido de 4 lavagens com tampão de lise. As resinas foram recuperadas após centrifugação por 5 minutos a 3000xg e total descarte do tampão de lise. As resinas foram fervidas por 5 minutos em 30 μ L de tampão de amostra redutor, centrifugadas por 5 minutos a 3000xg e as amostras eluídas separadas em SDS-PAGE 12%.

3.18 Ensaios de colapso do citoesqueleto em células COS-7

Os ensaios de colapso de citoesqueleto foram realizados como descrito por Zanata e colaboradores (2002b). Brevemente, 3×10^4 células COS-7 foram plaqueadas sobre lamínulas de vidro e cultivadas por 24h em estufa de CO₂. As células foram transfectadas com os vetores de interesse Myr-myc-PlexA1cit, EGFP-Rnd1 e EGFP-STI1 (Zanata et al, 2002b e Zanata et al, 2002a respectivamente) como descrito pelo fabricante da Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Após 48 horas da transfecção as células foram fixadas por 15 minutos em vapor de formaldeído 3,7% seguido de substituição do meio de cultura por paraformaldeído 4% por mais 15 minutos, sendo as duas etapas realizadas a temperatura ambiente. Após etapa de fixação as células foram lavadas 3 vezes com PBS e permeabilizadas com PBS acrescido de 0,05% de Triton X-100, marcadas com faloidina-FITC (Invitrogen) como descrito pelo fabricante seguida de marcação dos núcleos com DAPI. As lamínulas foram montadas com meio de montagem (Fluorescent Mounting Medium - Dako).

Foram capturados 10 campos aleatórios para cada condição experimental em objetiva de 20x em microscópio de fluorescência Olympus. Foram contadas de 600 a 800 células por condição experimental com o auxílio do programa ImageJ. O percentual de células colapsadas foi analisado como descrito por Takahashi e colaboradores (1999). Os resultados são representativos de pelo menos oito ensaios independentes. A análise estatística feita com o programa Prisma aplicando-se o teste de ANOVA e pós-teste de Tukey.

3.19 Purificação dos *lipid rafts*

A padronização da técnica de purificação de *lipid rafts* no laboratório foi feita exatamente como descrita por Keshet e colaboradores (2000). Brevemente, amostras de tecido (100mg) (cérebro e cerebelo de camundongos adultos e embriões com 17 dias de desenvolvimento - E17) ou células PC-12 foram homogeneizadas em 700µL de tampão TNE gelado (NaCl 150mM, Tris-HCl 25mM pH 7.5, EDTA 5mM e Triton X-100 1% acrescido de coquetel de inibidores de proteases(Roche) e inibidores de fosfatases: 5mM Na₃VO₄, 1mM Naf, 1mM NaPPi) incubadas por 30 minutos em banho de gelo. O lisado foi centrifugado por 5 minutos

a 500xg a 4°C e o sobrenadante coletado. Em seguida a amostra foi misturada com igual volume de uma solução de 70% Nycodenz AG (Axis-Shield) (m:v) em tampão TNE e colocado em tubo de ultracentrífuga. Sobre este lisado montou-se um gradiente linear de Nycodenz de 8 a 35% (200µL de cada etapa do gradiente: 35; 25; 22,5; 20; 18; 15; 12 e 8%). A amostra foi ultracentrifugada por 4 horas a 4°C a 300000xg em rotor sem ângulo fixo (P50S2 – Centrifuga Hitach). Treze frações de 180 µL foram coletadas do topo até o fundo do tubo. Amostras (15µL) de cada uma das frações coletadas foram separadas em SDS-PAGE e analisadas por reações de *Western blot* para a proteína PrP^C que é uma proteína GPI ancorada na membrana plasmática e residente de *lipid rafts* (Keshet et al, 2000).

Os *lipid rafts* purificados a partir de amostras de cérebro e cerebelo de camundongos foram imunodetectados com anticorpo anti-PrPc nas frações 3 a 6 de cérebro e 3 a 5 de cerebelo. Assim, ficou padronizado que as frações 3 a 6 seriam sempre combinadas e consideradas como *lipid rafts* e as frações 9 a 12 seriam combinadas e consideradas frações solúveis em Triton X-100 a 4°C.

3.20 Purificação dos *lipid rafts* a partir de células PC-12 biotiniladas na superfície celular

Células PC-12 ($2,5 \times 10^7$ células) foram biotiniladas com descrito pelo protocolo do fabricante do reagente EZ-Link-Sulfo-NHS-Biotin (PIERCE). Brevemente, as células foram lavadas 3 vezes com PBS pH 8.0 gelado com o propósito de remover componentes do meio de cultura que possuam aminas livres e proteínas provenientes das células. As células foram soltas incubando-se as células com solução de PBS-EDTA por 10 minutos em estufa de CO₂. As células soltas foram incubadas a 4°C com o reagente para biotinilação na concentração final de 10mM preparado em PBS pH 8.0. As células foram incubadas a 4°C por 45 minutos para evitar internalização ativa de proteínas de membrana biotiniladas. Para bloqueio das biotinas livres as células foram lavadas 3 vezes com PBS pH 8.0 acrescido de 100mM de glicina. Após bloqueio as células foram sedimentadas por centrifugação a 1000xg e em seguida as células foram utilizadas para a purificação de *lipid rafts*.

Para os ensaios de análise e caracterização da presença da proteína STI1 nos *lipid rafts* foi utilizado também células PC-12 tratadas com a droga M β CD (metil- β -ciclodextrina) na concentração final de 20mM. As células foram tratadas ou não tratadas por 20 minutos em estufa de CO₂ em solução com a droga logo após a biotinição para promover a desorganização dos *lipid rafts* por extração de colesterol da membrana. Em seguida as células eram utilizadas para a purificação dos *lipid rafts*.

3.21 Ensaios de *pull-down* a partir de purificação de *lipid rafts* de células PC-12 biotiniladas na superfície celular

Após a purificação dos *lipid rafts* das células PC-12 biotiniladas, as frações correspondentes aos rafts (frações de 3 a 6) e frações solúveis (9 a 12) foram combinadas (20 μ L de cada fração e as amostras foram combinadas em tampão de lise TNE acrescido de 1% de deoxicolato de sódio e incubadas a 4°C por 20 minutos sob agitação para promover a solubilização dos *lipid rafts*.

Após a solubilização dos rafts as amostras foram combinadas com 20 μ L da resina de avidina-agarose (PIERCE) previamente equilibrada com o tampão TNE-deoxicolato de sódio por 30 minutos a 4°C sob agitação orbital. As amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 2000xg e os sobrenadantes foram descartados. As resinas foram lavadas 4 vezes com o tampão de lise e centrifugadas por 5 minutos a 3000xg para recuperação das resinas após descartar totalmente o tampão TNE. As resinas foram fervidas por 5 minutos a 100°C em placa aquecedora em 30 μ L de tampão de amostra redutor. As proteínas eluídas foram separadas em SDS-PAGE 10%, seguido de eletrotransferência das proteínas para membrana de nitrocelulose e reação de *Western blot* (como descrito no ítem 1) com o reagente Extravidina-HRP (PIERCE) e os anticorpos anti-STI1 (1:3000) e anti-PrPc (1:1000).

3.22 Espectrometria de massa (MALDI-TOF) e identificação de proteínas por PMF (*Peptide Mass Fingerprinting*)

As amostras das frações correspondentes aos *lipid rafts* e frações solúveis de membrana foram separadas em SDS-PAGE gradiente de 5 a 20% e o gel corado com *Coomassie* coloidal (Sigma-Aldrich). Brevemente, o gel foi fixado por 1 hora com solução fixadora (1,3% ácido orto-fosfórico (Merck), 20% metanol (Merck)) e corado por 16 horas com solução contendo *Coomassie* 2,5% G-250 (Biorad) em 2% de ácido orto-fosfórico e 10% sulfato de amônio.

Na etapa seguinte, transferiu-se o gel para tampão de neutralização (0,1M Tris-base pH 6,5 ajustado com ácido orto-fosfórico (Merck)) por 3 minutos, lavando-se o gel com 25% metanol em seguida. O gel foi descorado com água ultra-pura e mantido em solução estabilizante (0,2% sulfato de amônio (Sigma-Aldrich)). As bandas de interesse do gel foram retiradas, recortadas em fragmentos menores e descoradas em solução contendo 50% acetonitrila (Carlo Erba – Grau HPLC) e 25mM bicarbonato de amônio (Sigma-Aldrich), até que os fragmentos das bandas estivessem transparentes.

Os fragmentos das bandas removidas do gel foram desidratados com 100 μ L de acetonitrila 100% e secos em concentrador rotatório (Speed Vac) por 20 minutos a 35°C. Após esta etapa as proteínas foram tratadas por 45 minutos a 56°C com solução contendo 1mM de DTT (PlusOne – Amersham-Bioscience) e 25mM de bicarbonato de amônio (Sigma-Aldrich), seguido de desidratação com acetonitrila. Em seguida, as amostras foram alquiladas com solução contendo 55mM de iodoacetamida (Sigma-Aldrich) e 25mM de bicarbonato de amônio por 30 minutos à temperaturam ambiente e protegidas da luz (Fiaschi et al, 2006, Shevchenko et al, 1996). O tratamento das amostras com DTT e iodoacetamida visa à redução das proteínas e evitar a reoxidação das mesmas, respectivamente (Mayr, et al, 2005, Shevchenko et al, 1996). Os fragmentos foram novamente desidratados como descrito anteriormente, e as amostras utilizadas para a digestão triptica das proteínas imobilizadas nos géis.

Para a digestão *in gel* das bandas de interesse, foi utilizado 12ng/ μ L de tripsina (Sequencing Grade Modified Trypsin - Promega) em tampão contendo 40mM NH₄HCO₃ (Sigma-Aldrich) e 10% acetonitrila. A digestão foi feita por 16 horas a 37° C. Foram feitas três extrações com o tampão de extração (5% ácido

trifluoroacético (TFA - Sigma), 50% acetonitrila), recuperando-se os peptídeos em novo microtubo de 500 μ L. As amostras foram desidratadas em Speed-vac por 2 horas. Os peptídeos foram então ressuspensos em 2 μ L de solução 0,1% TFA.

Os fragmentos da digestão triptica foram misturados com tampão contendo a matriz (0,1% TFA e ácido α -ciano-hidroxicinamínico - Sigma) para espectrometria de massa na proporção 1:1 e aplicados em placa para MALDI (scout MTP MALDI ion source 384 target – Bruker Daltonics, GmbH). A análise por espectrometria de massa foi realizada em equipamento Ultraflex MALDI-TOF (Bruker Daltonics, GmbH).

Foram utilizados para identificação positiva da proteína os valores de massa triptica obtidos pela análise espectrométrica. As proteínas foram identificadas por PMF usando o programa MASCOT (Matrix Science, UK) fazendo uso do banco de dados SWISS-PROT. Foi tolerada uma perda de clivagem por peptídeo, com tolerância de massa de 100 a 200ppm. Considerou-se na busca modificações variáveis tais como carbamidometilação de cisteínas e oxidações de metioninas (Sizova et al, 2007; Mayr, et al, 2005; Macht et al, 2004).

3.23 Eletroforeses bidimensionais das amostras de *lipid rafts*

Após purificação dos *lipid rafts* as frações correspondentes aos rafts e frações solúveis foram combinadas e então utilizadas para precipitação das proteínas com o Kit 2-D Clean-Up (Amersham Biosciences) para a remoção do Nycodenz. Em seguida, as amostras foram ressuspensas em 250 μ L do tampão para focalização isoeletrica (DeStreak Rehydration Solution – GE Healthcare) acrescido de 0,5% anfólitos pH 3-10 não-linear (IPG Buffer/Amersham Biosciences). Nesta etapa, as proteínas foram separadas com base em seus pontos isoeletricos (1ª dimensão). A isoeletrofocalização das amostras foi realizada em equipamento IPGphor II (GE Healthcare) utilizando tiras de IPG (IPG Dry Strips de 13cm – Amersham Biosciences) com faixa de pH de 3 a 10 não-linear. A rehidratação foi feita a 20°C por 12 horas seguindo-se de quatro etapas de isoeletrofocalização (500 volts por 1 hora, 1000 volts por 1 hora, 8000 volts por 2:30 horas, 8000 volts por 30 minutos, totalizando 5 horas e 33.400 Vht).

Após isoeletrofocalização as tiras foram equilibradas em tampão de equilíbrio (50mM Tris-HCl pH 8.8, uréia 6M, tiuréia 2M, glicerol 30%, 2% SDS e traços de azul de bromofenol) acrescido de 50mM DTT (PlusOne)(agente redutor) por 30 minutos. Em seguida as tiras foram incubadas por mais 30 minutos com tampão de equilíbrio acrescido de 4,5% de iodoacetamida (responsável por alquilar grupos tiol prevenindo reoxidações durante a eletroforese).

Ao final da etapa de equilíbrio as tiras foram lavadas por alguns segundos em tampão de corrida (25mM Tris-base, 192mM glicina e 0,1% SDS) sendo, então aplicadas sobre gel SDS-PAGE 10% (segunda dimensão) e seladas com agarose 1% (Sigma-Aldrich) preparada em tampão de corrida acrescido de traços de azul de bromofenol. Foi utilizada cuba tipo Hoefer SE 600 Ruby (GE Healthcare) com tampão de corrida mantido a 15°C. A eletroforese foi realizada a 15mA por gel nos 30 primeiros minutos, sendo em seguida aumentada para 30mA por gel até o final da separação eletroforética. A corrida foi interrompida quando a frente de migração do gel estava a aproximadamente 1cm do final do gel, com o propósito de evitar a perda de proteínas de baixa massa molecular.

Os géis foram corados com prata de acordo com protocolo do kit Silver Staining (Amersham Biosciences) que é compatível com espectrometria de massa e digitalizado ou utilizados para eletrotransferência das proteínas do gel para membrana de nitrocelulose (Amersham-Biosciences) durante 16 horas sob corrente constante 25V em cuba contendo tampão de transferência (39mM de glicina, 48mM Tris-base, 0,037% de SDS e 20% metanol) gelado e mantida a 4°C. Após eletrotransferência, realizou-se reações de *Western blot* com os anticorpos anti-ST11 (1:3000) e anti-Rnd1 (1:800) para analisar a presença e o perfil eletroforético das duas proteínas em duas dimensões e nas amostras analisadas.

4. RESULTADOS

4.1 Expressão e purificação de proteínas recombinantes

4.1.1 ϵ His-STI1

A expressão da proteína recombinante ϵ His-STI1 foi realizada como descrito em material e métodos. As bactérias eletrocompetentes da estirpe DH5 α foram transformadas com o vetor pTrc-STI1 (Zanata *et al.*, 2000a) e o clone com melhor taxa de expressão, avaliada a partir de expressão em pequena escala (dado não mostrado) foi utilizado para expressar a proteína recombinante em larga escala (1L). A proteína foi expressa de forma solúvel e após a lise em prensa de French, realizou-se a purificação por cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC), com resina de Ni-agarose (Qiagen).

Amostras das diversas etapas do processo de purificação da proteína ϵ His-STI1 foram separadas em gel SDS-PAGE 10% e coradas com azul de *Coomassie* (figura 1). Podemos constatar, pela análise da figura 1 que toda a proteína recombinante ϵ His-STI1 expressa foi devidamente purificada. É possível verificar que o eluato 1 é o que contém a maior concentração da proteína. Podemos verificar também, que aparecem algumas bandas abaixo da banda de interesse, isso levantou a hipótese de eventual contaminação da purificação com proteínas de *E. coli*. Para esclarecer esta dúvida, as bandas abaixo e uma acima da banda de interesse, foram analisadas por espectrometria de massas e identificadas por PMF como sendo a proteína STI1 de camundongo (dados não mostrados).

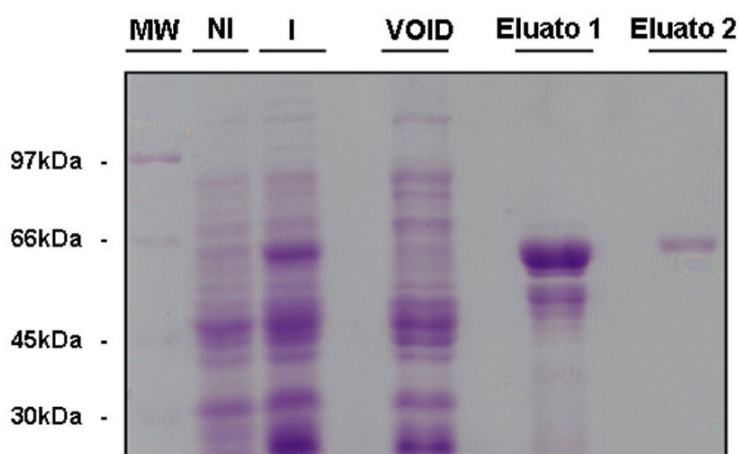


Figura 1. Expressão e purificação em larga escala da proteína recombinante 6His-STI1 . Bactérias eletrocompetentes DH5 α foram transformadas com o vetor para a expressão da proteína recombinante 6His-STI1 e induzidas a expressar a proteína com 1mM de IPTG por 4 horas a 30°C. As bactérias foram lisadas em tampão de lise nativo (NaH_2PO_4 50mM, NaCl 300mM, imidazol 10mM e Tris-HCl pH 8,0 20mM acrescido de PMSF 2mM) e em seguida purificadas por cromatografia de afinidade a resina Ni-NTA agarose. Amostras das diversas etapas da purificação foram resolvidas em SDS-PAGE 10% (NI= não induzida, I= induzida com 1mM de IPTG, Void= volume de lisado recuperado após incubação com a resina de Ni-NTA) e coradas com azul de Comassie. Podemos concluir que a proteína recombinante 6His-STI1 foi devidamente expressa e purificada.

A identificação das bandas mais baixas que aparecem no eluato 1, da figura 1 são produto de degradação. Assim, o eventual risco de contaminação foi descartado e a purificação foi estocada. O eluato 2 por sua vez, não apresentou proteínas degradadas, isso se deve provavelmente à menor concentração de proteínas presentes nesta fração, pois foi gerada pela combinação das últimas eluições.

A boa qualidade da purificação permitiu produzir o anticorpo policlonal contra este antígeno e ainda estocar a proteína STI1 recombinante que pode ser usada em diversas etapas de trabalho do doutorado

4.1.2 GST-Rnd1

A produção da proteína recombinante GST-Rnd1 (Rhom *et al.*, 2000) foi feita como descrito na metodologia a partir da transformação de bactérias eletrocompetentes BL21 (DE3) pLysS com o vetor pGEX4T2, contendo o inserto para codificar a expressão da proteína de interesse (Rhom *et al.*, 2000). Após o teste das melhores condições de expressão, em pequena escala, como curva de indução com IPTG e tempo de indução (dados não mostrados), padronizamos as condições de expressão que estão descritas em material e métodos (tabela 1).

Amostras das diversas etapas da purificação foram separadas em gel SDS-PAGE 10% e em seguida coradas com azul de *Coomassie* (figura 2). Podemos verificar, que nesta purificação não houve degradação da proteína recombinante purificada. É possível constatar também, que a maior concentração da recombinante encontra-se na primeira fração do eluato.

A proteína GST-Rnd1 foi expressa eficientemente e com um satisfatório grau de pureza. O mais significativo é o fato de que a proteína foi obtida na forma solúvel: Rnd1 é uma proteína de membrana e que tem características hidrofóbicas. A obtenção desta proteína viabilizou a imunização de coelho para a obtenção do anticorpo policlonal anti-Rnd1.

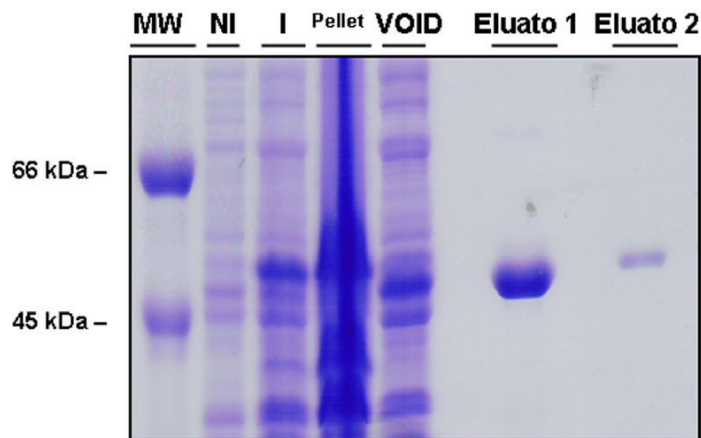


Figura 2. Expressão e purificação da proteína recombinante GST-Rnd1. Bactérias eletrocompetentes BL21(DE3) pLysS foram transformadas com o vetor para a expressão da proteína recombinante GST-Rnd1 e induzidas a expressar a proteína com 0,1 mM de IPTG por 2 horas a 30°C. As bactérias foram lisadas em tampão de lise nativo (PBS acrescido de 1% Triton-X 100 e 2 mM PMSF) e em seguida purificadas por cromatografia de afinidade a resina de glutationa-Sepharose. Amostras das diversas etapas da purificação (NI = não induzida, I = induzida com 0,1mM de IPTG, Pellet = sedimento de bactérias após clareamento do lisado de bactérias, Void = volume de lisado recuperado após incubação com a resina) foram resolvidas em SDS-PAGE 10% e coradas com azul de *Coomassie*. Podemos concluir que a proteína recombinante GST-Rnd1 foi devidamente expressa e purificada.

4.1.3 GST

Assim como a GST-Rnd1, a proteína GST foi expressa a partir da transformação de bactérias eletrocompetentes BL21 (DE3) pLysS com o vetor pGEX4T2 vazio. Esta expressão e purificação se fizeram necessárias frente à necessidade de ter a proteína GST purificada para ser usada como controle negativo em ensaios bioquímicos e para a produção do anticorpo policlonal contra a proteína GST.

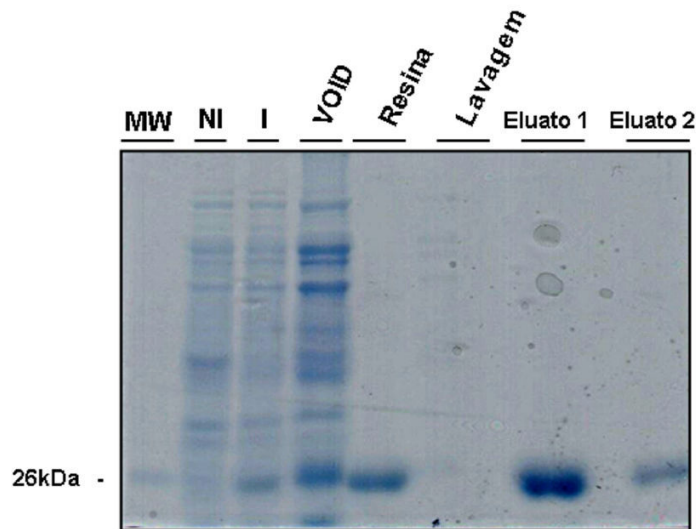


Figura 3. Expressão e purificação da proteína recombinante GST. Bactérias eletrocompetentes BL21(DE3) pLysS foram transformadas com o vetor para a expressão da proteína recombinante GST e induzidas a expressar a proteína com 0,1 mM de IPTG por 2 horas a 30°C. As bactérias foram lisadas em tampão de lise nativo (PBS acrescido de 1% Triton-X 100 e 2 mM PMSF) gelado e em seguida purificadas por cromatografia de afinidade a resina de glutationa-Sepharose. Amostras das diversas etapas da purificação (NI = não induzida, I = induzida com 0,1mM de IPTG, Void = volume de lisado recuperado após incubação com a renina) foram resolvidas em SDS-PAGE 12% e coradas com azul de *Coomassie*. Podemos concluir que a proteína recombinante GST foi devidamente expressa e purificada.

Amostras das diversas etapas da purificação (figura 3) foram separadas em gel SDS-PAGE 15% e em seguida, o gel foi corado com azul de *Coomassie*. A proteína produzida, em função da sua qualidade e pureza, pode então ser utilizada para a produção do anticorpo policlonal anti-GST.

4.2 Produção dos anticorpos policlonais

4.2.1 Anti-STI1

A produção do anticorpo foi feita como descrito em material e métodos.

Após a coleta do soro hiperimune, o soro anti-STI1 foi testado contra 50µg de extrato total de encéfalo. Diluição seriada do soro anti-STI1 em reação de *Western blot* é apresentada na figura 4 A. Podemos concluir que o anticorpo reconhece especificamente uma banda de massa molecular esperada para a proteína STI1 (66 kDa). É possível também verificar que para ensaios de *Western blot*, a melhor diluição é de 1:3200 porque não observamos nenhuma reação de fundo.

Após analisar a especificidade do anticorpo contra extrato total de encéfalo de camundongo, realizou-se ensaio de bloqueio do anticorpo com a proteína recombinante. Este ensaio teve como objetivo provar, de uma forma alternativa que o reagente obtido é específico para o antígeno de interesse. Para controle positivo deste ensaio, foi utilizado o anticorpo anti-STI1 não bloqueado com a proteína recombinante ₆His-STI1 e o soro pré-imune como controle negativo.

A análise da figura 4B deixa claro que o anticorpo anti-STI1 foi bloqueado pela proteína recombinante, deixando assim de reconhecer a proteína endógena presente no extrato. A presença da proteína STI1, no controle positivo do ensaio, foi evidenciada pela reação de *Western blot* com o anticorpo não bloqueado, este resultado confirma a especificidade do anticorpo produzido.

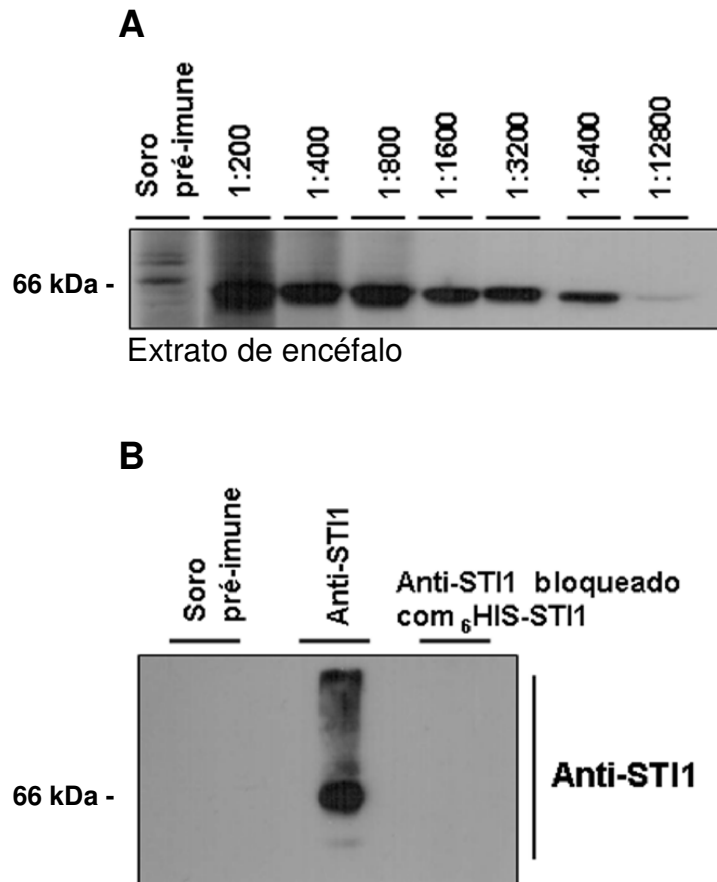


Figura 4. O anticorpo anti-STI1 recombinante reconhece preferencialmente a proteína STI1 presente em extrato total de encéfalo de camundongo. Soro pré-imune do animal foi coletado antes da primeira imunização para uso como controle negativo nos ensaios. Após terceira imunização o soro hiperimune foi coletado e titulado contra 50 μ g de extrato total de encéfalos de camundongos adultos imobilizados em membrana de nitrocelulose. **(A)** O soro hiperimune reconhece especificamente uma banda de massa molecular esperada para a proteína STI1 endógena nas diversas diluições utilizadas. **(B)** O ensaio de bloqueio do anticorpo com a proteína recombinante evidencia a especificidade do reagente obtido, uma vez que incubado com a proteína recombinante a proteína presente no extrato celular (anti-STI1) não aparece na reação de *Western blot*.

Investindo ainda em ensaios que visavam caracterizar o anticorpo produzido, realizou-se ensaio de imunoprecipitação. Este experimento teve como objetivo avaliar a eficiência do anticorpo policlonal anti-STI1, em reconhecer a proteína STI1 na sua forma nativa. Desta maneira o ensaio foi conduzido como descrito na metodologia, e a partir de extrato total de encéfalo de camundongo, foi possível constatar a eficiência do soro anti-STI1 em imunoprecipitar a proteína presente no extrato de encéfalo (figura 5 – seta).

Apesar de o anticorpo ser capaz de reconhecer a proteína STI1 na sua forma nativa, podemos verificar que o anticorpo secundário (anti-coelho HRP) reconhece diversas bandas, inclusive a cadeia pesada das imunoglobulinas anti-STI1. Desta forma ensaios futuros poderiam ficar comprometidos já que a massa molecular da STI1 (66 kDa) se aproxima da massa da cadeia pesada das imunoglobulinas (60 kDa) presentes no soro anti-STI1.

Ensaio realizado nas mesmas condições, mas com o uso de géis SDS-PAGE não-redutores não resolveram o problema (dados não mostrados). Assim, decidiu-se por investir na purificação das IgGs e conseqüente ligação covalente das mesmas em resinas de proteína-A Sepharose com o objetivo de evitar a reação cruzada do anticorpo secundário e as imunoglobulinas presentes no soro.

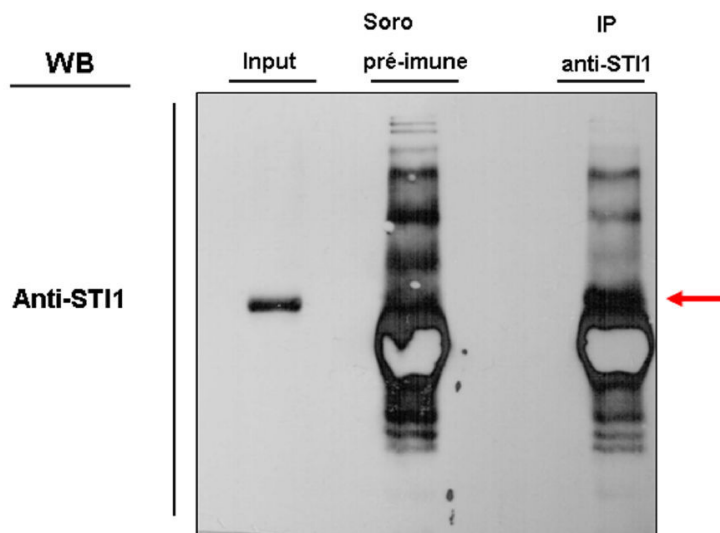


Figura 5. O anticorpo anti-STI1 imunoprecipita a proteína STI1 presente em extrato total de encéfalo de camundongo. Neste ensaio o extrato celular (100µg) foi incubado 16 horas com o soro anti-STI1 (diluição 1:50) e com o controle negativo do ensaio, o soro pré-imune na mesma concentração. Em seguida as amostras foram incubadas com matriz de Proteína A-agarose (Invitrogen) por 2h a 4°C. Coletou-se a matriz sólida de proteína A por centrifugação seguindo-se de sucessivas lavagens com PBS. As amostras foram fervidas por cinco minutos em tampão de amostra redutor e o imunocomplexo eluído da matriz foi separado em SDS-PAGE 10%. As amostras (Input = extrato total de encéfalo de camundongo, o controle negativo e a imunoprecipitação) foram eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose e reagidas com o soro anti-STI1 (1:3000). A análise do resultado evidencia a eficiência do anticorpo anti-STI1 em recuperar a proteína STI1 (seta) presente no extrato de encéfalo. Forte reação da cadeia pesada da imunoglobulina de coelho também é evidenciada logo abaixo da banda de STI1.

4.2.2 Anti-Rnd1

A produção do anticorpo anti-Rnd1 também seguiu as mesmas etapas descritas para a produção do anticorpo policlonal anti-STI1. Assim, após a coleta do soro hiper imune o mesmo foi testado contra extrato total de encéfalo de camundongo adulto (figura 6A). Podemos concluir que o anticorpo produzido reconhece especificamente uma proteína de massa molecular esperada para a proteína Rnd1 (30 kDa). A especificidade do reagente também é reforçada pelo fato de que o soro pré-imune utilizado neste ensaio, como controle negativo, não reconhece nenhuma banda protéica presente na amostra.

A titulação do anticorpo feita por *Western blot* (figura 6A) deixa claro que em concentrações mais altas, 1:200, 1:400 ou 1:800, o anticorpo marca inespecificamente moléculas de massas mais altas e mais baixas que 30 kDa, massa molecular esperada de Rnd1. Entretanto, a especificidade se torna evidente a partir da diluição 1:1600. Assim, a partir deste resultado ficou estabelecido o uso do anticorpo em diluições entre 1:800 e 1:1600.

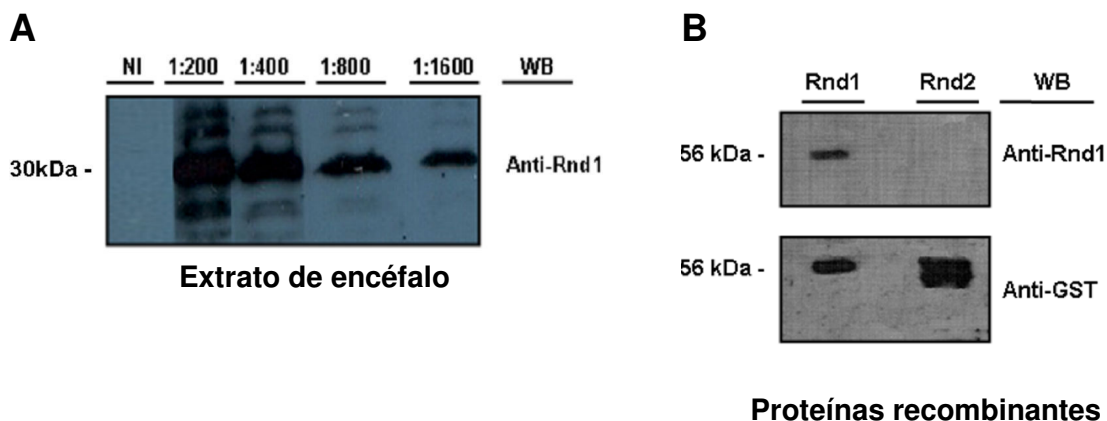


Figura 6. O anticorpo anti-Rnd1 reconhece especificamente a proteína recombinante GST-Rnd1 e a Rnd1 endógena presente em extrato total de encéfalo de camundongo adulto. Após terceira imunização o soro hiper imune do coelho foi coletado e titulado contra 50 µg de extrato total de encéfalos de camundongos adultos imobilizado em membrana de nitrocelulose (**A**). O soro pré-imune do coelho foi coletado antes da primeira imunização e foi utilizado como controle negativo do ensaio. O soro hiper imune reconhece especificamente uma banda de massa molecular esperada para a proteína Rnd1 (30 kDa) endógena nas diversas diluições utilizadas. Para avaliar a especificidade do anticorpo contra a proteína Rnd1 e descartar a reação cruzada com outra Rnd, realizou-se reação de *Western blot* com o anticorpo, na diluição de 1:2000 contra 10µL de resina de glutationa Sepharose, contendo as proteínas GST-Rnd1, GST-Rnd2 e GST expressas para ensaios de *pull-down* (**B**). Pode-se concluir que o anticorpo anti-Rnd1 reconhece especificamente a GTPase recombinante GST-Rnd1 e Rnd1 endógena e não apresenta reação cruzada com outro membro da família, Rnd2.

Alternativamente, para confirmar a especificidade do anticorpo obtido contra a proteína Rnd1, testou-se o reagente contra outra GTPase recombinante expressa e purificada (figura 6B). Podemos concluir que o anticorpo reconhece especificamente a proteína GST-Rnd1 e nenhuma reação é observada na canaleta onde a proteína recombinante GST-Rnd2 foi aplicada (figura 6B, painel inferior).

Diversas tentativas foram realizadas com o propósito de avaliar a capacidade do anticorpo anti-Rnd1 em imunoprecipitar a proteína presente em extrato total de encéfalos ou em preparações de membranas (dados não mostrados). Infelizmente, o anticorpo anti-Rnd1 não imunoprecipita a proteína presente nas amostras, e a conclusão tirada é a de que o reagente é eficiente no reconhecimento do antígeno endógeno somente em condições onde a proteína está desnaturada, por exemplo, em reações de *Western blot*.

4.2.3 Anti-GST

A produção do anticorpo anti-GST se fez necessário em função das proteínas recombinantes que foram utilizadas para os ensaios de *pull-down*. Como estes ensaios foram analisados a partir de reações de *Western blot*, a produção deste reagente tornou-se essencial para ser usado como controle. Assim, a proteína foi expressa e purificada e em seguida utilizada para a imunização de coelho, como descrito em materiais e métodos.

A titulação do soro anti-GST é apresentada na figura 7, e é possível verificar que o anticorpo reconhece especificamente a proteína GST. A reação com o soro pré-imune do coelho não evidenciou nenhuma banda na membrana de nitrocelulose, reforçando a qualidade do anticorpo obtido. Outro fato relevante de se destacar é a qualidade da purificação obtida, uma vez que nenhuma proteína de *E. coli* foi co-purificada, o que geraria a produção de um anticorpo que pudesse reconhecer proteínas contaminantes.

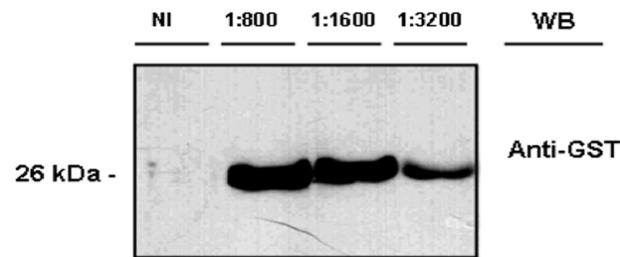


Figura 7. O anticorpo anti- GST reconhece especificamente a proteína recombinante GST purificada. Após terceira imunização o soro hiperimune do coelho foi coletado e titulado contra 5 μ g da proteína recombinante GST imobilizada em membrana de nitrocelulose. O soro pré-imune do coelho foi coletado antes da primeira imunização e foi utilizado como controle negativo do ensaio (NI). O soro hiperimune reconhece especificamente uma banda de massa molecular esperada (26 kDa) para a proteína GST nas diversas diluições testadas. Pode-se concluir, portanto, que o anticorpo anti-GST reconhece especificamente a proteína GST.

4.3 Purificação de IgG

A purificação de IgGs foi realizada com o propósito de conseguir obter um reagente de melhor qualidade e com concentração protéica determinada. O uso dos anticorpos purificados viabilizaria a realização de ensaios, onde as proteínas presentes no soro pudessem interferir nos resultados. Além disso, a purificação das IgGs anti-STI1 viabilizaria a reação de ligação covalente das IgGs anti-STI1 e a matriz de proteína A. Essa ligação covalente, favoreceria a realização de ensaios para a análise de co-immunoprecitados.

Após eluição das IgGs da coluna de proteína A Sepharose, dosou-se a concentração protéica das frações e 2 μ g de cada IgG (soro não imune, anti-STI1, anti-Rnd1) foram separadas em SDS-PAGE 12% e em seguida o gel foi corado com azul de *Coomassie* (figura 8).

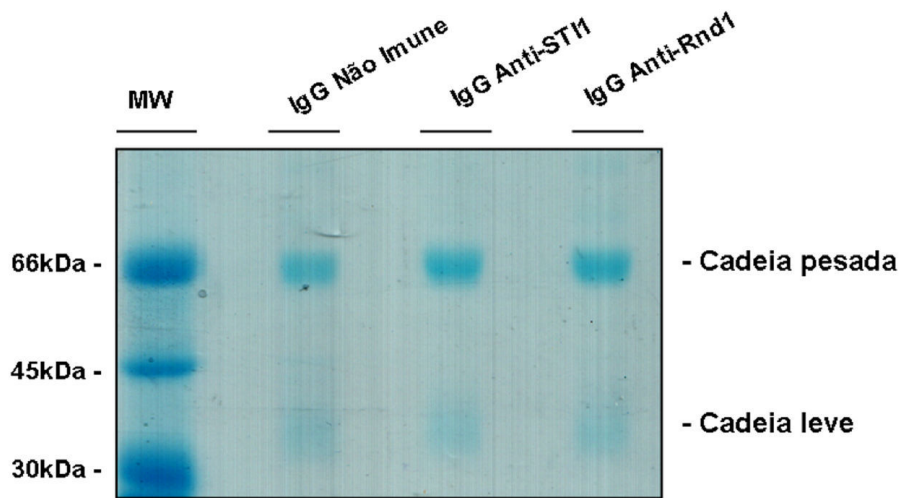


Figura 8. Purificação das imunoglobulinas anti-Rnd1 e anti-STI1 presentes nos soros hiper imunes dos coelhos imunizados. 2 μ g de cada anticorpo após a purificação foram separados em SDS-PAGE 12% e, em seguida o gel foi corado com azul de *Coomassie*. A análise do gel permite concluir que as IgGs de soro não imune de coelho, anti-STI1 e anti-Rnd1 foram devidamente purificadas.

Podemos verificar a partir da análise do gel SDS-PAGE redutor (figura 8), que o padrão eletroforético característico das cadeias leves e pesadas das IgGs é observado. Em todas as canaletas, podemos verificar a presença de bandas de massas moleculares de aproximadamente 60 kDa e 30 kDa. Tais bandas correspondem ao padrão de migração esperado para cadeias leves (30 kDa) e pesadas (60 kDa) das IgGs purificadas em um gel SDS-PAGE 12%.

O resultado apresentado na figura 8 deixa evidente, portanto, que o protocolo utilizado foi eficiente na purificação das IgGs presentes nos soros dos coelhos imunizados contra os antígenos recombinantes GST-Rnd1 e $_6$ His-STI1.

Apesar de o protocolo utilizado para a purificação das IgGs ter sido eficiente, restava ainda confirmar se, mesmo após a exposição das imunoglobulinas a um pH tão baixo (pH 3) para a sua eluição da coluna de proteína A, os anticorpos continuavam com atividade no reconhecimento dos seus antígenos específicos. Por este motivo, as IgGs anti-Rnd1 e anti-STI1 foram novamente tituladas por reações de *Western blot*.

4.3.1 Teste de reatividade das IgGs anti-STI1 e anti-Rnd1 purificadas

4.3.1.1 Anti-STI1

A purificação das IgGs anti-STI1 seguiu o protocolo descrito em material e métodos. Assim, após determinação da presença das IgGs nas frações coletadas (figura 8), realizou-se a titulação do anticorpo por *Western blot*.

Podemos observar pela análise da reação de *Western blot* da figura 9 que, as IgGs anti-STI1 purificadas não perderam a atividade, pois continuam reconhecendo a proteína, presente no extrato de encéfalo, na altura esperada (66 kDa). Também é visível que as IgGs não imune, utilizadas como controle negativo deste ensaio, não reconheceram nenhuma banda na reação.

Este resultado deixa claro que produzimos um anticorpo de qualidade para ser utilizado em experimentos onde, as proteínas presentes no soro, além das IgGs anti-STI1, possam comprometer os resultados. Desta forma, o uso das IgGs anti-STI1 purificadas, poderão viabilizar os ensaios de imunoprecipitação a partir do anticorpo covalentemente ligado em resina de proteína-A Sepharose.

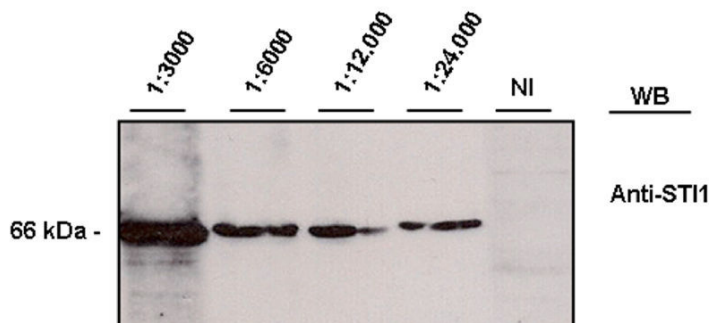


Figura 9. O anticorpo anti-STI1 (IgG) reconhece especificamente a proteína STI1 presente em extrato total de encéfalo de camundongo. Após a purificação das IgGs presentes no soro hiper imune anti-STI1, as mesmas foram testadas contra 50 µg de extrato total de encéfalos de camundongo adulto imobilizado em membrana de nitrocelulose. As IgGs purificadas a partir de soro não imune de coelho, foram utilizadas como controle negativo da reação de *Western blot*. A IgG hiper imune reconhece especificamente uma banda de massa molecular esperada para a proteína STI1 endógena nas diversas diluições testadas. Pode-se concluir que o anticorpo anti-STI1 reconhece especificamente a STI1 endógena presente em extrato total de encéfalo de camundongo adulto. Assim, podemos também concluir que o anticorpo anti-STI1 não perdeu sua atividade após realização do protocolo para purificação das IgGs.

4.3.1.2 Anti-Rnd1

A eficiência na purificação destas IgGs podem ser visualizadas na figura 8. Entretanto, também foi feito o teste da atividade do anticorpo através da titulação do reagente por *Western blot*. Para este ensaio foi utilizado extrato total de células N2a, uma linhagem celular obtida a partir de um neuroblastoma murino. O propósito foi o de determinar a presença de Rnd1 nesta linhagem celular e em paralelo comprovar a atividade do anticorpo após a purificação das IgGs.

Podemos verificar que o anticorpo anti-Rnd1 (figura 10) reconhece especificamente uma banda de massa molecular esperada para a proteína Rnd1 (30 kDa) nas diversas diluições testadas. Este resultado reforça a eficiência do método utilizado na purificação de IgGs, deixando evidente que se feito nas condições estabelecidas, não causa perda de atividade das IgGs por desnaturação em função do baixo pH utilizado na eluição das proteínas da coluna de proteína A.

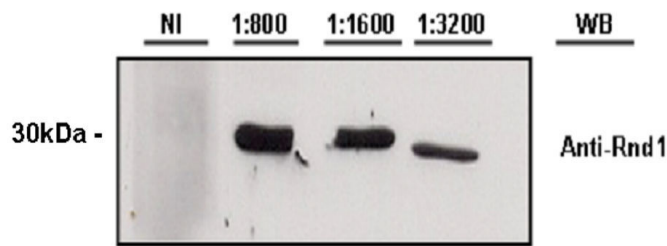


Figura 10. O anticorpo anti-Rnd1 (IgG) reconhece especificamente a proteína Rnd1 endógena presente em extrato de células N2a. Após a purificação das IgGs presentes soro hiper imune anti-Rnd1 realizou-se titulação do anticorpo, por reação de *Western blot*, contra 50 μ g de extrato total de células N2a imobilizado em membrana de nitrocelulose. As IgGs não imune purificadas a partir do soro não imune de coelho foram utilizadas como controle negativo da reação de *Western blot*. As IgGs anti-Rnd1 purificadas reconhecem especificamente uma banda de massa molecular esperada para a proteína Rnd1 endógena nas diversas diluições testadas indicando que o anticorpo anti-Rnd1 não perdeu sua atividade após realização do protocolo para purificação das IgGs.

Este resultado também deixa claro a presença da GTPase Rnd1 no extrato de células N2a, sugerindo que tal linhagem celular possa ser utilizada, futuramente, em ensaios de imunolocalização.

Apesar de diversas tentativas terem sido feitas, as IgGs anti-Rnd1 também não são capazes de imunoprecipitar a proteína presente em extratos tanto de encéfalo, de células N2a (dados não mostrados) ou células 293T transfectadas com vetor para a superexpressão da quimera GFP-Rnd1 (53 kDa). Entretanto, temos um anticorpo de qualidade para utilizar em ensaios onde a proteína esteja desnaturada.

4.4 Ligação covalente do anticorpo anti-STI1 em resina de Proteína-A Sepharose

Para viabilizar o estudo da interação entre Rnd1 e STI1 por co-imunoprecipitação, foi necessário realizar a ligação covalente entre as IgG anti-STI1 e a matriz de proteína A Sepharose. A necessidade desta etapa, no processo de análise da interação entre as proteínas Rnd1 e STI1, se deve ao fato de que o anticorpo secundário (anti-coelho –HRP) reconhece cadeias leve e pesada das IgGs anti-STI1 (figura 5).

Este reconhecimento das cadeias leve e pesada das imunoglobulinas do anticorpo primário anti-STI1 dificultaria a análise da presença da proteína Rnd1 (30 kDa) e STI1 (66 kDa) nas reações de *Western blot*, por estarem as proteínas de interesse muito próximas das massas da cadeia leve (25-30 kDa) e pesada (60 kDa).

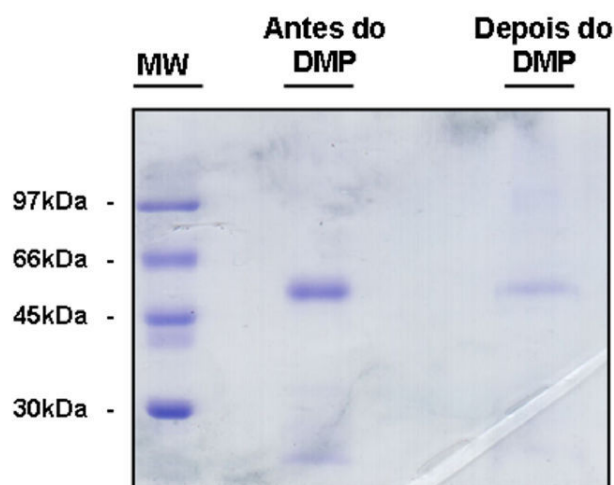


Figura 11. O anticorpo anti-STI1 foi covalentemente ligado (cross-ligado) na resina de proteína A Sepharose. A reação de cross-link foi realizada e foram coletados 10µL de cada etapa do processo (Antes do DMP e Depois do DMP) para controle da reação, os quais foram aplicados e separados em SDS-PAGE 12%. A coloração do gel com azul de *Coomassie* evidencia que a IgG anti-STI1 foi devidamente ligada na resina após reação com o cross-linker DMP (Depois do DMP). Entretanto podemos verificar que alguma IgG desliga da resina após fervura da amostra com tampão de amostra redutor. O mesmo protocolo foi aplicado para a ligação de IgG não imune obtendo-se o mesmo padrão de resultado.

A figura 11 foi obtida a partir de gel SDS-PAGE 12% de amostras de duas etapas distintas, do protocolo de ligação covalente das IgGs à matriz de proteína A Sepharose. Podemos verificar que antes da adição do reagente DMP à reação, as IgGs ligadas a matriz foram eluídas. O mesmo pode ser observado na canaleta correspondente a amostra após incubação com o DMP. Entretanto, ficou evidente que muito pouca IgG foi eluída da resina após reação com o DMP, se comparado ao controle antes do DMP.

Mesmo após diversas modificações no protocolo (dados não mostrados), este foi o que gerou o melhor resultado, por este motivo o protocolo foi mantido para a obtenção do anti-STI1 covalentemente ligado.

4.5 Eficiência do anticorpo anti-STI1 covalentemente ligado em resina de proteína-A Sepharose para imunoprecipitação

Após ligar o anticorpo anti-STI1 covalentemente na resina de proteína A sepharose, e antes de começar os ensaios de co-imunoprecipitação decidiu-se testar a eficiência do reagente obtido na redução da reação do anticorpo secundário (anti-coelho HRP). Assim, realizamos ensaio de imunoprecipitação (figura 12) com o anticorpo anti-STI1 covalentemente ligado na resina. Para controle negativo, a IgG não imune foi devidamente ligada na resina de proteína-A Sepharose, nas mesmas condições experimentais que a IgG anti-STI1.

Como já havíamos começado ensaios de caracterização da proteína STI1 nos *lipid rafts*, e tivemos os mesmos problemas com a reação cruzada do anticorpo secundário com as IgGs presentes no soro do anti-STI1, decidimos usar os *lipid rafts* como material de partida para confirmar a atividade do anti-STI1 em reações de imunoprecipitação.

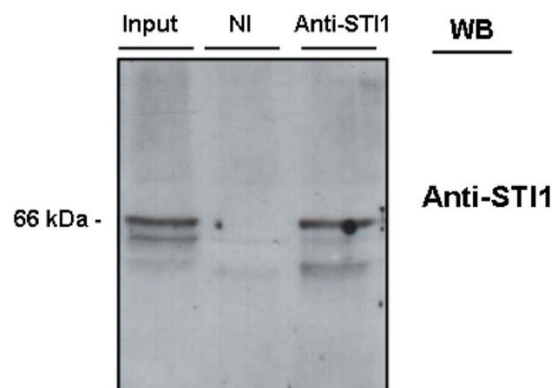


Figura 12. O anticorpo anti-STI1 covalentemente ligado em resina de proteína-A Sepharose imunoprecipita a proteína presente em *lipid rafts* de camundongo adulto. Após reação de ligação covalente do anticorpo anti-STI1 e da IgG não imune em resina de proteína A Sepharose, 10 μ L da resina para cada condição experimental foi utilizada para imunoprecipitar a proteína STI1 presente em amostra de *lipid rafts*. As proteínas foram eluídas do anticorpo com glicina 0,1M pH 3. Os eluatos foram separados em gel SDS-PAGE 12% e em seguida eletrotransferidos para membrana de nitrocelulose. Realizou-se reação de *Western blot* com o anticorpo anti-STI1 na diluição de 1:3000. Podemos verificar que o anticorpo covalentemente ligado na resina, imunoprecipita a proteína STI1 presente nos lipid rafts. Pouca reação do secundário com as IgGs do anticorpo é observada, possibilitando a realização de ensaio de co-imunoprecipitação para analisar a interação Rnd1 e STI1 endógenas.

Podemos constatar pela reação de *Western blot* da figura 12, que o anticorpo anti-STI1 covalentemente ligado na resina de proteína-A Sepharose foi eficiente em imunoprecipitar a proteína STI1 presente na preparação de *lipid rafts* de cérebro de camundongo (canaleta referente ao Input da figura 12). Nenhuma proteína foi evidenciada pela reação do anti-STI1 na canaleta referente ao controle negativo (IgG não imune).

O resultado da figura 12 mostra que a ligação do anti-STI1 na resina de proteína-A, de forma definitiva, reduziu muito a reação do anticorpo secundário com as imunoglobulinas do anticorpo primário (anti-STI1). Este resultado mostra que a partir deste protocolo, poderíamos começar a investir em ensaios de co-imunoprecipitação.

4.6 Expressão em larga escala das proteínas GST-Rnd1, GST-Rnd2, GST-RhoG, GST-RhoD (Rhom *et al.*, 2000) e GST para ensaios de *pulldown*

Empregando a metodologia descrita por Rhom e colaboradores (2000) foi possível expressar as proteínas recombinantes GST-Rnd1 (figura 13 A), GST-Rnd2 (figura 13 B), GST-RhoD (figura 13 C), GST-RhoG (figura 13 D) e GST (figura 13 E).

A análise dos géis (figura 13 A-E) mostra que todas as proteínas recombinantes foram devidamente expressas. Após a confirmação da expressão das proteínas de interesse, os lisados bacterianos clarificados por centrifugação foram estocados em alíquotas no -80°C até o seu uso. O propósito destas expressões não foi a obtenção das proteínas recombinantes purificadas, mas a obtenção de amostras de diferentes GTPases recombinantes que pudessem ser rapidamente imobilizadas em matriz sólida (Glutathione-Sepharose) e empregadas no estudo da especificidade da interação Rnd1 e STI1.

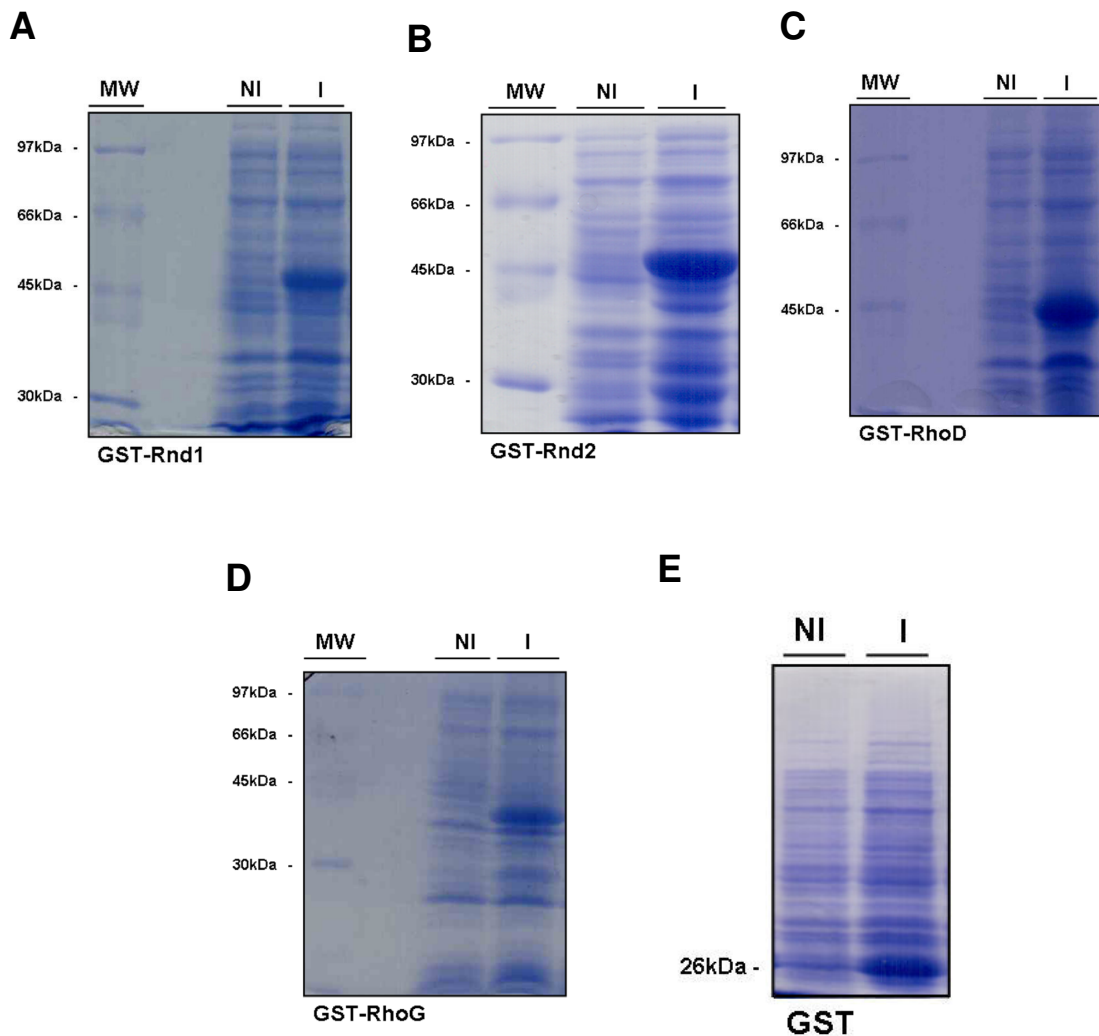


Figura 13. Expressão das GTPases recombinantes para ensaio de pulldown. As proteínas recombinantes de interesse foram expressas em sistema heterólogo de *E. coli* como descrito na tabela 1 em material e métodos. Após expressão das GTPases recombinantes GST-Rnd1 (A), GST-Rnd2 (B), GST-RhoD (C) e GST-RhoG (D) foi também expressa a proteína GST (E) para ser usada como controle negativo nos ensaios de *pull-down*. Amostras não induzidas (NI) e induzidas (I) de cada proteína foi separada em SDS-PAGE 15% e o gel corado com azul de *Coomassie*. Podemos concluir, pela observação dos géis, que todas as proteínas foram devidamente expressas. As amostras foram aliqüotadas e estocadas em freezer -80°C até momento do uso.

4.7 Ensaios de *pulldown*

Com o objetivo de avaliar a especificidade e/ou a preferência de STI1 por interagir com diferentes GTPases, ensaios de *pulldown* foram realizados empregando-se diferentes GTPases imobilizadas em uma matriz sólida e STI1 oriunda do encéfalo de camundongos (adultos ou embriões).

A partir das análises das figuras 14 A e B é possível verificar que a proteína STI1, presente no extrato total de encéfalo adulto, ligou-se preferencialmente em GST-Rnd1 imobilizada na resina de glutationa Sepharose. Uma ligação residual pode ser observada na canaleta onde temos a proteína GST imobilizada (figura 14 A). Menor interação residual pode ser observada, nas canaletas correspondentes à GTPase recombinante GST-RhoD imobilizada na resina e a proteína STI1, presente no extrato total de encéfalo. Ainda foi possível verificar que a ativação da GTPase GST-RhoD com o GTPyS (uma forma não hidrolizável do GTP) não interferiu na ligação entre STI1 e GST-RhoD.

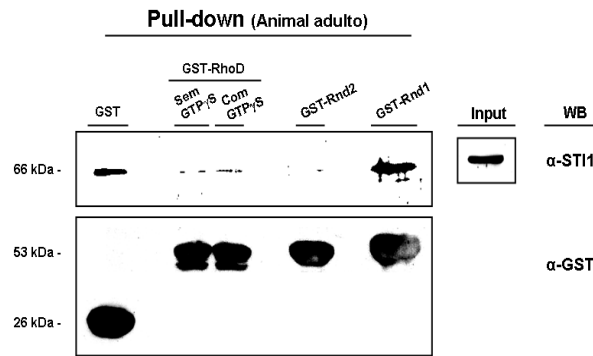
Para reforçar os dados que apontam para uma preferência de interação entre STI1 e Rnd1, uma quarta GTPase, a GST-RhoG, recombinante foi adicionada ao ensaio de *pulldown*. Assim, nas mesmas condições experimentais do ensaio 14 A, a figura 14 B mostra que a interação entre STI1 e GST-Rnd1 é preferencial, corroborando desta forma o ensaio 14 A. Também fica evidente que existe uma interação residual entre STI1 e GST-RhoD e RhoG, somente na forma ativa ligada a GTPyS, entretanto essa ligação residual é ainda maior entre GST-RhoD ativada se comparada a GST-RhoG ativa. Na figura 14 B também podemos verificar a pouca ligação entre STI1 e a proteína GST.

Os ensaios apresentados nas figuras 14 A e B foram feitos a partir de amostras de encéfalos de camundongos adultos. Entretanto, avaliar se essa interação se mantém em amostras de embrião mostra-se importante, uma vez que tanto Rnd1 quanto STI1, estão envolvidas em diversos mecanismos moleculares durante o desenvolvimento do sistema nervoso central. Assim, utilizou-se extrato total de encéfalos de camundongo em estágio embrionário de 17 dias (E17), para o ensaio de *pulldown*. O ensaio de *pulldown* mostrado na figura 14 C foi realizado nas mesmas condições experimentais dos anteriores, com pequena modificação. Neste ensaio, pré-incubamos as GTPases recombinantes GST-Rnd1 e GST-Rnd2 com o

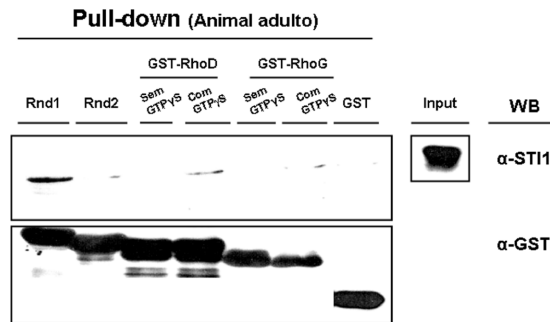
GTPyS para avaliar se a presença do reagente iria interferir na interação entre STI1 e as GTPases recombinantes citadas.

A análise do resultado da figura 14 C, corrobora os outros resultados obtidos (figuras 14 A e B), evidenciando a interação preferencial entre STI1 de camundongo E17 e GST-Rnd1. A presença do GTPyS aparentemente não interferiu na ligação entre as proteínas de interesse, entretanto temos a impressão de que na canaleta onde GST-Rnd1 foi incubada com o GTPyS houve uma redução na intensidade da reação de *Western blot* com o anticorpo anti-STI1. Os dados da figura 14 A-C evidenciam interação entre STI1 e GST-Rnd1, entretanto não deixa claro se tal interação é direta ou não.

A



B



C



Figura 14. STI1 interage preferencialmente com a GTPase GST-Rnd1. Extratos totais de encéfalos de camundongos adultos (A e B) e embrionário E17 (C) foram submetidos a ensaios de *pull-down* com iguais concentrações de proteínas recombinantes. Após período de incubação e extensivas lavagens para retirada do material não ligado, as proteínas foram eluídas da matriz sólida com tampão de amostra e separadas em gel SDS-PAGE, seguida de reação de *Western blot* com os anticorpos anti-STI1 (1:3000) e anti-GST (1:4000). As quantidades de GST, GST-Rnd1, GST-Rnd2, GST-RhoG e GST-RhoD pré-imobilizadas na matriz sólida são comparáveis entre si (painéis inferiores, WB anti-GST). Podemos verificar que a interação GST-Rnd1 é preferencial em todos os ensaios (A-C), entretanto reação residual pode ser observada, principalmente no ensaio C entre GST-Rnd2 e STI1. A incubação de GST-Rnd1 e GST-Rnd2 com o GTP γ S não alterou o perfil dos resultados.

4.8 A proteína Rnd1 co-imunoprecipita com a proteína STI1 presente em extrato de encéfalos de camundongo adulto

Os ensaios de *pull-down* revelaram, *in vitro*, que a interação observada entre GST-Rnd1 e a proteína STI1 presente em extratos de encéfalo de camundongos, tanto adulto quanto embrionários, é preferencial quando comparado com outras GTPases recombinantes e com a proteína GST (Figura 14). Entretanto, esta interação foi analisada por outra técnica, o ensaio de co-imunoprecipitação da proteína Rnd1, presente no extrato de encéfalo de camundongo adulto, com o anticorpo anti-STI1 covalentemente ligado em resina de proteína A Sepharose.

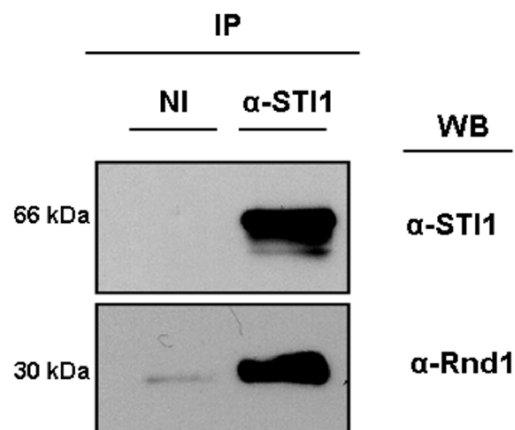


Figura 15. Rnd1 co-imunoprecipita com a proteína STI1 presente em extrato total de encéfalos de camundongos. O anticorpo anti-STI1 (IgG) foi covalentemente ligado em resina de proteína A-Sepharose e utilizado para imunoprecipitar a proteína STI1 presente em extrato total de encéfalos de camundongos. O imunoprecipitado foi utilizado para analisar a interação entre a proteína Rnd1 e a proteína STI1 presentes na amostra. O eluato foi resolvido em SDS-PAGE 12% e as proteínas presentes no gel foram eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose e submetida à reação de *Western blot* contra os anticorpos policlonais anti-Rnd1 (1:800) e anti-STI1 (1:3000). A análise da reação de WB evidencia que a proteína Rnd1 foi co-imunoprecipitada com a proteína STI1 corroborando resultados anteriores de interação entre as duas proteínas.

A análise da figura 15 mostra que o anticorpo anti-STI1 foi eficiente em imunoprecipitar a proteína STI1 presente no extrato total de encéfalo de camundongo adulto. A reação de *Western blot* com o anti-Rnd1 (figura 15, painel inferior) mostra que a proteína Rnd1 endógena, presente na amostra de encéfalo de camundongo co-imunoprecipitou com a proteína STI1. Os resultados de co-imunoprecipitação somado aos de *pulldown* evidenciam que ambas as proteínas podem interagir, entretanto não nos diz se a interação é direta entre as duas proteínas ou, se é produto de um heterocomplexo protéico do qual as duas fazem parte.

4.9 Ensaio de ligação

Ensaio de ligação direta entre as moléculas recombinantes purificadas, $_6$ His-STI1 e GST-Rnd1, foram feitos em microplacas de poliestireno e a ligação entre as moléculas evidenciada através de ensaio imunoenzimático.

Para analisar se a interação entre Rnd1 e STI1 identificada nos ensaios de *pulldown* e co-imunoprecipitação seria direta, as proteínas recombinantes $_6$ His-STI1 e GST-Rnd1 foram utilizadas em ensaios de interação feitos em placas de poliestireno, como descrito em material e métodos.

A análise da figura 16 A mostra que a proteína recombinante $_6$ His-STI1 liga preferencialmente à proteína recombinante GST-Rnd1. Este mesmo ensaio mostra que a proteína recombinante $_6$ His-STI1 também liga na proteína GST imobilizada na placa, entretanto a interação GST-Rnd1/ $_6$ His-STI1 é maior em relação ao observado para GST/ $_6$ His-STI1 (dados estatisticamente significativos). Esse dado é interessante, uma vez que tal interação também é observada nos ensaios de *pulldown* (figura 14 A). É interessante notar, que na concentração de 0,2 μ g de $_6$ His-STI1 a absorvância do controle GST em relação à proteína recombinante GST-Rnd1 é aproximadamente 50% menor. Essa diferença praticamente se mantém nas diversas concentrações de $_6$ His-STI1 utilizadas.

Podemos observar uma redução na absorvância na ligação entre GST-Rnd1/ $_6$ His-STI1 à medida que a concentração da $_6$ His-STI1 aumenta. Esse dado é interessante, e diversos trabalhos publicados sugerem a formação de dímeros entre moléculas da proteína recombinante $_6$ His-STI1.

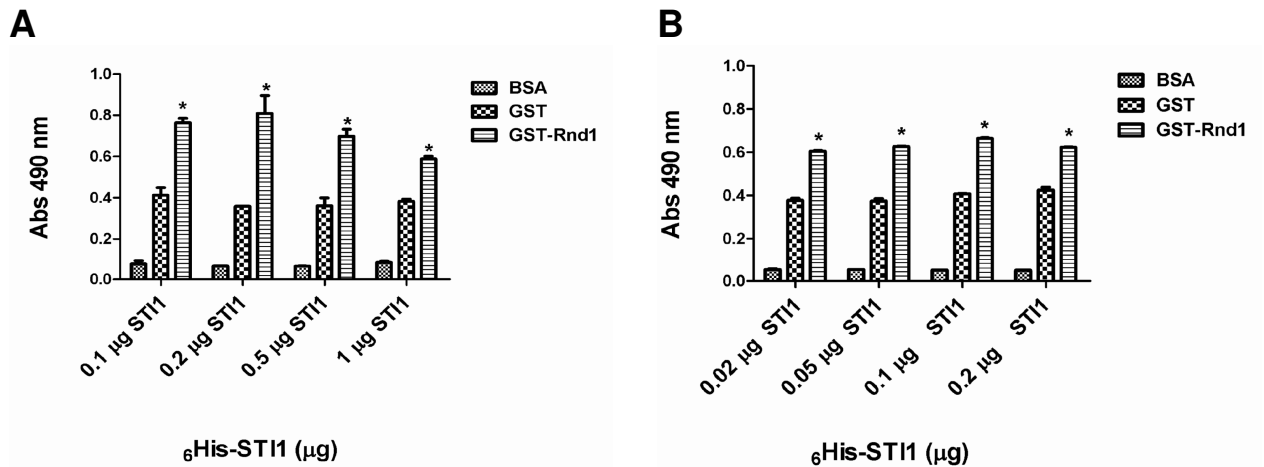


Figura 16. A proteína recombinante ${}^6\text{His-STI1}$ liga preferencialmente na proteína GST-Rnd1. Foram imobilizadas em placa de poliestireno $1\mu\text{g}$ das proteínas BSA, GST e GST-Rnd1. Sítios não específicos foram bloqueados por 2h a temperatura ambiente com BSA na concentração final de 1%. Diferentes concentrações da proteína STI1 recombinante foram adicionadas aos poços e então incubadas por 16h a 37°C . Após uma série de lavagens com PBS a proteína recombinante STI1 foi detectada com o anticorpo anti-STI1 (1:3000) por 2h a temperatura ambiente. Após lavagens com PBS incubou-se o ensaio com anti-coelhoHRP (1:4000) e a reação foi revelada com OPD/ H_2O_2 e bloqueada com H_2SO_4 na concentração final de 1M. A absorbância foi medida em 490nm e feita a análise estatística com o auxílio do programa Prisma. * significa diferença estatística com relação ao controle GST ($p < 0.05$, ANOVA com pós-teste de Bonferroni). Ensaios representativos de treze (A) e seis (B) experimentos independentes. Os resultados sugerem interação direta e preferencial entre STI1 e Rnd1, entretanto com o aumento da concentração da proteína STI1 tal interação tende a diminuir (A). Em B verificamos que a redução nas concentrações da STI1 recombinante evita a redução na absorbância.

Essa característica da proteína STI1, em formar dímeros em solução, explicaria a redução da absorvância no ensaio de ligação a partir da concentração de 0,5µg da proteína recombinante $_6$ His-STI1. Diversas concentrações menores que 0,2 µg foram testadas para excluir a possibilidade de dimerização da proteína em função de uma concentração maior da proteína recombinante $_6$ His-STI1.

Análise do ensaio de ligação com concentrações menores da proteína $_6$ His-STI1 (figura 16 B) mostra que a interação preferencial entre as proteínas recombinantes GST-Rnd1 e a $_6$ His-STI1 se mantém. Entretanto, a redução na concentração de $_6$ His-STI1 não favoreceu o aumento na absorvância, observada na figura 16 A. Entretanto este dado não descarta o fato de que, concentrações maiores que 0,5µg podem favorecer à formação de dímeros da proteína $_6$ His-STI1 nas condições experimentais deste ensaio.

Outra observação relevante é a de que tanto no ensaio 16 A quanto no ensaio 16 B, a ligação da $_6$ His-STI1 com a proteína GST é menor se comparada com a ligação $_6$ His-STI1 e GST-Rnd1. Esses dados sugerem que a interação entre as proteínas GST-Rnd1 e $_6$ His-STI1 ocorre de forma direta, reforçando os dados dos ensaios de *pulldown* e co-imunoprecipitação.

Levando em consideração que todos os ensaios realizados até aqui caracterizam a interação bioquímica entre as proteínas estudadas, Rnd1 e STI1, o desafio maior estava por vir. A avaliação da relevância biológica para a interação entre Rnd1 e STI1 passou a ser o maior propósito do trabalho. Assim, diversas abordagens e modelos experimentais foram escolhidos com base em dados da literatura. Ensaio de neuritogênese, por exemplo, em diversas linhagens celulares como PC-12, N2a e SHSY-5Y foram realizados. O propósito foi de avaliar o efeito da interação entre Rnd1 e STI1 em modelos estabelecidos e sobre funções já descritas para as duas proteínas de interesse.

Observar se STI1 pode atuar como uma molécula capaz de regular a atividade da GTPase Rnd1, sem sombra de dúvidas, foi o maior foco desta investigação biológica.

4.10 Ensaio de neuritogênese em células PC-12, N2a e SHSY-5Y

4.10.1 Neuritogênese em células PC12

Células PC-12 são amplamente utilizadas como modelo para estudo *in vitro* da função de diversas moléculas relacionadas à fisiologia do sistema nervoso e inclusive, para a análise de neuritogênese e diferenciação celular (Read *et al.*, 2008, Greene *et al.*, 1976). Tais células são provenientes de tumor de glândula adrenal de rato e quando estimuladas com o fator de crescimento do nervo (NGF), são capazes de se diferenciarem em células semelhantes a neurônios simpáticos (Lindenbaum *et al.*, 1988, Morooka, T. e E. Nishida, 1998, Greene *et al.*, 1976). Assim, diversos mecanismos de sinalização relacionados à diferenciação celular e neuritogênese podem ser estudados. A linhagem celular PC-12 é, portanto, uma ferramenta de grande importância para o estudo da participação de diversas moléculas sobre características morfológicas e fisiológicas relacionadas a neurônios.

A análise dos resultados apresentados na figura 17, obtidos a partir da transfecção de células PC-12 para a expressão das proteínas de interesse, mostram que o evento de neuritogênese desencadeado pela expressão da quimera protéica GFP-Rnd1 (Aoki *et al.*, 2000) nas células PC-12 estão em concordância com dados da literatura. Tais resultados sugerem que a GTPase atuaria como uma precursora na promoção de extensão inicial de neuritos (figura 17 A), sendo que o posterior alongamento destas extensões estaria possivelmente a cargo de outras moléculas e de regulação gênica (Aoki *et al.*, 2000).

Ainda analisando a figura 17 A, é possível verificar que a neuritogênese desencadeada pela proteína GFP-STI1 (Lopes *et al.*, 2005) é menor se comparada com a obtida nas células transfectadas somente com GFP-Rnd1. Além disso, a condição GFP-STI1 apresenta diferença estatística no percentual de células com neuritos se comparada com o controle negativo (GFP).

O ensaio de neuritogênese sugere também, que a dupla transfecção parece reverter os efeitos da expressão da GTPase sozinha (figura 17 A) já que ocorre uma diminuição no percentual de células com neuritos. Entretanto, o gráfico 17 B mostra que não há diferença significativa no número de neuritos por célula, entre as células que foram transfectadas com as proteínas de interesse (GFP-Rnd1 e GFP-STI1 ou dupla transfecção). Assim, nas células que apresentaram neuritos, mesmo havendo

uma redução na neuritogênese, o número de neuritos por célula se mantém (figuras 17 A e B).

Outros aspectos da morfologia das células PC-12 transfectadas foram analisados. O comprimento médio dos neuritos (figura 17 C) estendidos pelas células e o percentual de células com neuritos maiores que 100 μ m (figura 17 D). A análise do gráfico que representa o comprimento médio dos neuritos (figura 17 C) mostra que, as células que foram duplamente transfectadas, com os vetores para a expressão de GFP-Rnd1 e GFP-STI1 apresentam os maiores neuritos na média. Podemos observar também, que as células que expressaram somente a quimera protéica GFP-Rnd1 também exibem neuritos longos (figura 17 C). A análise estatística não revela diferença significativa entre o comprimento médio das células que expressam somente GFP-Rnd1 e as que expressaram as duas quimeras, GFP-Rnd1 e GFP-STI1. Por esta razão, avaliou-se a extensão de prolongamentos maiores que 100 μ m.

A avaliação da extensão de neuritos mais longos é estatisticamente maior quando as duas proteínas, GFP-Rnd1 e GFP-STI1, são expressas juntas. Isso sugere que, a proteína quimérica GFP-STI1 pode atuar em conjunto com a GTPase quimérica GFP-Rnd1, reduzindo a neuritogênese iniciada pela ação da GFP-Rnd1 sobre as células PC-12, mas proporcionando o aumento do comprimento destes prolongamentos. Essa observação fica clara quando se avalia os dados relacionados à extensão dos neuritos (figuras 17 C e D). Fica evidente que GFP-STI1 promove a extensão de neuritos, entretanto quando comparamos o comprimento médio dos neuritos em células que superexpressam GFP-Rnd1 (figura 17 C) é possível perceber que os neuritos são maiores. Isso possivelmente se deve ao fato de que as células PC-12 expressem a proteína STI1 (figura 17 C - reação de *Western blot*), o que pode favorecer ao maior crescimento dos neuritos, na presença de um excesso da GTPase GFP-Rnd1. Cabe aqui salientar que não foi detectada a presença da proteína Rnd1 endógena por reações de *Western blot* feitas a partir de extratos de células PC-12 (dados não mostrados).

Outra observação importante é de que a extensão de prolongamentos mais longos, em células que foram duplamente transfectadas (figura 17 D) sugere a possibilidade de diferenciação celular. Tal hipótese pode ser justificada a partir de dados da literatura que associam a expressão tanto de Rnd3, outro membro da família das Rnds, quanto de STI1 e Rnd1 com a possível promoção de diferenciação

celular (Talens-Visconti *et al.*, 2010, Roffé *et al.*, 2010, Lopes *et al.*, 2005, Aoki *et al.*, 2000). Essa hipótese será avaliada a partir de reação de *Western blot* para avaliar a expressão de marcador para diferenciação em células PC-12.

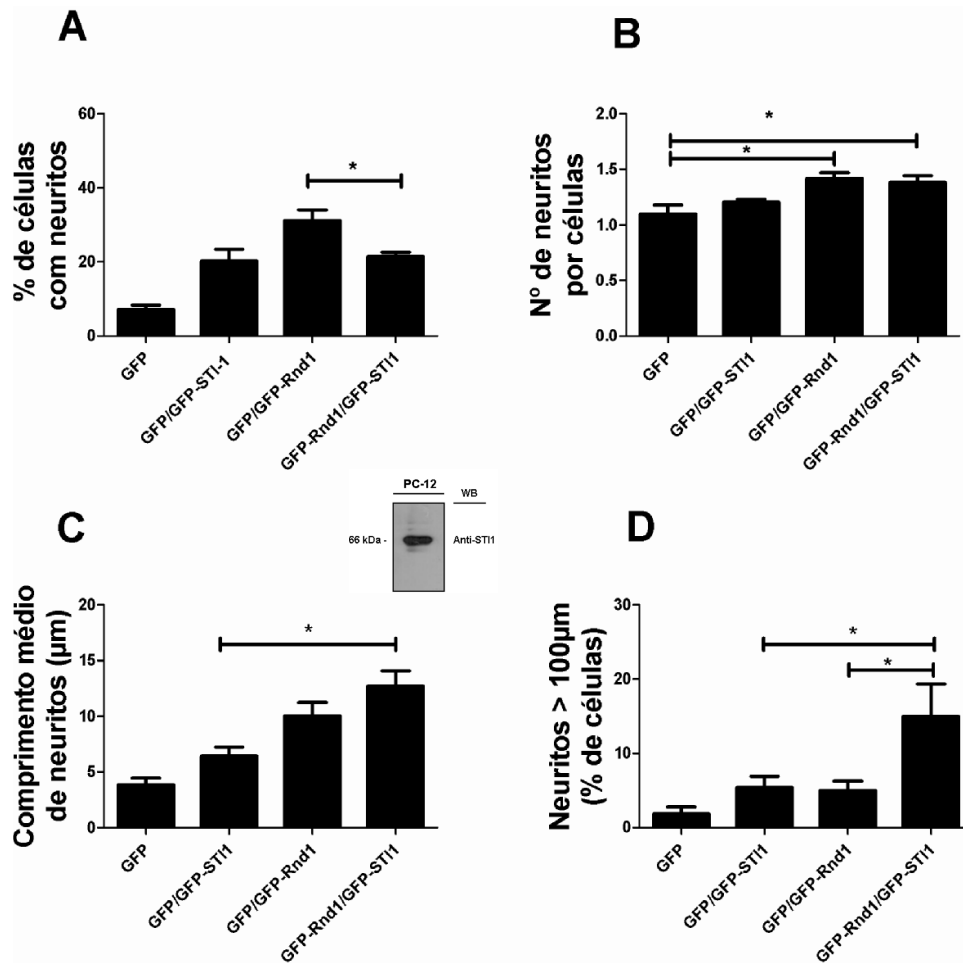


Figura 17. A interação entre STI1 and Rnd1 reduz a neuritogênese em células PC-12.

Células PC-12 foram transfectadas com a mesma massa total de DNA com os vetores para a expressão das proteínas GFP, GFP/GFP-STI1, GFP/GFP-Rnd1 e GFP-STI1/GFP-Rnd1. Os resultados sugerem que a interação entre STI1 e Rnd1 reduz o percentual de células com neuritos (A). Embora o número de neuritos por célula (B) e o comprimento médio destes neuritos (C) não apresentem diferença entre as condições GFP-Rnd1 e a dupla transfecção Rnd1/STI1, o percentual de células com neuritos > 100µm (D) sugere que tal interação estaria induzindo a extensão de neuritos mais longos. Em C podemos constatar que STI1 é expressa em células PC-12, entretanto não detectamos Rnd1 endógena nos extratos celulares testados por *Western blot*. Os resultados estatísticos representam a média \pm S.D. entre cinco experimentos independentes (200-400 células foram contadas por experimento). * indica diferença estatística entre os grupos (to $P < 0,0001$ ANOVA e pós-teste de Tukey).

4.10.2 Neuritogênese em células N2a

O ensaio de neuritogênese em células PC-12 revelou que, de fato, a interação entre as duas proteínas estudadas, Rnd1 e STI1, parece interferir na atividade do citoesqueleto regulada pela GTPase Rnd1. O uso de outra linhagem celular, como a Neuro-2a (N2a), foi empregada para tentar confirmar os resultados obtidos com as células PC-12. Uma diferença relevante é a de que as células N2a são originadas de um neuroblastoma de camundongo. Assim, esta linhagem pode ser considerada uma célula neuronal, nos aproximando ainda mais de um modelo próximo do biológico.

O ensaio foi realizado nas mesmas condições do ensaio com as células PC-12. A análise dos gráficos resulta em dados que corroboram os obtidos anteriormente (figura 17). O percentual de células com neuritos nas células transfectadas com a GFP-Rnd1 foi estatisticamente diferente e maior se comparado às demais condições experimentais (Figura 18 A). É evidente também que só houve diferença no número de neuritos quando as condições experimentais foram comparadas ao controle negativo (células transfectadas com o vetor vazio). Isso sugere que as proteínas de interesse, tanto Rnd1 quanto STI1, estão induzindo a extensão de neuritos. Como observado na figura 17 B, o resultado se repete, sugerindo que de fato o número de neuritos por células não é diferente em células que superexpressam GFP-STI1, GFP-Rnd1 ou ambas.

É interessante notar que os neuritos estendidos em células N2a transfectadas, com diferentes vetores codificadores para as proteínas estudadas, são maiores na média. É possível verificar que, as células que expressam a quimera GFP-STI1 possuem neuritos com aproximadamente 60 μm de comprimento (figura 18 C). Estes neuritos por sua vez são maiores se comparados com a mesma condição experimental das células PC-12 (figura 17 C). Os neuritos emitidos pelas células N2a, transfectadas com o vetor para a expressão da quimera GFP-Rnd1 também são mais longos se comparados com os das células PC-12. Essas diferenças talvez tenham relação com a natureza neuronal das células N2a, que por este motivo possam estender prolongamentos mais longos.

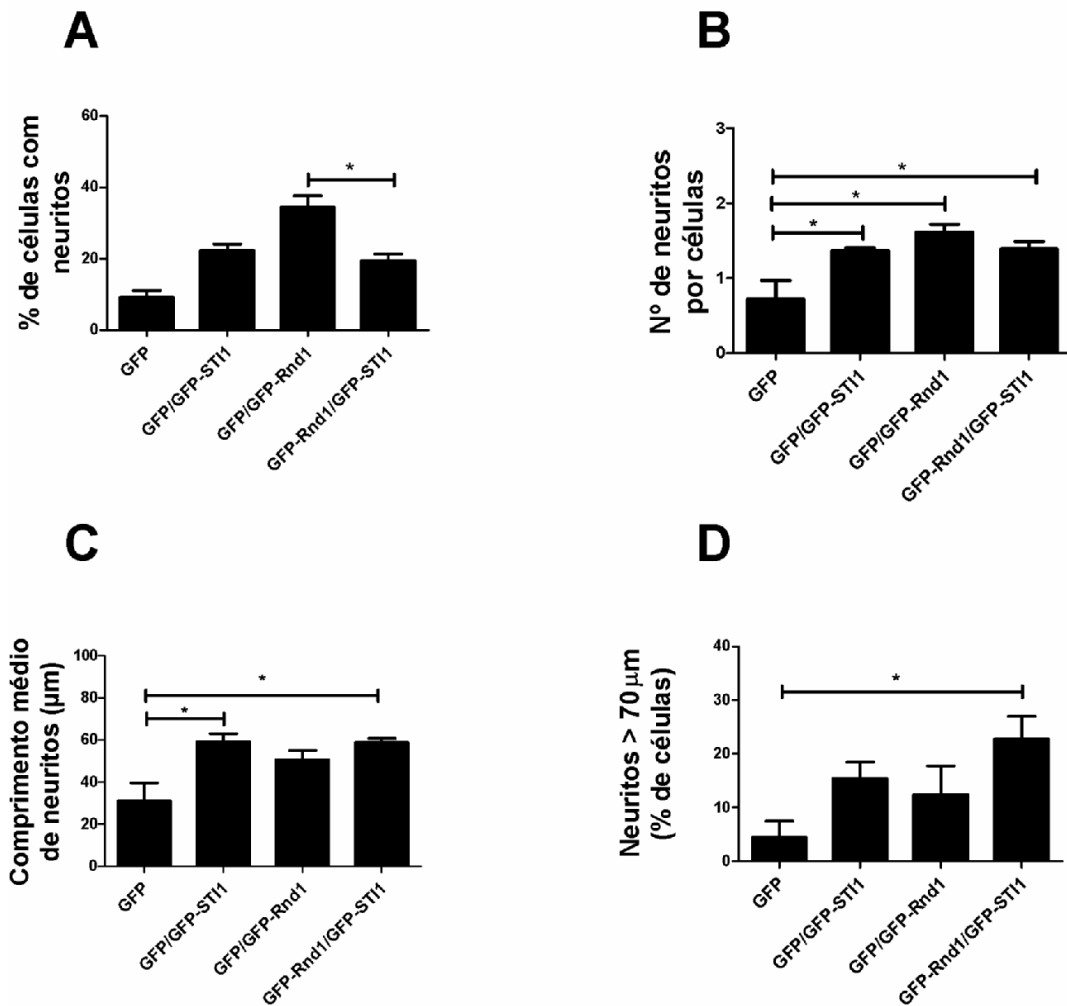


Figura 18. A interação entre STI1 and Rnd1 reduz a neuritogênese em células N2a. Células N2a foram transfectadas com a mesma massa total de DNA com os vetores para a expressão das proteínas GFP, GFP/GFP-STI1, GFP/GFP-Rnd1 e GFP-STI1/GFP-Rnd1 nas mesmas condições experimentais das células PC-12. Os resultados sugerem que a interação entre STI1 e Rnd1 reduz o percentual de células com neuritos (**A**). Embora o número de neuritos por célula (**B**) e o comprimento médio destes neuritos (**C**) não apresentem diferença entre as condições GFP-Rnd1 e a dupla transfecção Rnd1/STI1, o percentual de células com neuritos > 70µm apresenta uma tendência de diferença, (**D**) sugerindo que tal interação estaria induzindo, também nesta linhagem celular, a extensão de neuritos mais longos. Os resultados estatísticos representam a média \pm S.D. entre quatro experimentos independentes (200-400 células foram contadas por experimento). * indica diferença estatística entre os grupos (to $P < 0,001$ ANOVA e pós-teste de Tukey).

Outra diferença entre as células N2a e as PC-12 é que, nas últimas os prolongamentos neuríticos são maiores (figura 17 D), se comparados aos das N2a (figura 18 D). Entretanto, podemos verificar que o percentual de células com neuritos maiores que 70µm, nas células duplamente transfectadas com as quimeras GFP-Rnd1 e GFP-STI1 (figura 18 D), que podem corresponder a neuritos maduros, é maior se comparado às demais condições experimentais. Outro dado interessante é que nas células N2a, o percentual de células com neuritos mais longos (70 µm) é maior se comparado com o percentual de células com neuritos longos nas células PC-12 (100 µm) na mesma condição experimental (GFP-Rnd1/GFP-STI1). Nas células N2a, aproximadamente 15% das células que expressaram a quimera GFP-STI1 (figura 18 D), fizeram neuritos longos, dado morfológico, que também é maior em relação às células PC-12 (figura 17 D).

4.10.3 Neuritogênese em células SHSY-5Y

A utilização das células N2a, deixou claro que a proteína GFP-STI1 regula a atividade neuritogênica da GTPase GFP-Rnd1. Essa regulação fica evidente à medida que o percentual de células estendendo neuritos tanto em PC-12 quanto em células N2a se reduz. A capacidade da GTPase Rnd1 em desencadear a neuritogênese já é bem conhecida e descrita na literatura (Aoki *et al.*, 2000, Li *et al.*, 2009), entretanto a sua regulação é que ainda é discutida e estudada. Por este motivo é fundamental caracterizar de forma segura a possibilidade de a proteína STI1 atuar como uma proteína reguladora da atividade GTPásica intrínseca da proteína Rnd1. Por este motivo, o uso de uma terceira linhagem celular foi empregada para estudar a regulação da proteína STI1 sobre a neuritogênese induzida pela proteína Rnd1. Assim, escolheu-se a linhagem celular de neuroblastoma humano SHSY-5Y (figura 19). A escolha desta linhagem engloba pelo menos três espécies de mamíferos de interesse, sendo que esta última envolve um primata superior.

As condições experimentais para a análise da neuritogênese nas células SHSY-5Y, seguiu o mesmo protocolo utilizado tanto para as células PC-12 quanto para as células N2a. Desta forma, a comparação dos resultados, levando em

consideração a origem das células e as particularidades características das espécies que as originaram, favorece uma análise mais ampla e segura da atividade reguladora da proteína STI1 sobre a proteína Rnd1.

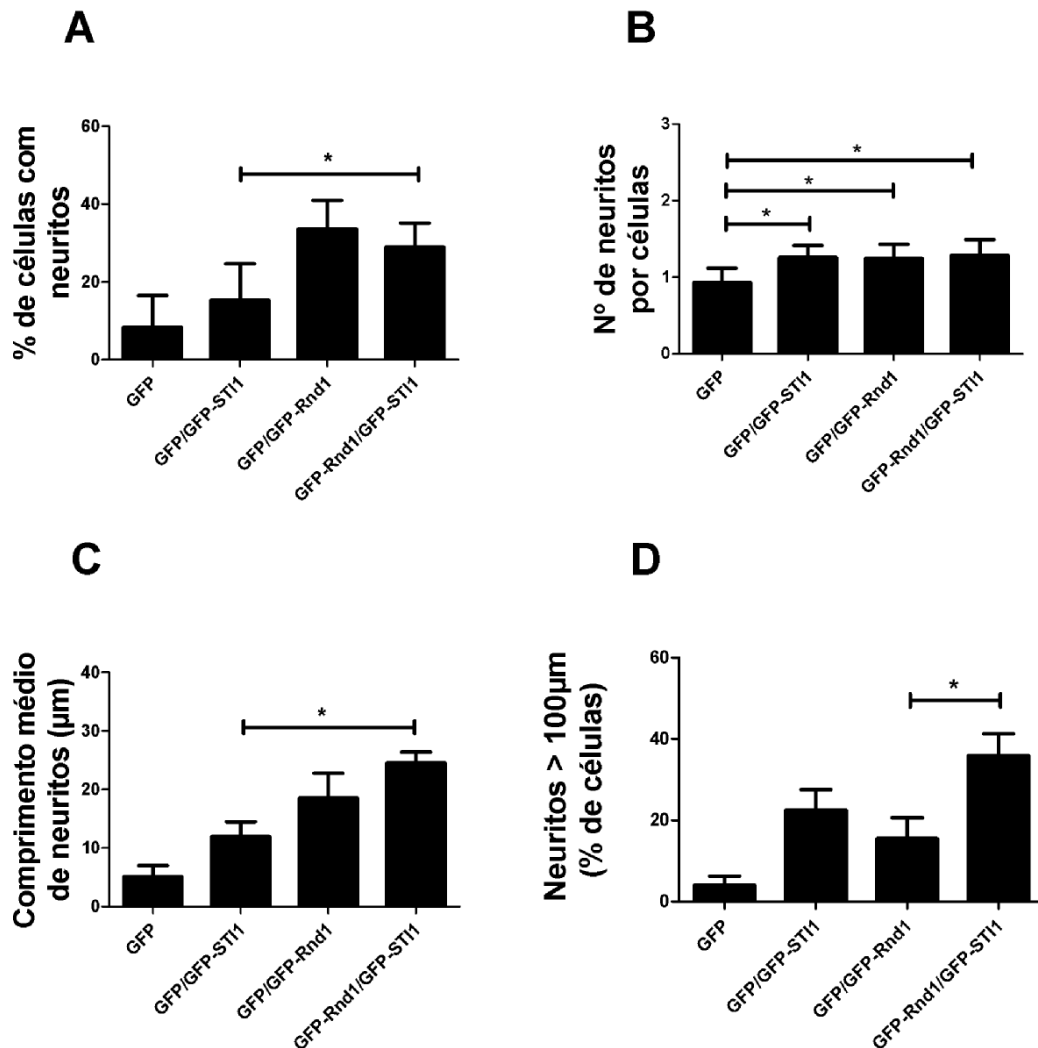


Figura 19. A interação entre STI1 and Rnd1 reduz a neuritogênese em células SHSY-5Y.

Células SHSY-5Y foram transfectadas com a mesma massa total de DNA com os vetores para a expressão das proteínas GFP, GFP/GFP-STI1, GFP/GFP-Rnd1 e GFP-STI1/GFP-Rnd1 nas mesmas condições experimentais das células PC-12. Os resultados sugerem que a interação entre STI1 e Rnd1 mostra uma tendência em reduzir o percentual de células com neuritos (A). Embora o número de neuritos por célula (B) e o comprimento médio destes neuritos (C) não apresentem diferença entre as condições GFP-Rnd1 e a dupla transfecção Rnd1/STI1, o percentual de células com neuritos > 100µm apresenta diferença estatística significativa (D) sugerindo que tal interação estaria induzindo, também nesta linhagem celular, a extensão de neuritos mais longos. Os resultados estatísticos representam a média \pm S.D. entre quatro experimentos independentes (200-400 células foram contadas por experimento). * indica diferença estatística entre os grupos (to $P < 0,001$ ANOVA e pós-teste de Tukey).

Assim, analisando os resultados obtidos com a neuritogênese nas células SHSY-5Y (figura 19), podemos constatar que aproximadamente 30% das células que foram transfectadas com o vetor para a expressão da proteína GFP-Rnd1 fizeram neuritos (figura 19 A). Este resultado se assemelha ao observado na figura 17 A, para a mesma condição experimental. Corroborando dados da literatura que mostram que Rnd1 é responsável por promover a neuritogênese tanto em células PC-12 quanto em neurônios em cultura primária (Li *et al.*, 2009, Aoki *et al.*, 2000). Entretanto a redução na neuritogênese induzida pela atividade da proteína GFP-STI1 foi observada (figura 19 A), mas não houve diferença estatística em relação à dupla transfecção. As células que expressaram as proteínas GFP-STI1, GFP-Rnd1 e as duplamente transfectadas (GFP-STI1 e GFP-Rnd1) apresentaram mais neuritos por células (figura 19 B) quando comparadas ao controle GFP. Esse dado reforça a hipótese de atividade das proteínas de interesse sobre a regulação da morfologia celular das células SHSY-5Y.

Podemos concluir também pela análise do gráfico 19 C, que o comprimento médio dos neuritos nas células SHSY-5Y, transfectadas com os dois vetores para a expressão das quimeras GFP-Rnd1 e GFP-STI1 foi maior se comparado às demais condições experimentais. Podemos perceber que tais neuritos atingiram mais de 20 μ m de comprimento, sendo esta medida estatisticamente maior se comparada às células que expressaram somente GFP-STI1. Interessantemente, as células que expressaram somente GFP-Rnd1 apresentaram uma tendência em ter neuritos mais longos, em média, se comparados aos apresentados pelas células que expressaram somente GFP-STI1.

O percentual de células com neuritos mais longos, observados nos ensaios com as células PC-12 (figura 17 D) e N2a (figura 18 D), também puderam ser confirmados na neuritogênese em células SHSY-5 (figura 19 D). Podemos perceber que, as células que expressaram as duas proteínas estudadas (GFP-STI1 e GFP-Rnd1), estenderam neuritos mais longos, maiores que 100 μ m. Esse resultado deixa claro que, de fato, de alguma forma a superexpressão de GFP-STI1 em conjunto com a GTPase GFP-Rnd1 está regulando a atividade desta última sobre o citoesqueleto das células analisadas (figuras 17, 18 e 19). Esse dado é de grande relevância uma vez que as proteínas da família Rnd, da qual Rnd1 compartilha suas características principais, estão constitutivamente ativas (Nobes *et al.*, 1998). Portanto,

descobrir ou propor formas pela qual tais moléculas são reguladas é um dos grandes focos do estudo destas proteínas.

4.11 Ensaios de diferenciação celular em PC-12

4.11.1 Expressão de neurofilamento médio (145 kDa) como marcador de diferenciação celular em células PC-12

Os diversos ensaios de neuritogênese realizados com as três linhagens celulares escolhidas apontaram para uma característica em comum. Todas as células estudadas apresentaram neuritos longos (100µm em PC-12 e SHSY-5Y e 70µm em N2a) quando expressaram GFP-STI1 e GFP-Rnd1 juntas. Esse dado chamou a atenção, em especial nas células PC-12, de que possivelmente a superexpressão das duas proteínas estivesse promovendo a diferenciação das células PC-12, tal como o NGF faz (Read *et al.*, 2008, Waetzig *et al.*, 2003, Cowley *et al.*, 1994). Essa hipótese pode ser reforçada pelo fato de que tanto Rnd1 quanto STI1 estarem relacionadas ao processo de diferenciação celular tanto em neurônios em cultivo primário quanto em células PC-12 (Roffé *et al.*, 2010, Lopes *et al.*, 2005, Aoki *et al.*, 2000).

Em razão da hipótese levantada de possível diferenciação celular das células PC-12 nos ensaios de neuritogênese, decidiu-se avaliar a expressão de neurofilamento médio (145 kDa), como marcador de tal evento celular (Lindenbaum *et al.*, 1988, Greenberg *et al.*, 1985). Para atingir este propósito, células PC-12 foram transfectadas e cultivadas nas mesmas condições experimentais utilizadas nos ensaios de neuritogênese, apresentados na figura 17. Como controle positivo da diferenciação celular das PC-12 utilizou-se o NGF.

É possível verificar que as células foram devidamente transfectadas (figura 20 painel central) com as proteínas de interesse. É visível também que as células que foram tratadas com o NGF (100ng/mL) expressaram a proteína neurofilamento médio (figura 20, painel superior). Esse dado reforça a vasta literatura que evidencia o papel do NGF, na promoção da diferenciação de células PC-12 em células semelhante a neurônio simpáticos (Waetzig *et al.*, 2003, Cowley *et al.*, 1994, Read, *et*

al, 2008, Pesheva et al, 2000). Desta forma, este dado, valida o modelo escolhido para a análise da possível participação das proteínas GFP-STI1 e GFP-Rnd1, na promoção da diferenciação das células PC-12 em células semelhantes a neurônios.

A reação de *Western blot* com o anticorpo anti-neurofilamento revela que a super expressão da quimera GFP-STI1 sozinha já é capaz de induzir a expressão do neurofilamento médio. Esse resultado encontra suporte na literatura, pois já é conhecida a participação de STI1 nos eventos moleculares relacionados à diferenciação de neurônios e astrócitos (Roffé *et al.*, 2010, Arantes *et al.*, 2009, Lopes *et al.*, 2005). Entretanto, podemos perceber que há um aparente e pequeno aumento na expressão da proteína neurofilamento médio, na canaleta onde foi aplicada a amostra proveniente das células que expressaram as proteínas GFP-STI1 e GFP-Rnd1 (figura 20, painel superior). Esse resultado corrobora a hipótese de que a dupla STI1 e Rnd1 possam estar atuando em conjunto favorecendo a extensão de prolongamentos neuríticos maduros e por esta razão, mais longos. A reação com o anticorpo anti- β actina (figura 20, painel inferior), foi utilizada como controle da quantidade de proteína aplicada por poço do gel.

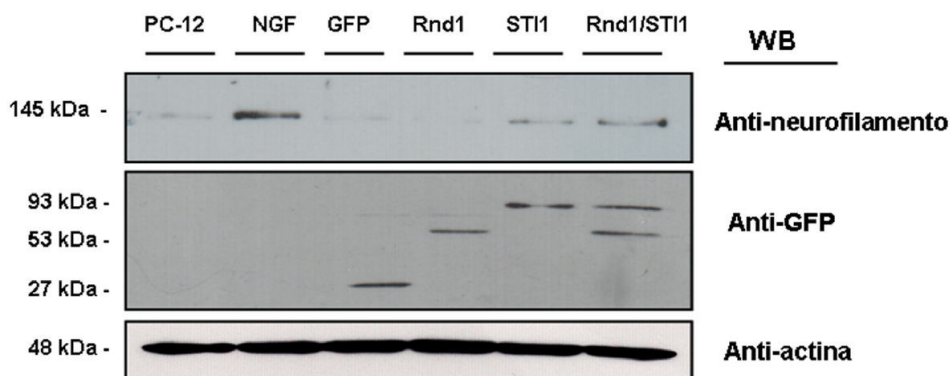


Figura 20. A interação STI1 e Rnd1 induz diferenciação de células PC-12. Células PC-12 foram transfectadas com vetores para a expressão das proteínas GFP, GFP/GFP-STI1, GFP/GFP-Rnd1 e GFP-STI1/GFP-Rnd1. O ensaio de diferenciação evidencia que a expressão das proteínas GFP-Rnd1 e GFP-STI1 juntas nas células PC-12 induz a expressão do neurofilamento médio (145 kDa) que é um marcador de diferenciação nesta linhagem celular. As Células PC-12 quando estimuladas com NGF, usadas como controle positivo deste ensaio, expressam a proteína neurofilamento médio. Entretanto a superexpressão da quimera GFP-STI1 já induz a expressão de neurofilamento médio.

O dado apresentado ainda não responde de que forma a interação entre Rnd1 e STI1 poderia atuar na regulação da diferenciação celular em células PC-12. Por esta razão, decidiu-se avaliar a atividade das proteínas ERK 1/2, via de sinalização esta, já descrita como envolvida diretamente na diferenciação de células PC-12 quando estimuladas com o NGF (Read *et al.*, 2008, Waetzig *et al.*, 2003, Pesheva *et al.*, 2000, Cowley *et al.*, 1994).

4.11.2 Atividades das proteínas ERK 1/2

Células PC-12 foram transfectadas e cultivadas como descrito em material e métodos. O ensaio de avaliação da atividade de ERK 1/2 foi conduzido nas mesmas condições experimentais descritas para os ensaios de neuritogênese e de expressão de neurofilamento médio (145 kDa).

Utilizou-se de duas abordagens distintas para avaliar a atividade de ERK 1/2, a primeira (figura 21 A) foi a reação de *Western blot* a partir dos extratos celulares das células PC-12. A segunda envolveu a imunoprecipitação da forma ativa das proteínas ERK 1/2 a partir da mesma massa protéica dos diferentes extratos de células PC-12 transfectadas.

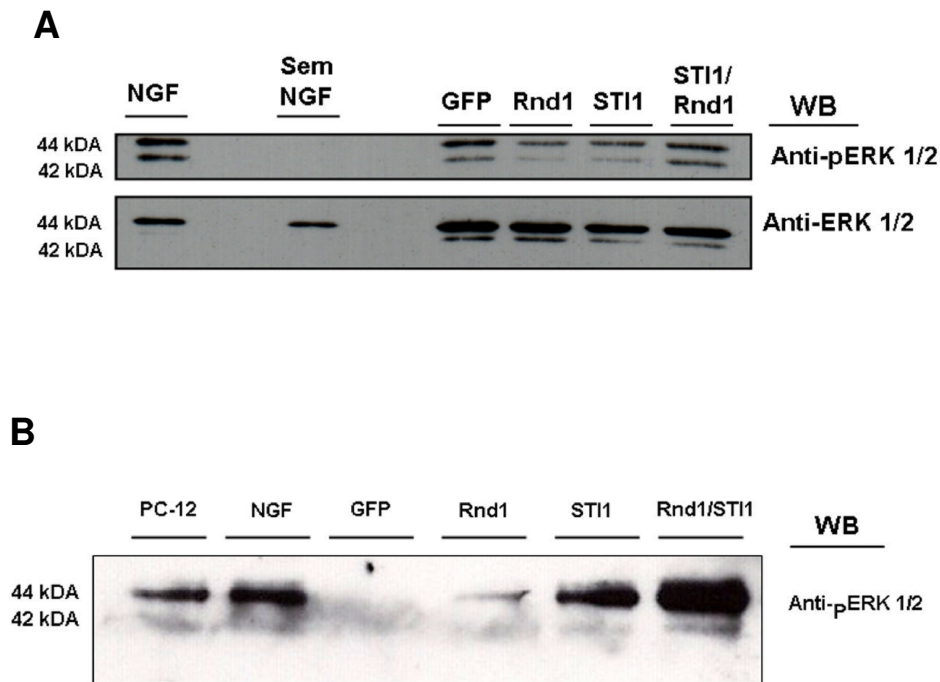


Figura 21. Co-expressão de STI1 e Rnd1 induz maior atividade de ERK 1/2.

Células PC-12 foram transfectadas com vetores para a expressão das proteínas GFP, GFP/GFP-STI1, GFP/GFP-Rnd1 e GFP-STI1/GFP-Rnd1. **A)** 80µg de extrato total de células PC-12 foram separadas em gel SDS-PAGE 12% e foram eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose. As membranas foram reagidas contra anti-pERK 1/2 (1:100) em seguida com anti-ERK1/2 total. O ensaio de diferenciação evidencia que a expressão das proteínas GFP-Rnd1 e GFP-STI1 juntas nas células PC-12 induz maior atividade das proteínas ERK 1/2. **B)** O ensaio de imunoprecipitação, a partir de extratos de células transfectadas nas mesmas condições do ensaio **A**, com o anti-pERK 1/2 corrobora a hipótese de que a diferenciação das células PC-12 pode ocorrer através da ativação da via de ERK 1/2. As figuras A e B representam 1 ensaio preliminar para cada experimento.

Podemos verificar pela análise da reação de *Western blot* da figura 21 A (painel superior), que houve um aparente aumento na fosforilação da proteína ERK 1/2 na canaleta correspondente à amostra das células que foram transfectadas com as duas proteínas, GFP-STI1 e GFP-Rnd1. Entretanto, nesta mesma reação podemos verificar que há um sinal basal relevante na canaleta correspondente ao controle negativo GFP. Contudo, é evidente que há uma atividade maior de ERK onde as duas proteínas de interesse foram expressas. Quando analisamos a atividade de ERK 1/2, nas células que expressaram somente GFP-STI1 ou GFP-Rnd1 observamos diferença visual na reação, entretanto em ensaios futuros as bandas deverão ser submetidas à análise densitométrica para a confirmação de diferenças na atividade de ERK 1/2. Outro fato relevante de se comentar é o de que

as células tratadas com NGF apresentaram a maior atividade da proteína ERK 1/2, quando comparadas às demais condições experimentais do ensaio. Mais uma vez, o controle positivo do ensaio corrobora a eficiência do método escolhido para a análise da diferenciação celular nas células PC-12.

Apesar da reação com o anticorpo contra a forma total não ter evidenciado a forma de 42 kDa da proteína ERK (figura 21 A, painel inferior), podemos perceber, pela marcação da proteína ERK de 44 kDa, que foi aplicada a mesma massa de proteína total nas canaletas. O problema em detectar a proteína ERK total de 42 kDa, pode ser explicado por uma possível menor expressão da forma de 42 kDa nesta linhagem celular, ou em razão das condições experimentais do ensaio.

A figura 21 B mostra o resultado do ensaio de imunoprecipitação da ERK 1/2 fosforilada. Para realizar este ensaio células PC-12 foram transfectadas e cultivadas como descrito para o ensaio de *Western blot*. Para a imunoprecipitação utilizou-se 200µg de extrato total de cada condição experimental e o anticorpo monoclonal anti-pERK1/2 covalentemente ligado em resina de hidrazida-agarose (Cell Signaling).

A maior atividade da proteína ERK 1/2 nas células que expressaram as proteínas GFP-STI1 e GFP-Rnd1, observadas no ensaio da figura 21 A, foi confirmada nesta imunoprecipitação (figura 21 B). Com isso fica evidente que a interação entre as proteínas GFP-Rnd1 e GFP-STI1, de alguma forma está ativando a via clássica de ERK 1/2, o que em células PC-12 está diretamente relacionada à diferenciação celular (Waetzig *et al.*, 2003). Esses dados analisados em conjunto com os de neuritogênese, sugerem atuação em sinérgica entre Rnd1 e STI1 nos eventos celulares associados à extensão de neuritos e a promoção do estabelecimento de neuritos maduros.

Os ensaios de neuritogênese e de diferenciação celular (figuras 20 e 21) deixaram evidente a participação das duas proteínas tanto na regulação da neuritogênese quanto na expressão de neurofilamento médio e na ativação da via ERK 1/2, promovendo a organização de neuritos mais complexos. Entretanto em 2002(b), Zanata e colaboradores mostraram a participação da GTPase Rnd1 na regulação do colapso de cones de crescimento, estruturas localizadas na extremidade de neuritos, em neurônios da raiz ganglionar de camundondos e em células COS-7 em resposta a proteína Semaforina-3A (Sema-3A). Assim, decidiu-se avaliar se a interação Rnd1/STI1 poderia de alguma forma interferir na capacidade

de Rnd1 em promover a desorganização do citoesqueleto de actina em células COS-7.

4.12 Ensaio de colapso do citoesqueleto em células COS-7

Zanata e colaboradores (2002b) mostraram que somente a porção citoplasmática da proteína plexina-A1 (Plex-A1), sendo expressa em conjunto com a quimera GFP-Rnd1, seria capaz de promover o colapso do citoesqueleto em aproximadamente 60% de células COS-7 transfectadas. Por este motivo, decidiu-se avaliar o efeito de STI1 dentro deste modelo já bem caracterizado.

A figura 22 A mostra imagem das células COS-7 nas diversas condições experimentais analisadas. Nas células que representavam controles negativos (STI1/Rnd1 e PlexA1/STI1) podemos verificar a morfologia normal e característica desta linhagem celular. Entretanto, no controle positivo, que são as células que expressaram a proteína Plex-A1 e GFP-Rnd1, podemos observar a alteração morfológica causada nas células. Esta alteração é decorrente da desorganização do citoesqueleto cortical de actina, causado pela atividade da interação entre GFP-Rnd1 e o domínio citoplasmático da plexina-A1 (Zanata et al., 2002b). A expressão de GFP-STI1 dramaticamente reverte o efeito colapsante induzido pela Plex-A1/GFP-Rnd1 (comparar PlexA1/GFP/Rnd1 com PlexA1/Rnd1/STI1).

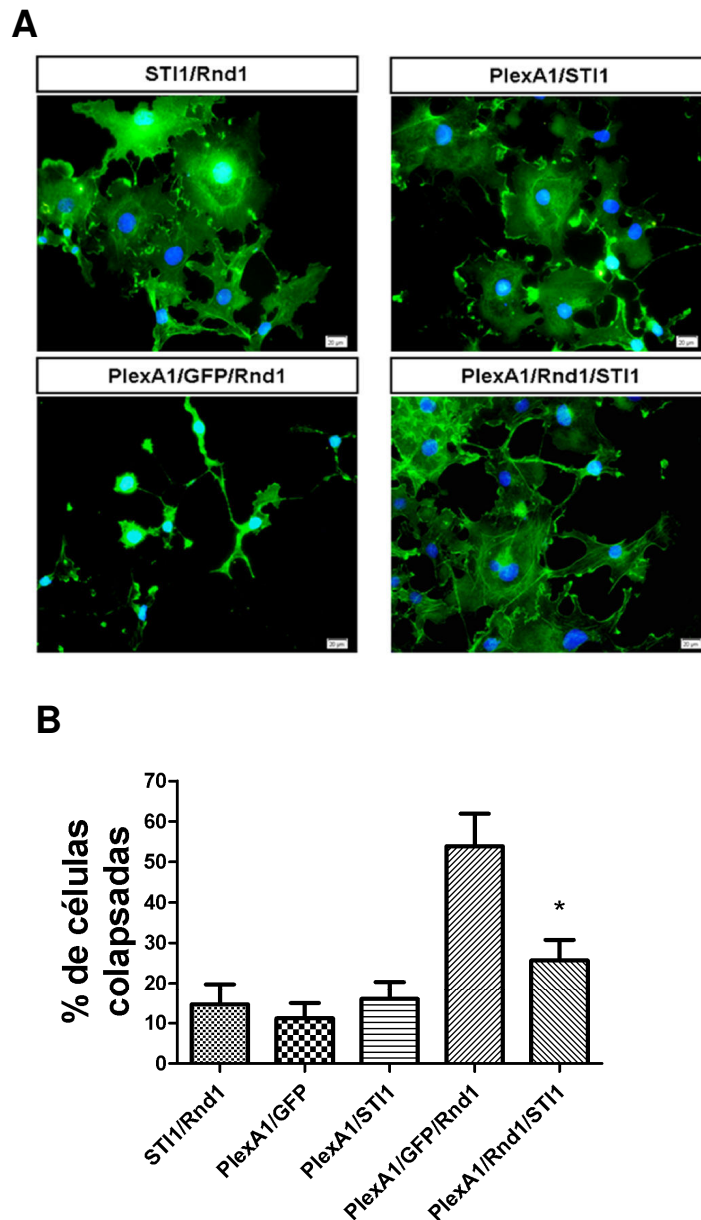


Figura 22. ST11 reverte o efeito de colapso do citoesqueleto mediado pela interação da proteína Rnd1 e a porção citoplasmática da plexina-A1. Células COS-7 foram transfectadas com vetores para a expressão das proteínas myr-myc-PlexinA1 (PlexA1), GFP, EGFP-Rnd1 (Rnd1), EGFP-ST11 (ST11) como indicado nas figuras. Após fixação as células foram marcadas com faloidina-FITC (Barra de escala 20 μ m) e as imagens capturadas em microscópio Olympus. Aspecto das células COS-7 nas diversas condições experimentais analisadas neste ensaio (**A**). O percentual de células colapsadas em resposta às diferentes condições experimentais (**B**) foram determinadas de acordo com Zanata *et al.* (2002). ST11 reverte o efeito de desorganização do citoesqueleto promovido pela interação Rnd1/Plex-A1. Estes resultados sugerem que a ST11 citoplasmática regula a atividade da GTPase Rnd1 sobre o citoesqueleto de actina das células COS-7. Os Resultados representam \pm S.D. entre os oito experimentos independentes. * indica diferença estatística entre os grupos ($P < 0,0001$ ANOVA e Tukey's post teste).

A quantificação apresentada na figura 22 B mostra que a expressão da proteína GFP-STI1 foi capaz de reverter o efeito da interação Rnd1/PlexA1cit, em aproximadamente 50% das células, reforçando desta forma o papel da proteína GFP-STI1 na regulação da atividade da proteína GFP-Rnd1 na indução de colapso do citoesqueleto (figura 22 B). O modelo empregado vai ao encontro de dados da literatura (Zanata *et al.*, 2002b), uma vez que aproximadamente 60% das células transfectadas com os vetores para a expressão da PlexA1 e GFP-Rnd1 sofreram colapso do citoesqueleto. A possível interação GFP-STI1 e a PlexA1cit foi descartada em ensaios de *pulldown* (dados não mostrados), sugerindo assim que o fenômeno observado seja resultado da interação Rnd1-STI1 e não de uma possível interação PlexA1-STI1.

É possível constatar que tanto a proteína endógena STI1 presente em células PC-12 quanto a quimera GFP-STI1 e a proteína endógena expressa em células 293T, transfectadas pelo método de precipitação de cálcio, podem ser recuperadas de meio condicionado das respectivas linhagens celulares (dados não mostrados). Tais resultados sugerem que a quimera protéica GFP-STI1 possivelmente expressa e secretada pelas células COS-7 transfectadas poderia ser responsável, também, pelo efeito regulatório sobre a GTPase GFP-Rnd1. Por este motivo, decidiu-se avaliar se a proteína recombinante δ His-STI1 exerceria o mesmo efeito regulatório sobre a GTPase quimérica GFP-Rnd1 em ensaio de colapso do citoesqueleto em células COS-7.

4.13 Ensaio de colapso do citoesqueleto em células COS-7 e o efeito da proteína STI1 recombinante

Para responder à pergunta se a proteína STI1 eventualmente secretada pelas células COS-7, poderia atuar na regulação da atividade da GFP-Rnd1 sobre o citoesqueleto destas células, como observado na figura 22 B, ensaios de colapso foram realizados na presença de diferentes concentrações da proteína recombinante $^6\text{His-STI1}$ (figura 23, mostrado apenas $2\mu\text{M}$).

Quando as células transfectadas na condição de colapso (PlexA1/GFP/GFP-Rnd1) foram incubadas com $^6\text{His-STI1}$ ($2\mu\text{M}$) observamos uma reversão de aproximadamente 30% no colapso induzido pela interação PlexA1/Rnd1 (grupos DMEM e BSA são estatisticamente iguais, figura 23). Estes parâmetros são semelhantes àqueles observados quando STI1 é co-expressa com PlexA1/Rnd1 (não há diferença entre os grupos $^6\text{His-STI1}$ e P/R/S, na figura 23). Desta forma, este resultado reforça a hipótese de que a proteína STI1 eventualmente secretada pelas células COS-7, pode de fato ser internalizada, e então, regular a atividade de GFP-Rnd1.

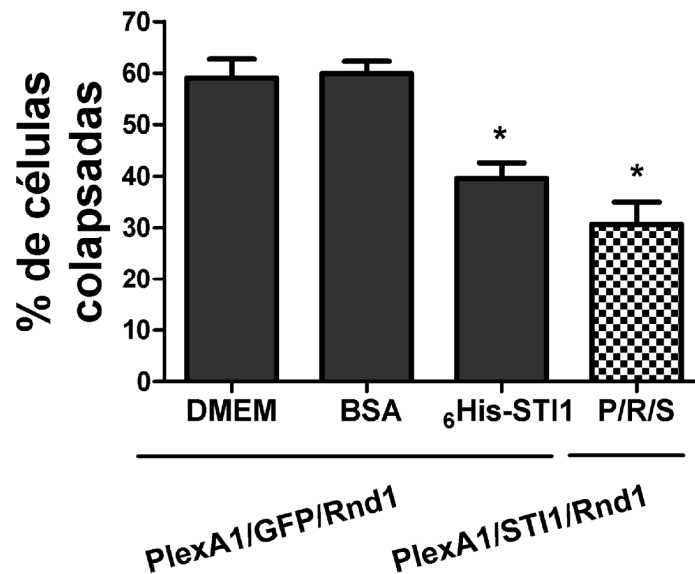


Figura 23. STI1 reverte o efeito de colapso do citoesqueleto mediado pela interação da proteína Rnd1 e a porção citoplasmática da plexina-A1. Células COS-7 foram transfectadas com vetores para a expressão das proteínas myr-myc-PlexinA1 (PlexA1), GFP, EGFP-Rnd1 (Rnd1), EGFP-STI1 (STI1) como indicado nas figuras. Utilizou-se a proteína ϵ His-STI1 na concentração final de $2\mu\text{M}$ sobre células COS-7 transfectadas. As células foram incubadas por 30 minutos a 37°C , com a proteína recombinante, para simular um possível papel da STI1 secretada. Neste caso, observou-se também redução no percentual de células colapsadas. Estes resultados sugerem que STI1 pode ser secretada, internalizada e então regular a atividade da GTPase Rnd1 dentro da célula ou então a STI1 citoplasmática atuaria diretamente sobre Rnd1 independente de ser secretada, como sugere o ensaio na figura 19. Os Resultados representam \pm S.D. entre os experimentos e * indica diferença estatística entre os grupos ($P < 0,001$ ANOVA e Tukey's post teste).

Os dados biológicos apresentados até este momento evidenciam que a interação entre as proteínas STI1 e Rnd1 tem de fato importância biológica. Essa observação se deve ao fato de que em todos os ensaios realizados e descritos até o momento, a presença da proteína STI1 foi capaz de regular, reduzindo a atividade esperada para a proteína Rnd1 sobre as células. Soma-se a estas evidências de regulação de atividade, os resultados que mostram uma atuação em conjunto das duas proteínas na promoção da diferenciação de células PC-12.

A ativação de receptores da família Trk, especificamente TrkA pelo fator de crescimento do nervo (NGF) está intimamente relacionado à promoção da diferenciação celular de células PC-12 em células semelhantes a neurônios simpáticos (Limpert *et al.*, 2007, Weatzig *et al.*, 2003). Também já é bem estabelecido que o receptor para NGF, TrkA está localizado nos microdomínios de membrana ricos em colesterol, os *lipid rafts* (Limpert *et al.*, 2007). Esse dado da

literatura levantou a hipótese de que tanto STI1 quanto Rnd1 poderiam estar localizadas nestes microdomínios de membrana. Assim, foi necessária a padronização da técnica de purificação de *lipid rafts* que possibilitasse o estudo da presença das proteínas Rnd1 e STI1 nestes domínios de membrana.

4.14 Purificação dos *lipid rafts*

4.14.1 A padronização da técnica

A padronização da técnica de purificação de *lipid rafts* foi feita exatamente como descrito em material e métodos (Keshet *et al.*, 2000, Naslavsky *et al.*, 1997). A purificação destes microdomínios ricos em colesterol e esfingolípídios é baseada na insolubilidade dos *lipid rafts* em Triton X-100 a 4°C e na diferença de densidade destes microdomínios. Os *lipid rafts* têm baixa densidade e quando purificados em um gradiente linear de Nycodenz, acabam por flutuar neste gradiente, se acumulando nas frações menos densas. Neste protocolo padronizado, os *lipid rafts* se concentram na parte superior do tubo (TOPO) da ultracentrífuga. As frações de membranas solúveis em Triton X-100 a 4°C e o conteúdo citoplasmático das amostras ficam concentradas na porção mais densa do gradiente, localizadas em direção ao fundo do tubo da ultracentrífuga.

Após a ultracentrifugação, são coletadas 13 frações do topo (menos denso) ao fundo (mais denso) do tubo, os *lipid rafts* estão localizados nas primeiras frações (geralmente entre a terceira e a sexta fração) enquanto as frações de membrana solúveis em Triton X-100 a 4°C, daqui por diante chamadas de *fração solúvel*, a partir da sétima até a última (Keshet *et al.*, 2000, Naslavsky *et al.*, 1997). Alíquotas de cada uma das frações foram analisadas por *Coomassie* (figura 24 A) e *Western blot* com o anticorpo policlonal anti-PrP^C (figura 24 B), a qual foi empregada como marcador de *lipid rafts* em nossos ensaios (Keshet *et al.*, 2000).

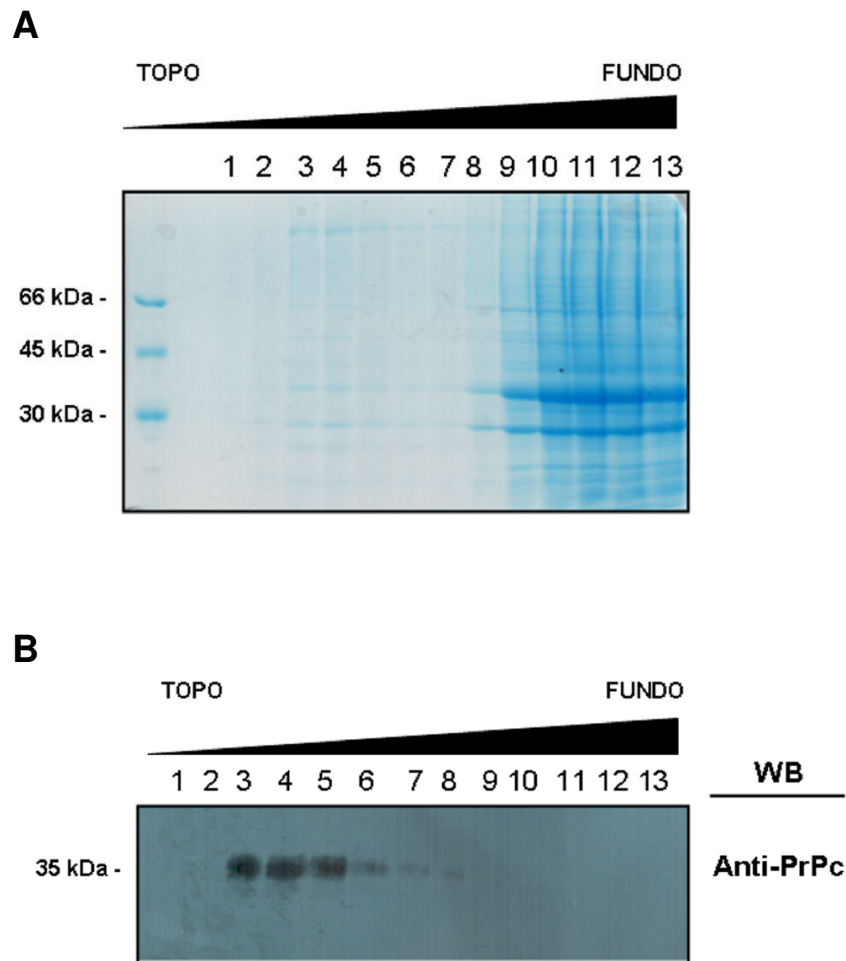


Figura 24. Purificação de lipid rafts. *Lipid rafts* foram purificados a partir de amostras de cérebro de camundongos. Treze frações de 180 μ L foram coletadas a partir de um gradiente linear de Nycodenz em tampão TNE (NaCl 150mM, Tris-HCl 25mM pH 7.5, EDTA 5mM e 1% Triton X-100 e acrescido de inibidores de proteases) gelado após ultracentrifugação de 4 horas a 200,000g. Em seguida 15 μ L de cada fração foram separados em SDS-PAGE 12% e eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose ou corado com azul de *Coomassie*. Em **A**, podemos analisar o perfil eletroforético da purificação e a reduzida concentração de proteínas nas frações menos densas (1 a 7) do gradiente. As amostras analisadas por reação de *Western blotting* (**B**) com o anticorpo anti-PrP^C evidenciaram a presença de PrP^C, marcador de *lipid rafts*, entre as frações 3 a 6, que correspondem aos *lipid rafts*.

Podemos verificar que as frações menos densas do gradiente (figura 24 A, frações de 1 a 7) possuem menor concentração de proteínas que as frações mais densas, entretanto são as frações menos densas que estão enriquecidas com PrP^C (figura 24 B). Este dado é semelhante ao obtido por outros grupos (Keshet et al, 2000) e demonstra que a padronização desta metodologia pelo nosso grupo foi eficiente.

A proteína PrP^C está presente nas frações de 3 a 6 do gradiente e depois da exaustiva reprodução deste protocolo, ficou estabelecido que nos demais ensaios as frações de 3 a 6 poderiam ser combinadas e consideradas como frações enriquecidas em *lipid rafts*. Da mesma forma, as frações de 9 a 12 foram consideradas frações enriquecidas em proteínas solúveis em Triton X-100. Além disso, avaliamos as preparações por espectrometria de massas e caracterizamos a presença de outras proteínas residentes dos *lipid rafts*, para então, dar início aos ensaios envolvendo esses microdomínios.

4.14.2 Identificações de proteínas presentes nos *lipid rafts* por espectrometria de massas

A partir da purificação dos *lipid rafts* de cérebro de camundongo adulto, foi realizada análise por espectrometria de massas e identificação das proteínas por PMF (*Peptide Mass Fingerprint*). As frações correspondentes aos *lipid rafts* e proteínas solúveis foram separadas por SDS-PAGE, coradas com *Coomassie* coloidal (figura 25 A) e as bandas de massa molecular entre 50 kDa e 20 kDa submetidas à análise por espectrometria de massas (figura 25 B).

As bandas de massa molecular entre 50 kDa e 20 kDa (figura 25 B) foram retiradas do gel, descoradas e processadas para a etapa de digestão trípica. Os peptídeos trípticos foram coletados após as 16 horas de digestão a 37°C e em seguida, combinados com a matriz (ácido α -ciano-hidroxicinâmico - Sigma) para o espectrômetro de massas. As amostras foram aplicadas na placa para MALDI (scout MTP MALDI íon source 384 target - Bruker Daltonics, GmbH) e após secarem foram analisadas no equipamento Ultraflex MALDI-TOF-TOF (Bruker Daltronics, USA). Foram utilizados para identificação positiva das proteínas, os valores de massa trípica obtidos pelas análises espectrométricas.

As proteínas identificadas por PMF usando o programa MASCOT (Matrix Science, UK) fazendo uso do banco de dados SWISS-PROT, estão listadas na figura 25 C. Foi tolerada uma perda de clivagem por peptídeo, com tolerância de massa de 100 a 200ppm. Foram consideradas, na busca modificações variáveis tais como carbamidometilação de cisteínas e oxidações de metioninas (Mayr, 2005).

Essas modificações são inseridas nas proteínas nas etapas, descritas em material e métodos, de tratamento com a iodoacetamida e o DTT respectivamente.

Podemos verificar pela imagem do gel corado com *Coomassie* coloidal (figura 25 A), que as frações de *lipid rafts* realmente têm menor concentração de proteínas se comparado com a canaleta onde foram separadas as proteínas da fração solúvel. Entretanto, se compararmos o gel corado com *Coomassie* da figura 24 A, podemos verificar que temos uma maior marcação de proteínas nos *lipid rafts* do gel da figura 25 A. Isso, provavelmente se deve ao fato de que foram combinadas quatro frações (frações 3 a 6), o que pode ter aumentado a concentração das proteínas proporcionando uma melhor marcação com o corante.

O gel corado com *Coomassie*, também deixa claro que há proteínas de massas moleculares diferentes nos *lipid rafts*. Esta observação deixa pistas de que, uma grande variedade de proteínas está presente nestes microdomínios de membrana de cérebro de camundongo adulto. Contudo, o propósito deste gel não foi fazer uma análise do proteoma dos *lipid rafts* a partir de um gel unidimensional. O intuito desta abordagem foi o de confirmar, por identificação de outras proteínas residentes de *lipid rafts*, a eficiência do método escolhido para a purificação dos *lipid rafts*. Assegurando o uso deste protocolo para, em seguida, analisar a presença das proteínas Rnd1 e STI1 nas purificações de *lipid rafts*, a partir de cérebro e cerebelo de camundongos e inclusive a partir de linhagens celulares.

Das bandas retiradas do gel e utilizadas para a identificação das proteínas por PMF, dez bandas deram origem a espectros de massas que permitiram as identificações listadas na figura 25 C. As identificações foram de qualidade havendo proteínas identificadas com até 46% de cobertura, proteína Rab 3A, entre os peptídeos gerados e a seqüência de aminoácidos da proteína. Todas as proteínas identificadas apresentaram massa molecular coerente com a observada no gel. Outro dado relevante é que das dez proteínas identificadas cinco delas, Rab3A, GBB1, GBB2, Rac1 e a GNAO2 são consideradas proteínas características de *lipid rafts* em neurônios (Williamson *et al.*, 2010, Foster *et al.*, 2003). Esse resultado, portanto assegura que o protocolo padronizado é de fato seguro e eficiente para o estudo da composição de proteínas dos *lipid rafts*. Assim, a partir deste resultado, foi possível investigar a distribuição das proteínas Rnd1 e STI1, presentes em encéfalo de camundongos, nos *lipid rafts*.

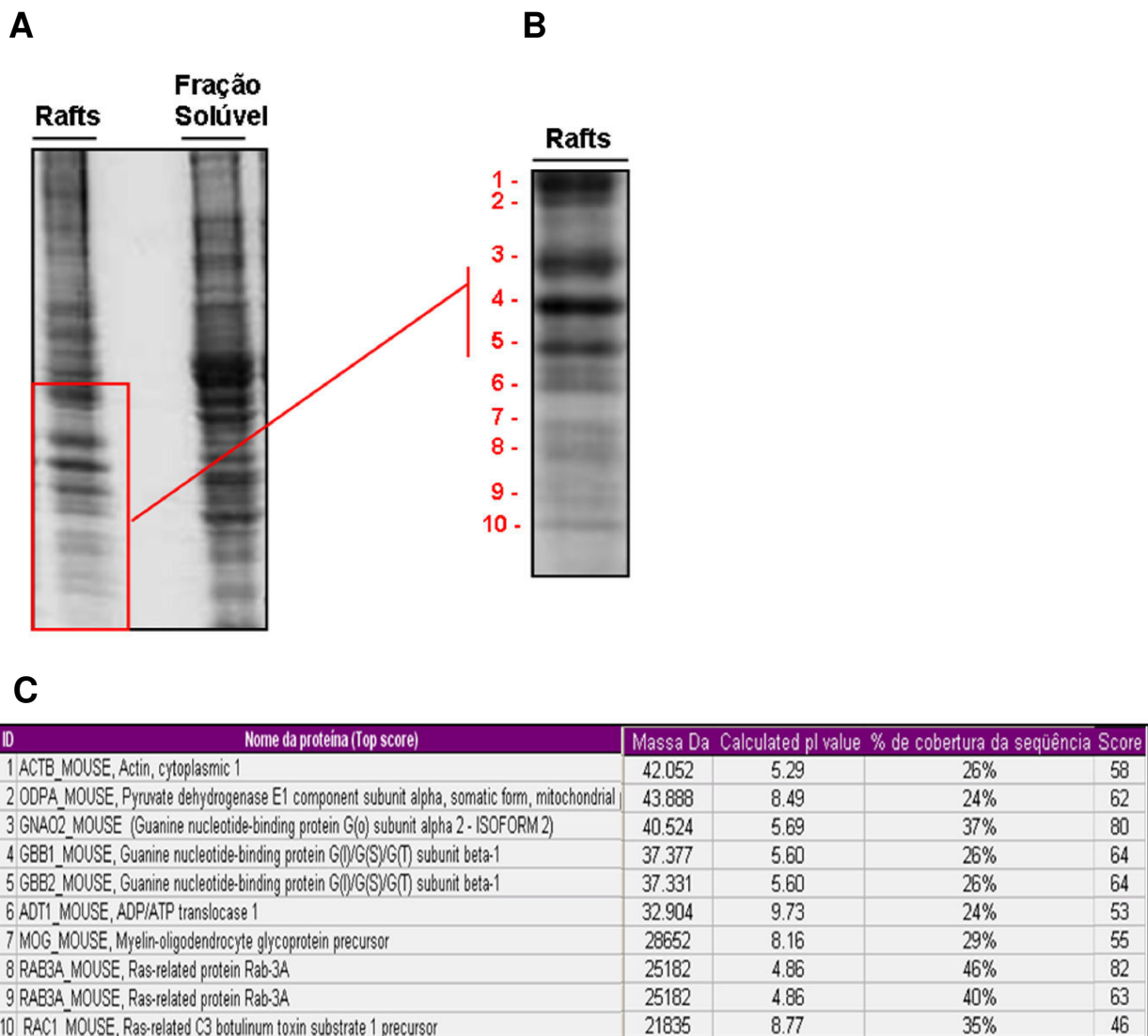


Figura 25. Identificação de proteínas de baixa massa molecular presente nos *lipid rafts* por espectrometria de massa (PMF). Amostras (frações 3 a 6) dos *lipid rafts* foram separadas em gel SDS-PAGE gradiente (5 a 15%) e em seguida o gel foi fixado e corado com *Coomassie* coloidal (**A**). As bandas correspondentes as massas moleculares de interesse foram recortadas do gel e numeradas de 1 a 10 e processadas para a espectrometria de massas (**B**). Os fragmentos da digestão trípica foram aplicados em placa para MALDI (scout MTP MALDI íon source 384 target - Bruker Daltonics, GmbH) e então realizada análise por espectrometria de massa em equipamento Ultraflex MALDI-TOF (Bruker Daltonics, GmbH). As proteínas foram identificadas por PMF (**C**) usando o programa MASCOT (Matrix Science, UK) fazendo uso do banco de dados SWISS-PROT. Podemos verificar a presença de pelo menos uma GTPase residente em *lipid raft*, a proteína Rac1 e outras associadas aos *lipid rafts*. Este dado reforça a eficiência do método na purificação dos *lipid rafts*.

4.14.3 Camundongos selvagens para a proteína PrP^C

A confirmação da eficiência do método para a purificação dos *lipid rafts* permitiu o estudo da distribuição das proteínas Rnd1 e STI1 ao longo do gradiente linear de Nycodenz. As purificações dos *lipid rafts* foram feitas a partir de cérebro e cerebelo de camundongos. Essa divisão visou avaliar se a distribuição das proteínas Rnd1 e STI1 poderiam sofrer alguma alteração, em função da região do encéfalo utilizada.

Não foi observada diferença no padrão de distribuição da proteína PrP^C nas purificações de cérebro e cerebelo (figuras 26 A e B, painéis centrais). Esse dado sugere que o padrão de distribuição de PrP^C, nos *lipid rafts* das duas estruturas do encéfalo não difere, podendo então ser utilizadas para a comparação da distribuição de Rnd1 e STI1.

A proteína Rnd1 está predominantemente presente nas frações do gradiente que correspondem a frações de membrana, solúveis em triton X-100 a 4°C, e a o conteúdo citoplasmático das células (figuras 26 A e B). Rnd1 apresentou diferença na sua distribuição, na purificação de *lipid rafts* de cérebro, a GTPase está presente nas frações de 3 a 5, sendo que parece haver uma maior concentração da proteína na fração 4 (figura 26 A). É interessante notar que a proteína PrP^C parece estar mais concentrada nesta mesma fração do gradiente (figura 26 A, painel central).

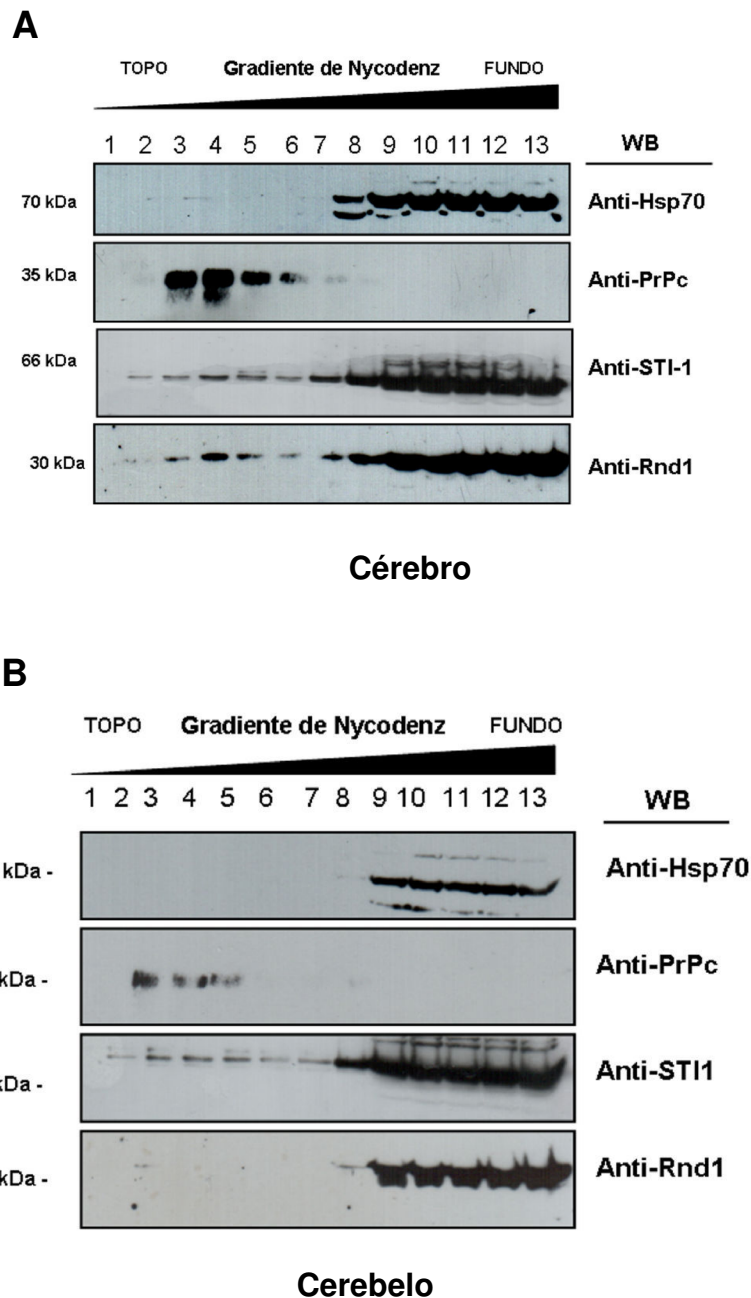


Figura 26. STI1 e Rnd1 estão localizadas em frações de *lipid rafts* de cérebro de camundongos selvagem para a proteína PrPc. *Lipid rafts* foram purificados a partir de amostras de cérebro (A) e cerebelo (B) de camundongos. Treze frações de 180 μ L foram coletadas a partir de um gradiente linear de Nycodenz em tampão TNE (NaCl 150mM, Tris-HCl 25mM pH 7.5, EDTA 5mM e 1% Triton X-100 e acrescido de inibidores de proteases) gelado, após ultracentrifugação de 4 horas a 200,000xg. Em seguida 15 μ L de cada fração foram separados em gel SDS-PAGE 10%. As proteínas presentes no gel foram eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose e analisadas por reação de *Western blotting* com anticorpos especificados nas figuras. As reações de *Western blotting* evidenciaram a presença de STI1 tanto nas frações correspondentes aos *lipid rafts* (anti-PrPc) quanto nas frações solúveis em Triton X-100 (anti-Hsp70). Entretanto Rnd1 só é evidenciada pelo anticorpo nos rafts de cérebro.

Podemos perceber que nos *lipid rafts* de cerebelo (figura 26 B), a proteína Rnd1 não foi evidenciada pelo anticorpo anti-Rnd1. Esse dado sugere que eventualmente possa haver uma diferença na presença da Rnd1 nesta estrutura encefálica. Por outro lado, fica evidente que a proteína STI1 co-localiza com a proteína PrP^C tanto em cérebro quanto em cerebelo (figuras 26 A e B). O mais relevante é o fato de que tanto Rnd1 quanto STI1, co-localizam nesses microdomínios de membrana em cérebro. Esse resultado corrobora a hipótese de que possivelmente os *lipid rafts* possam funcionar como uma plataforma, transitória, para a interação caracterizada para as proteínas Rnd1 e STI1.

Corroborando os dados apresentados na figura 26, que sugerem a co-localização de Rnd1 e STI1 nos *lipid rafts* de cérebro de camundongo adulto, temos a reação de *Western blot* com o anticorpo anti-Hsp70, que foi utilizado como controle de marcação de proteína citoplasmática. Podemos observar que a marcação da proteína Hsp70 só aparece na reação de *Western blot* (figuras 26 A e B, painéis superiores), a partir da fração 8 que de acordo com os autores do protocolo (Keshet *et al.*, 2000, Naslavsky *et al.*, 1997), não correspondem às frações que contêm os *lipid rafts*. Em função destes resultados de *Western blot* com o anticorpo anti-Hsp70, inclusive, é que sempre que as frações foram combinadas, utilizaram-se as amostras a partir da nona fração do gradiente, evitando uma possível contaminação das proteínas dos *lipid rafts* com as proteínas das frações solúveis.

Os resultados apresentados até o momento dão fortes evidências de que a proteína STI1 está localizada nos *lipid rafts*. Entretanto esta mesma molécula não possui nenhum sinal clássico para ser direcionada se quer para a membrana plasmática, relatado na literatura até o momento. Entretanto em 2002a, Zanata e colaboradores caracterizaram a interação entre a proteína STI1 a proteína príon celular, que é uma molécula GPI ancorada na porção extracelular da membrana plasmática. Neste mesmo trabalho, os autores mapearam em STI1 o sítio de interação com a proteína PrP^C. Esse dado, portanto levantou a hipótese de que STI1 pudesse estar associada aos *lipid rafts* via sua ligação na superfície celular externa da membrana plasmática com PrP^C. Essa hipótese, se confirmada excluiria a possibilidade de STI1 interagir com a proteína Rnd1 nos *lipid rafts*, tendo em vista que a última é uma proteína de membrana intracelular (Nobes *et al.*, 1998).

4.14.4 Camundongos nocaute para a proteína PrP^C

Baseado nos resultados apresentados na figura 26, que evidenciaram a possível co-localização, entre Rnd1 e STI1 nos *lipid rafts* decidiu-se confirmar se a ausência da proteína PrP^C, que como já mencionado é uma proteína ligante de STI-1, poderia interferir na presença de STI1 nos *lipid rafts*. Assim, a partir de cérebro e cerebelo de camundongos nocaute para a proteína príon celular foi feita a purificação dos *lipid rafts*. Podemos verificar que o padrão de marcação dos *lipid rafts*, com o anticorpo anti-flotilina -1 (outro marcador de *lipid rafts*) revelou que a purificação foi eficiente. Comparando-se as reações de *Western blot* A e B da figura 27 (anti-flotilina-1) com as reações de *Western blot* como o anticorpo anti- PrP^C da figura 26 A e B, é possível constatar que os *lipid rafts* aparecem nas mesmas frações do gradiente. Isso reforça o protocolo utilizado e permite comparar os experimentos.

A avaliação dos resultados apresentados na figura 27 A e B deixa claro que a ausência da proteína príon celular nas estruturas analisadas, cérebro e cerebelo, não interferiu na distribuição da proteína STI1 ao longo do gradiente de purificação (figuras 27 A e B). A proteína STI1, assim como em cérebro e cerebelo de camundongo selvagem, está preferencialmente localizada nas frações solúveis. Contudo, fica evidente que STI1 também co-localiza com a proteína flotilina-1, marcadora de *lipid rafts*, nas mesmas frações, aparentando pequena concentração nas frações 3 a 6 em cérebro e de 2 a 5 em cerebelo (figura 27).

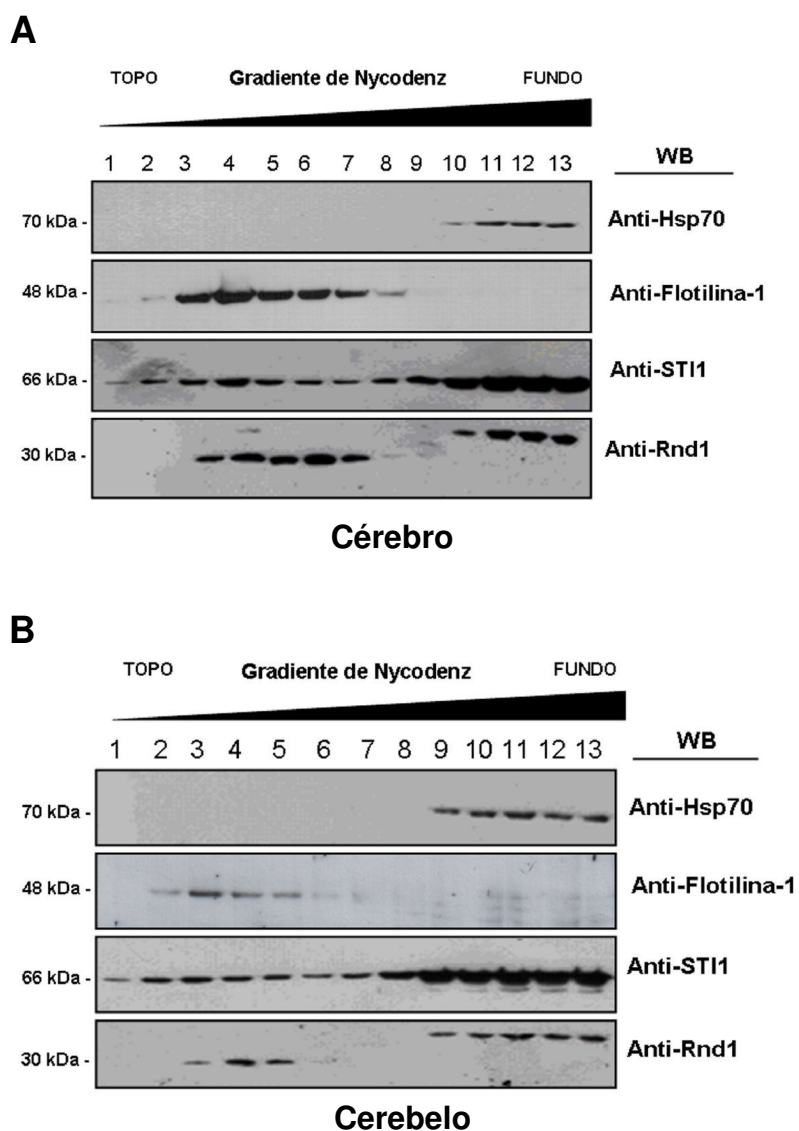


Figura 27. A ausência da proteína PrPc não interfere na distribuição da STI1 presente nos *lipid rafts* de camundongos Knock-out para a proteína PrP^c. *Lipid rafts* foram purificados a partir de amostras de cérebro (A) e cerebelo (B) de camundongos. Treze frações de 180 μ L foram coletadas a partir de um gradiente linear de Nycodenz em tampão TNE (NaCl 150mM, Tris-HCl 25mM pH 7.5, EDTA 5mM e 1% Triton X-100 e acrescido de inibidores de proteases) gelado, após ultracentrifugação de 4 horas a 200,000xg. Em seguida 15 μ L de cada fração foram separados em gel SDS-PAGE 10%. As proteínas presentes no gel foram eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose e analisadas por reação de *Western blotting* com anticorpos especificados nas figuras. As reações de *Western blotting* evidenciaram a presença de STI1 tanto nas frações correspondentes aos *lipid rafts* (anti-flotilina1) quanto nas frações solúveis em Triton X-100 (anti-Hsp70) não sofreu nenhuma alteração em razão da ausência da proteína PrPc. A análise deste resultado corrobora o observado na figura 23 A, sugerindo que os *lipid rafts* possam ser uma possível plataforma de interação entre as proteínas Rnd1 e STI1.

Curiosamente, as reações de *Western blot* com o anticorpo policlonal anti-Rnd1 revelou que a GTPase em estudo, também co-localiza com a proteína flotilina-1 nas frações correspondentes aos *lipid rafts* (figuras 27 A e B). Neste ensaio, podemos analisar que houve uma diferença no padrão de distribuição da proteína Rnd1, se comparado ao observado para a mesma proteína na figura 26, ao longo do gradiente. É possível verificar a marcação de uma banda de massa mais alta nas frações solúveis se comparada à evidenciada pela reação do anticorpo nas frações correspondentes aos *lipid rafts* (figuras 27 A e B, WB anti-Rnd1).

O interessante é que a marcação mencionada anteriormente, se assemelha tanto em amostras de cérebro quanto de cerebelo. Entretanto, é evidente que tanto em cérebro quanto em cerebelo, de camundongo nocaute, Rnd1 co-localiza com a proteína STI1 nos *lipid rafts* em reações de *Western blot*.

Sendo o mesmo perfil de distribuição, de STI1, observado tanto para camundongos selvagens quanto nocaute para PrP^C, a hipótese de que Rnd1 e STI1 possam interagir de forma transitória nestes domínios de membrana permanece viável. Entretanto, duas outras perguntas ainda precisam ser respondidas. A primeira é se o mesmo padrão de co-localização entre Rnd1 e STI1 se mantém em camundongos embrionários, o que reforçaria as evidências de relevância biológica para a interação entre Rnd1/STI1 durante o desenvolvimento do sistema nervoso. A outra pergunta seria de qual lado da membrana plasmática STI1 estaria localizada nos *lipid rafts*, uma vez que sua interação com Rnd1, nos *lipid rafts*, só seria possível se STI1 estiver na porção citoplasmática da membrana. Para responder a estas perguntas diversos ensaios foram realizados e serão descritos ao longo deste trabalho.

4.14.5 Camundongos selvagens para a proteína PrP^C em estágio embrionário de 17 dias (E17)

Os ensaios anteriores (figuras 26 e 27) deixam claro que tanto Rnd1 quanto STI1, estão presentes nos *lipid rafts*. Entretanto as amostras dos ensaios representados pelas figuras 26 e 27 são provenientes de camundongos adultos. As reações de *Western blot* que compõem a figura 28 foram obtidas a partir da purificação de *lipid rafts* de encéfalos de camundongos em estágio embrionário de 17 dias (E17).

O resultado obtido com a purificação dos *lipid rafts* a partir de amostras de encéfalos de camundongos E17 deixou claro que, de fato, tanto Rnd1 quanto STI1 estão co-localizando nestes microdomínios de membrana ricos em colesterol, também em embriões E17. Outra observação importante é a de que nas frações 3 e 4, onde temos uma marcação bem evidente da proteína PrP^C (figura 28, WB anti-PrP^C), podemos perceber que há uma concentração maior da proteína Rnd1 (figura 28, WB anti-Rnd1).

Essa característica descrita para STI1, não foi observada no painel da figura 28 que representa a reação de *Western blot* com o anticorpo policlonal anti-STI1. Neste painel (WB anti-STI1), é possível verificar que STI1 mantém o mesmo perfil eletroforético de distribuição, no gradiente linear de purificação dos *lipid rafts*, apresentado em todos os ensaios de *Western blot* mostrados até aqui. Isso sugere um padrão de localização característico para STI1.

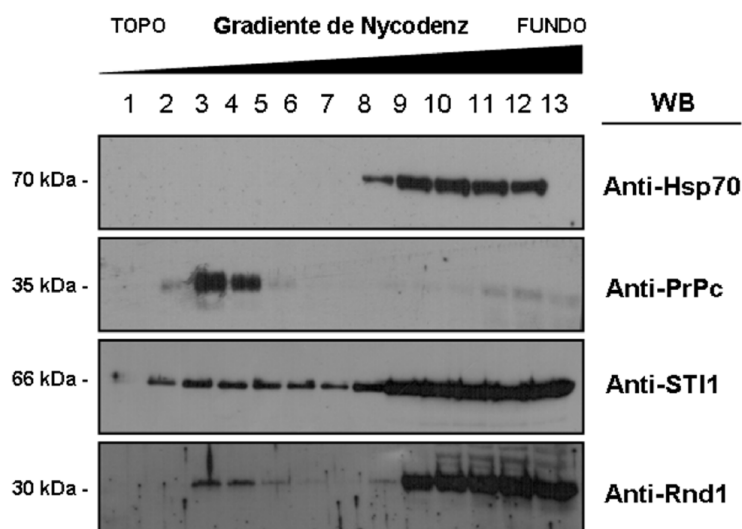


Figura 28. STI1 e Rnd1 estão localizadas em *lipid rafts* de cérebro de camundongos em estágio embrionário de 17 dias (E17). *Lipid rafts* foram purificados a partir de amostras de cérebro de camundongos E17. Foram separados 15 μ L de cada fração em gel SDS-PAGE 10%. As proteínas presentes no gel foram eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose e analisadas por reação de *Western blotting* com anticorpos especificados na figura. As reações de *Western blotting* evidenciaram a presença de STI1 e Rnd1 tanto nas frações correspondentes aos *lipid rafts* (anti-PrPc) quanto nas frações solúveis em Triton X-100 (anti-Hsp70). Este resultado mostra que em E17 tanto Rnd1 quanto STI1 estão presentes nos *lipid rafts*. Este resultado somado aos anteriores, camundongos adulto, sugere que de fato os rafts podem ser uma possível plataforma para a interação entre Rnd1 e STI1 inclusive durante o desenvolvimento embrionário do cérebro.

A distribuição, contudo, de Rnd1 e da STI1 fica bem concentrada nas frações do gradiente que correspondem a frações solúveis e citoplasmáticas. Essa afirmação pode ser justificada pela reação de *Western blot* com o anticorpo anti-Hsp70, que deixa evidente a partir de qual fração do gradiente, estão localizadas as proteínas citoplasmáticas e de membrana que foram solubilizadas. Esta reação de *Western blot*, com o anti-Hsp70 (figura 28), prova que não houve contaminação dos *lipid rafts* com proteínas das frações solúveis, uma vez que nenhuma banda, com massa molecular esperada para a proteína Hsp70, foi observada nas frações correspondentes aos *lipid rafts* (frações 3 a 6 do gradiente).

4.14.6 Ensaio de bloqueio com os anticorpos policlonais anti-STI1 e anti-Rnd1 para confirmação da identidade das proteínas presentes em *lipid rafts* de camundongos E17

Os resultados apresentados até aqui, corroboram a hipótese que caracteriza a presença das proteínas Rnd1 e STI1 nos *lipid rafts* e nas frações solúveis do gradiente de purificação. Entretanto, para confirmar a identidade das proteínas de interesse, fez-se uso do ensaio de bloqueio dos anticorpos policlonais anti-Rnd1 e anti-STI1 com as suas respectivas proteínas recombinantes.

A reação de *Western blot* com o anticorpo bloqueado, mostra que nenhuma banda foi reconhecida pelo anticorpo anti-STI1 (figura 29 A). Entretanto, o bloqueio do anti-Rnd1 não foi total (figura 29 B). Em seguida à primeira revelação, as membranas foram incubadas com os anticorpos anti-Rnd1 e anti-STI1 não bloqueados. Podemos, agora, pela análise da figura 29 A e B (painéis inferiores) notar que as bandas correspondentes às proteínas STI1 (66 kDa) e Rnd1 (30 kDa) foram evidenciadas pela reação com seus respectivos anticorpos. Esse dado reforça a identidade das proteínas Rnd1 e STI1, principalmente, nos *lipid rafts* em todos os ensaios realizados com o intuito de caracterizá-las como moléculas transitórias nos *lipid rafts*.

Podemos verificar que na reação de *Western blot*, da figura 29 A, com o anticorpo anti-STI1 não bloqueado que aparecem nas frações solúveis de 9 a 13, duas bandas de massas moleculares muito próximas. Aparentemente a banda de massa mais baixa é a que esta localizada nos *lipid rafts* e a de massa mais alta nas frações solúveis do gradiente. Entretanto há a possibilidade de que a proteína de massa mais alta esteja em menor quantidade nos *lipid rafts* que nas frações solúveis, dificultado assim sua detecção por *Western blot*. Essa observação chamou a nossa atenção, pois em 2009, Hajj e colaboradores mostraram a presença de duas bandas da STI1 em diferentes tecidos, sugerindo que modificações pós-traducionais pudessem ser responsáveis pela variação de massa molecular.

Pelo motivo mencionado anteriormente, decidimos avaliar o perfil eletroforético das amostras de *lipid rafts* e fração solúvel em duas dimensões. Essa abordagem nos permitiria avaliar o comportamento da proteína STI1 através de reações de *Western blot* em duas dimensões, na tentativa de explicar se de fato, as duas bandas podem ser somente produto de modificação pós-traducional.

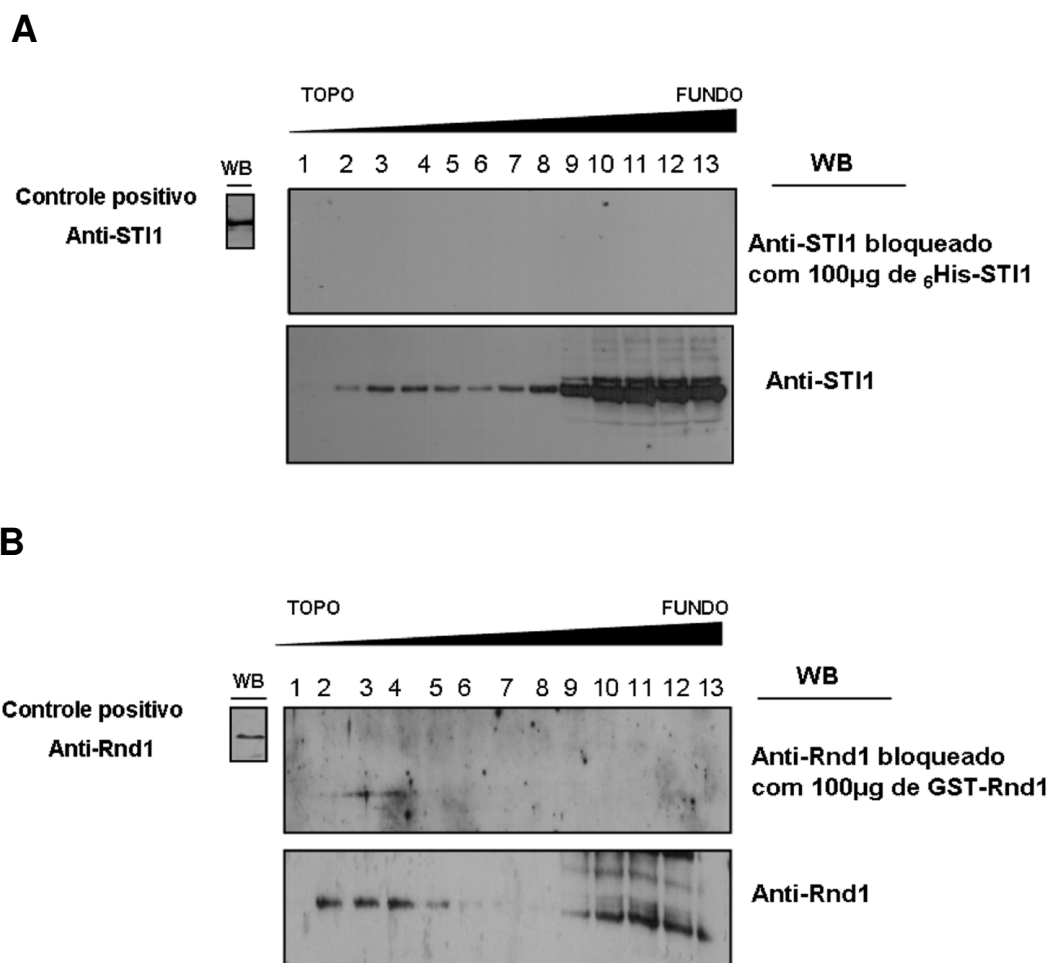


Figura 29. Ensaio de bloqueio dos anticorpos anti-ST11 e anti-Rnd1 para confirmação da identidade das proteínas ST11 e Rnd1 presentes nos *lipid rafts* de camundongos E17. *Lipid rafts* purificados a partir de amostras de cérebro de camundongos E17 foram separados em gel SDS-PAGE 10%. As proteínas presentes no gel foram eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose e reagidas contra os anticorpos anti-ST11 (**A**) e anti-Rnd1 (**B**) bloqueados com 100µg de proteína recombinante ϵ His-ST11 e GST-Rnd1 respectivamente (painéis superiores). Em seguida as mesmas membranas foram reagidas contra os anticorpos, não bloqueados, anti-ST11 (1:3000) e anti-Rnd1 (1:800).

4.15 Perfis eletroforético em duas dimensões (2-D) das amostras de *lipid rafts* e frações solúveis

4.15.1 SDS-PAGE 2-D

Para dar início a análise da possível modificação pós-traducional sofrida pela proteína ST11, poderia também ser observada em camundongos adultos, as amostras de purificação de cérebro dos *lipid rafts* e fração solúvel foram analisadas em SDS-PAGE 2-D. Apesar de o Nycodenz interferir na quantificação protéica das amostras purificadas, resolvemos utilizar o método de Bradford (1976) para quantificar as amostras. Como não tínhamos o propósito de realizar uma análise proteômica quantitativa entre as amostras, uma eventual imprecisão na quantificação não comprometeria os resultados. Assim, para montar o mapa proteômico em duas dimensões, utilizamos 160µg de amostra total para os *lipid rafts* e fração solúvel. Após a eletroforese os géis foram corados com prata (figura 30).

Uma análise comparativa, baseada apenas na variedade de spots presentes nos dois géis (figuras 30 A e B), revela, em duas dimensões o que já havíamos visto em gel 1-D corado com *Coomassie* (figura 24 A). O gel que representa o *proteoma* proveniente dos *lipid rafts* (figura 30 A) mostra uma menor variedade de spots (proteínas) se comparado ao mapa proteômico das amostras das frações solúveis (figura 30). Apesar da baixa qualidade do gel que evidencia as proteínas presentes nos *lipid rafts*, é possível perceber uma faixa de massa molecular, entre 75 e 30 kDa, onde as proteínas predominam. Percebemos que praticamente não há proteínas de massas muito baixas detectadas pela prata, na concentração protéica utilizada, no gel dos *lipid rafts*.

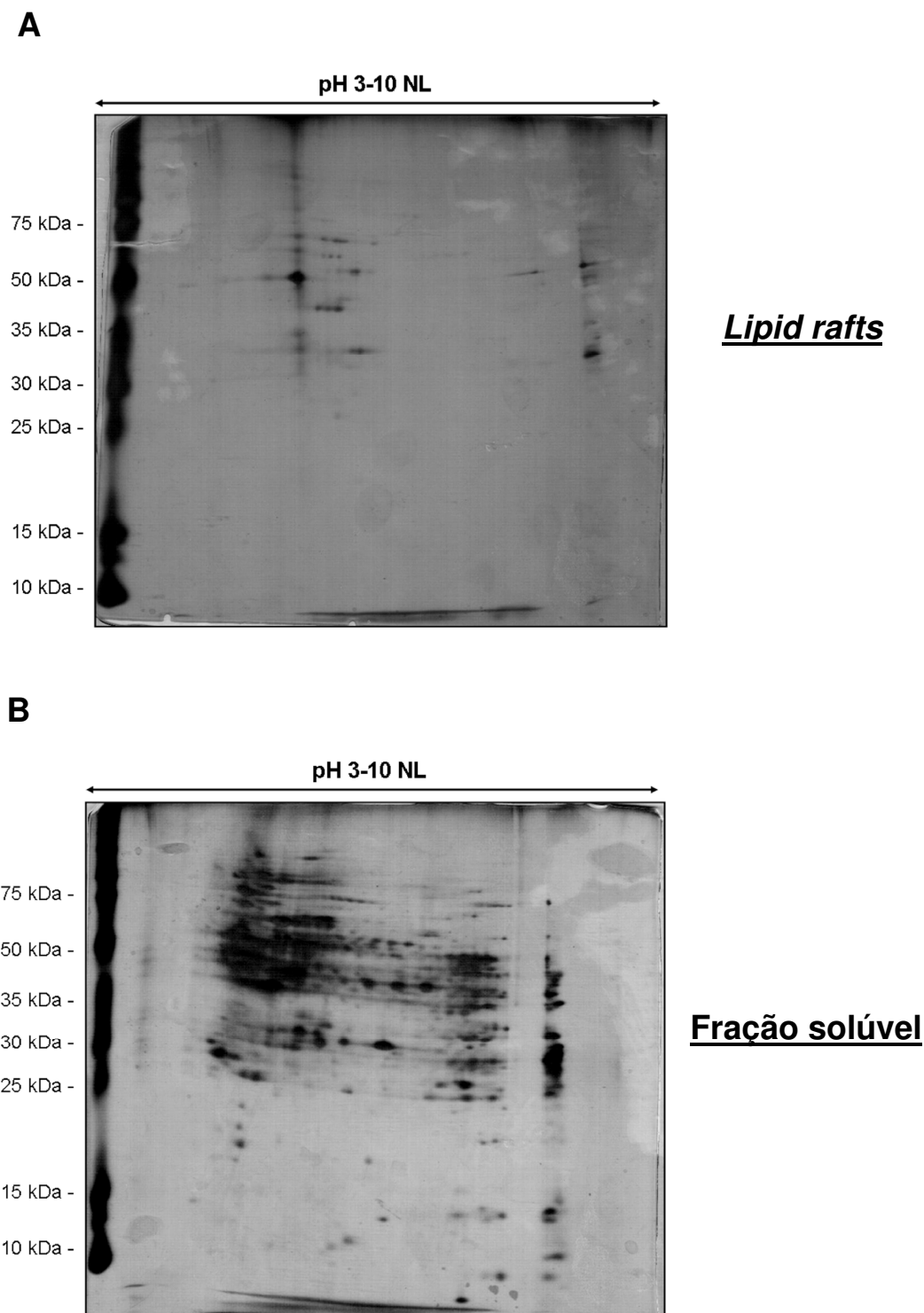


Figura 30. Mapa proteômico das amostras de *lipid rafts* e fração solúvel de cérebro de camundongo adulto. As proteínas (160µg) das frações de *lipid rafts* (A) e frações solúveis (B) foram ressuspensas em tampão de reidratação (6M de uréia, 2M de tiuréia, 50mM de DTT e 1% de CHAPS) acrescido de 1% de tampão IGP pH 3-10NL e aplicadas em tiras de IPG pH 3-10NL para a IEF. Após etapa de equilíbrio das tiras com DTT e iodoacetamida as proteínas foram submetidas a SDS-PAGE 12% a 15°C. Os géis foram corados com prata (Silver Staining Kit – GE). É visível uma menor concentração de proteínas nos *lipid rafts* (A) se comparado à fração solúvel (B).

O gel dos *lipid rafts* (figura 30 A) mostra que a maioria das proteínas detectadas pela prata estão na faixa de pH entre 3 e 7. Praticamente nenhuma proteína foi detectada na região mais básica do gel, indicando uma tendência a proteínas mais ácidas na composição dos *lipid rafts*. Entretanto, a limitação da técnica e a dificuldade em se obter um gel bem resolvido, a partir de proteínas de membrana, dificultam uma análise mais precisa sobre as características do *proteoma* dos *lipid raft*. Contudo, no mapa proteômico das frações solúveis (figura 30 B), podemos perceber uma separação eletroforética de melhor qualidade. Nesta fração solúvel, como já mencionado, existem tanto proteínas de membrana, como a Rnd1, quanto proteínas citoplasmáticas, como a Hsp70 e a STI1.

Assim, essa característica da fração solúvel favoreceu a obtenção de um mapa proteômico de melhor qualidade. Neste gel, figura 30 B, podemos perceber uma maior distribuição das proteínas ao longo do gradiente de pH utilizado. Entretanto, é evidente que na faixa de pH entre 5 a 8, como esperado em função do tampão de IPG utilizado, temos uma melhor separação das proteínas. Na região do gel, das frações solúveis, na faixa de pH mais ácida é perceptível uma má resolução das proteínas, na primeira dimensão, pois os spots estão praticamente sobrepostos. Isso poderia ser resolvido, se uma análise mais precisa fosse necessária, com o uso de faixas de pH mais restritas, como por exemplo pH de 4 a 7.

Na tentativa de caracterizar as proteínas presentes nos dois géis, e assim tentar encontrar as duas proteínas de interesse, investiu-se na identificação das proteínas por espectrometria de massas. Infelizmente, nenhum dos spots retirados gerou identificação de confiança. Essa abordagem poderia mostrar se a proteína STI1, presente nas frações solúveis sofreu algum tipo de modificação no seu ponto isoelétrico (pI). Como essa abordagem não gerou nenhum resultado positivo, quanto ao comportamento da proteína STI1 que pudesse explicar as duas bandas observadas na reação de *Western blot* da figura 29 A, partiu-se para a obtenção das reações de *Western blot* em duas dimensões.

4.15.2 Reações de *Western blot* em 2-D

As amostras de *lipid rafts* e fração solúvel, purificadas e utilizadas para a obtenção dos mapas proteômicos das amostras, foram também utilizadas para as reações de *Western blot* em duas dimensões (figura 31 A e B).

As reações de *Western blot* contra o anticorpo anti-STI1 das frações solúveis deixa claro a presença de isoformas da proteína STI1 com diferentes pontos isoelétricos e inclusive, massa molecular diferente (figura 31 A, painel superior). As diferentes isoformas, spots com pI distintos, pode ser justificado pelo fato de que STI1 possui sítios de fosforilação, em sua sequência de aminoácidos (Daniel *et al.*, 2008). Entretanto a presença de isoformas com massa molecular diferentes, em camundongos ainda não foram descritas na literatura até o momento. Em relação à proteína Rnd1, mais uma vez o anticorpo anti-Rnd1 reconheceu a proteína nas frações solúveis. Na figura 31 A, painel inferior, podemos verificar a presença de um único spot com massa molecular e pI correspondentes ao esperado para a proteína (Nobes *et al.*, 1998).

Quando as amostras de *lipid rafts* são reagidas contra os anticorpos de interesse, anti-STI1 (figura 31 B, painel superior) e anti-Rnd1 (figura 31 B, painel inferior) podemos perceber diferenças no perfil eletroforético da proteína STI1 presente nos *lipid rafts*. A primeira diferença é no número de isoformas, reduzido para duas. Um dos spot se localiza na região ácida do gel e a outra, na região mais básica do gel. A segunda diferença, em relação à proteína STI1 dos *lipid rafts* é a ausência da isoforma de massa mais alta. Esse resultado sugere que, isoformas da proteína STI1 podem se localizar em diferentes regiões celulares. Em relação a Rnd1, presente nos *lipid rafts*, não houve alteração no perfil eletroforético da proteína em duas dimensões.

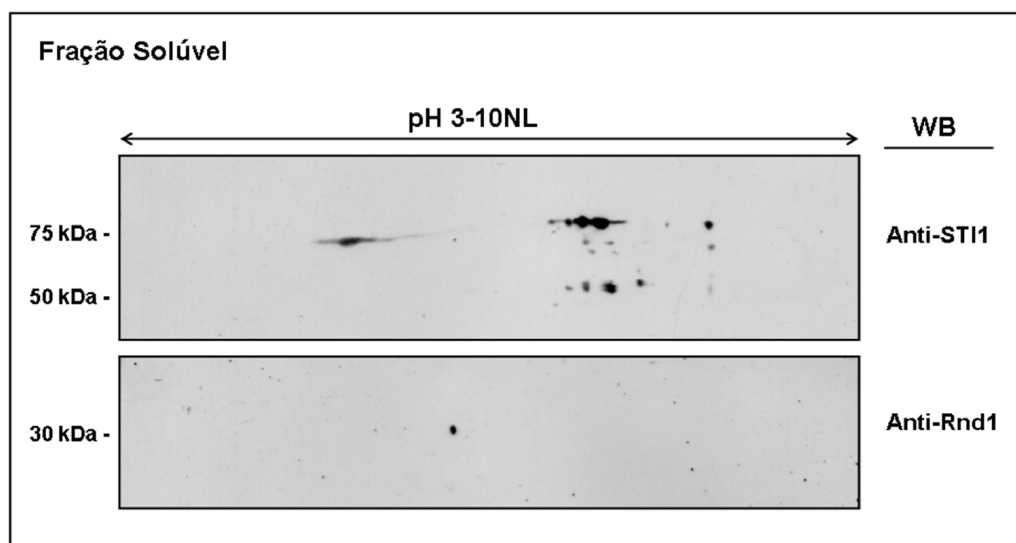
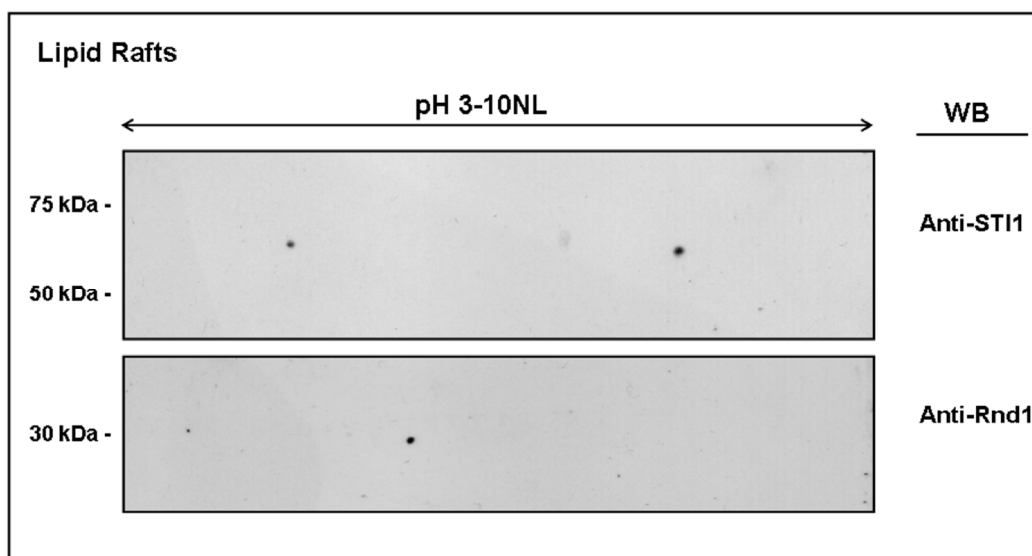
A**B**

Figura 31. Western Blot de amostras de *lipids rafts* e frações solúveis de membrana de camundongos. As proteínas (100 μ L) da fração solúvel (**A**) e *lipid rafts* (**B**) foram ressuspensas em de tampão de reidratação (7M de uréia, 2M de tiuréia, 50mM DTT, 1% CHAPS) contendo 1% de tampão IPG pH 3-10 NL e aplicadas em IPG Dry Strip de 13cm (pH 3-10 NL) para IEF. Após etapa de equilíbrio com DDT e iodoacetamida as proteínas foram submetidas à SDS-PAGE 11% a 15°C. Os géis foram eletrotransferidos para membrana de nitrocelulose e reagidos contra os anticorpos policlonais anti-STI1 (1:2000) painéis superiores em A e B e anti-Rnd1 (1:800), painéis inferiores em A e B. Utilizou-se método quimioluminescente para revelação da reação de Westren blot. Podemos observar padrões diferentes de migração da STI1 nas amostras. A proteína Rnd1 mostra separação eletroforética semelhante e esperada nas duas amostras.

4.16 Purificação dos *lipid rafts* a partir de células PC-12

Como os resultados anteriores não poderiam responder a uma das perguntas necessárias quanto à localização de STI1 nos *lipid rafts*, foi necessário padronizar a purificação dos *lipid rafts* a partir de linhagens celulares. O uso das células em cultura favoreceu os ensaios bioquímicos que tinham como propósito determinar em qual face da membrana plasmática (nos *lipid rafts*) STI1 está localizada. Assim, decidiu-se por trabalhar com as células PC-12, pois futuramente poderia ser uma grande ferramenta no estudo do deslocamento tanto de STI1 quanto da Rnd1, entre os *lipid rafts* e outros compartimentos celulares e regiões da membrana plasmática, durante os eventos celulares caracterizados anteriormente.

O resultado apresentado na figura 32 A, mostra que o perfil eletroforético das proteínas das diversas frações coletadas do gradiente linear de Nycodenz. A maior concentração das proteínas nas frações solúveis do gradiente está em acordo com o observado, nos diversos géis de purificação de *lipid rafts* apresentados neste trabalho.

Entretanto duas bandas de massas acima de 97 kDa e abaixo de 45 kDa, ficaram bem marcadas pelo corante no gel da figura 32 A. As mesmas bandas não apareceram no gel das amostras de células tratadas com a M β CD (figura 32 C), apesar de a região do gel das frações solúveis (fração 9 a 13), não ter apresentado diferença visível na marcação de proteínas quando comparadas com o gel da figura 32 A. Esse resultado levantou a hipótese de que as duas proteínas fossem moléculas residentes de *lipid rafts*.

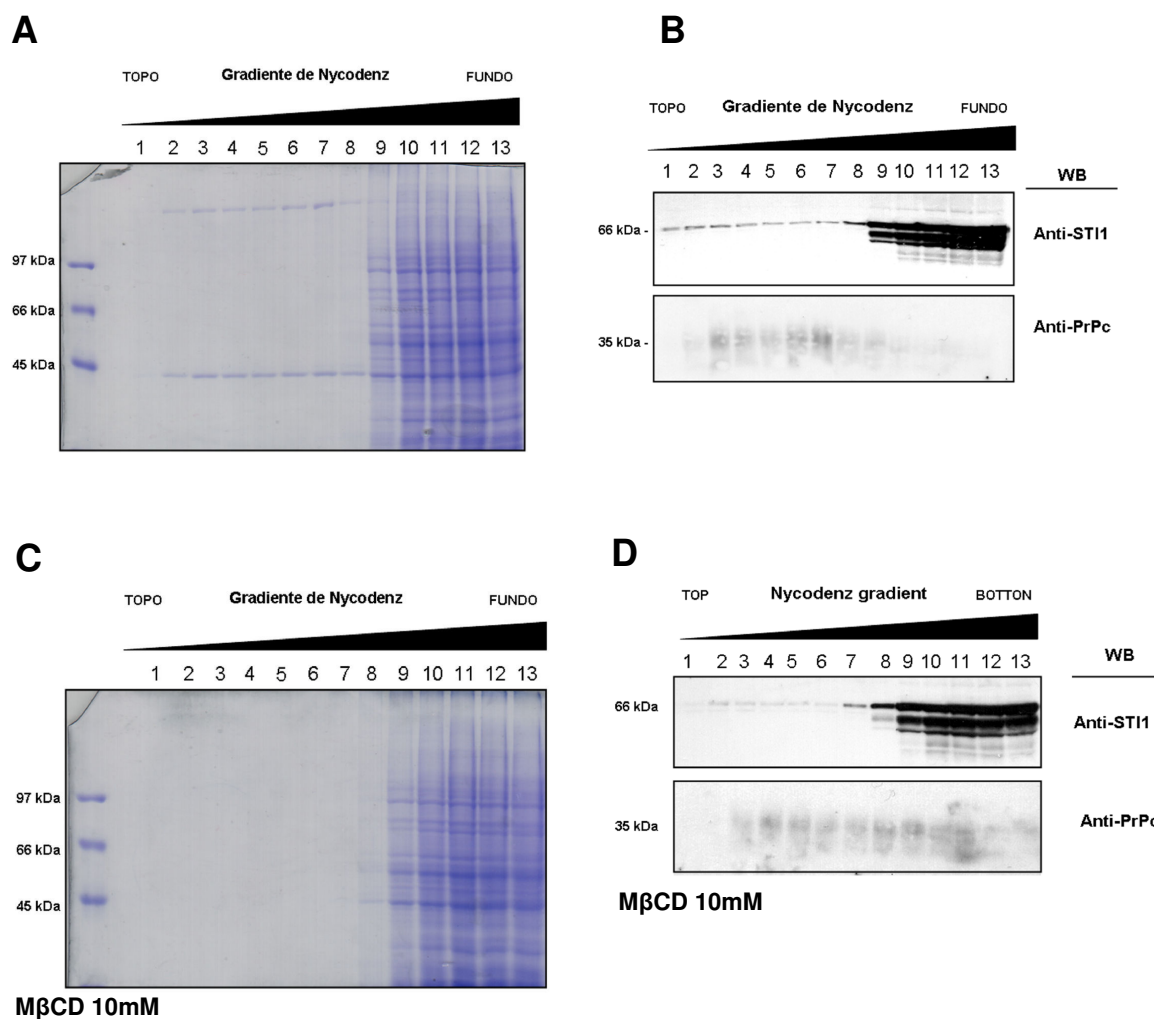


Figura 32. Purificação dos *lipid rafts* a partir de células PC-12. Células PC-12 ($2,5 \times 10^7$ células) não tratadas (**A**) ou tratadas com MβCD 20mM (**C**) para promover a desorganização dos *lipid rafts* foram submetidas ao protocolo de purificação dos *lipid rafts*. Após coleta das frações, amostras foram separadas em gel SDS-PAGE 10% e os géis foram corados com azul de *Coomassie* (**A e C**) ou eletrotransferidos para membrana de nitrocelulose e utilizados para reações de *Western blot* com os anticorpos indicados nas figuras (**B e D**). Em (**A**) podemos verificar a pouca concentração de proteínas nos *lipid rafts* (frações 3 a 6) e em (**B**) podemos perceber perfil de distribuição tanto de ST11 quanto de PrP^c no gradiente de purificação. Em (**C**) é possível perceber que duas proteínas, uma de massa alta e a outra de massa próxima a 45 kDa (ver gel A frações 2 a 7) não foram evidenciadas pelo corante *Coomassie*. Tal resultado sugeriu que tais proteínas fossem possíveis moléculas residentes dos *lipid rafts*, entretanto, não sabíamos suas identidades. Na figura (**D**) podemos perceber uma maior distribuição de PrP^c sugerindo desorganização dos *lipid rafts*. A proteína ST11 também sofreu deslocamento para frações solúveis, o que reforça a sua localização nos *lipid rafts*.

A reação de *Western blot* com o anticorpo anti-STI1 (figura 32 B) mostra que a proteína apresenta perfil de distribuição ao longo do gradiente de purificação muito semelhante ao observado nas amostras de encéfalo. Curiosamente, nas frações 9,10 e 11 podemos verificar a presença de três bandas, com massas moleculares muito próximas, da proteína STI1. Esse fato é muito relevante, levando-se em consideração que as células PC-12 são originadas de rato (*Rattus norvegicus*), levantando a hipótese de que nessa espécie existam três isoformas da proteína STI1 sendo que a STI1 que estaria localizada nos *lipid rafts* seria de maior massa molecular (figura 32 B). A reação com o anticorpo anti- PrP^C mostra que a purificação foi bem sucedida, já a proteína PrP^C foi evidenciada pelo anticorpo nas frações correspondentes aos *lipid rafts*.

O resultado apresentado na figura 32 D (painel inferior) deixa evidente a ação da M β CD sobre a organização dos *lipid rafts*. Esse resultado mostra que a droga utilizada foi capaz de promover a desorganização dos *lipid rafts*, fato este facilmente constatado com a simples observação da distribuição da proteína PrP^C, que neste resultado encontra-se amplamente dispersa ao longo de todo o gradiente.

Muito importante notar, é que a proteína STI1 também foi deslocada das frações menos densas do gradiente, para as frações mais densas. É possível ver um aumento na presença de STI1 nas frações 7, 8 e 9 da figura 32 D. Mais uma vez, em reação de *Western blot* independente, obtida a partir de amostras independentes da reação da figura 32 C, foram observadas a presença das três bandas da proteína STI1. Nesta reação como houve uma maior separação entre as bandas da proteína, se comparada à reação de *Western blot* da figura 32 B, podemos verificar a presença das três bandas da 9^a à 13^a fração do gradiente.

4.17 Espectrometria de massa (MALDI-TOF) e identificação de proteínas por PMF (*PEPTIDE MASS FINGERPRINTING*) presentes nos *lipid rafts* de células PC-12

Como descrito nos resultados obtidos com a purificação dos *lipid rafts* a partir das células PC-12, a marcação de duas bandas nas células não tratadas com a M β CD, sugeriu serem tais bandas prováveis marcadores de *lipid rafts*. Assim, com o propósito de identificar tais proteínas, as mesmas foram analisadas por espectrometria de massas. Foram utilizados para identificação positiva das proteínas, os valores de massa tríptica obtidos pelas análises espectrométricas (figura 33 B).

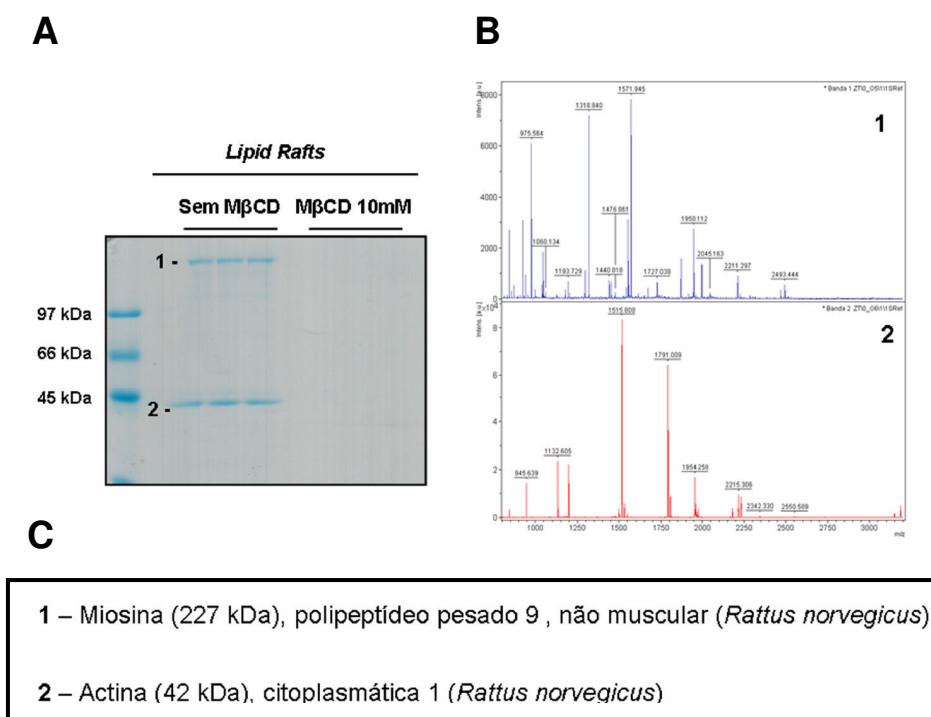


Figura 33. Miosina não muscular e a actina são proteínas associadas aos *lipid rafts* de células PC-12. Amostras da purificação dos rafts (fração 3 a 6) das frações solúveis (9 a 12) tratadas ou não tratadas com M β CD 20mM foram combinadas, e submetidas a gel SDS-PAGE 10%. Após eletroforese o gel foi fixado e corado com *Coomassie* coloidal seguido de protocolo para descorar o gel. Após descorar o gel as bandas 1 e 2 (**A**) foram recortadas do gel e processadas para a digestão tríptica. Os peptídeos tripticos foram combinados com a matriz para espectrometria de massas (**B**) e utilizados para a identificação das proteínas por PMF. As proteínas foram identificadas usando o programa MASCOT (Matrix Science, UK) fazendo uso do banco de dados SWISS-PROT de rato. As duas proteínas identificadas estão, de acordo com a literatura, associadas aos *lipid rafts*, o que resulta em mais uma evidência da eficiência do método para a obtenção dos *lipid rafts*.

As duas bandas de proteínas identificadas foram de miosina (não muscular) e actina (figura 33 C). As duas proteínas estão associadas aos *lipid rafts* (Williamson *et al.*, 2010, Foster *et al.*, 2003, Chen *et al.*, 2003). Este resultado, somado aos obtidos com a espectrometria de massas de amostra de cérebro de camundongo, mostra que o protocolo para a purificação dos *lipid rafts* a partir de células PC-12 também pode ser utilizado, com segurança, para a análise da distribuição da proteína STI1.

4.18 Ensaios de *pulldown* a partir de purificação de *lipid rafts* de células PC-12 biotiniladas na superfície celular

Após a padronização da purificação dos *lipid rafts* e a caracterização da distribuição da proteína STI1 (figura 32), demos início aos ensaios envolvendo a biotinição das proteínas da superfície externa das células PC-12. A reação de *Western blot* do ensaio de *pulldown* apresentado na figura 34 A (painel inferior), mostra que a proteína biotinilada STI1 foi recuperada somente da amostra correspondente à fração solúvel do gradiente de purificação de *lipid rafts*. Nenhuma STI1 biotinilada foi recuperada da amostra de *lipid rafts*, apesar de sua presença na amostra (figura 34 A, painel inferior).

Podemos perceber também que a proteína Hsp70, usada como controle nas purificações de conteúdo citoplasmático e das frações solúveis em triton X-100 a 4°C, foi recuperada da amostra (figura 34 A, painel superior), possivelmente por estar associada ao heterocomplexo STI1-Hsp70-Hsp90, já que tanto Hsp70 quanto a Hsp90 α já foram descritas fora da célula (Taylor *et al.*, 2007; Calderwood *et al.*, 2007 e Eustace *et al.*, 2004).

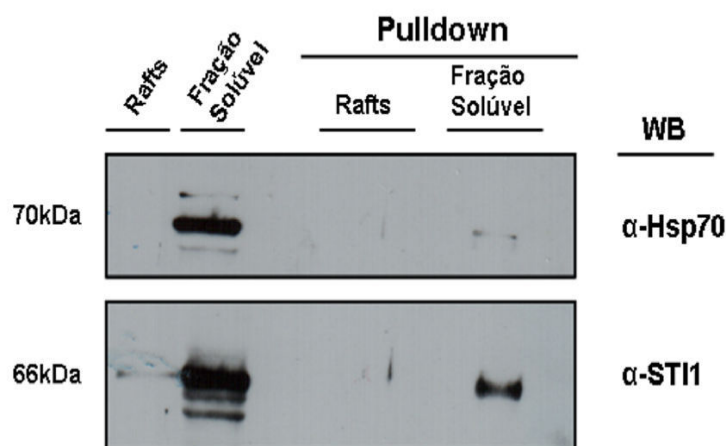


Figura 34. Ensaio de *pulldown* sugere STI1 como proteína localizada na face intracelular dos *lipid rafts*. $2,5 \times 10^7$ células PC-12 foram utilizadas para biotilação de proteínas de superfície celular. Após bloqueio das biotinas livres com glicina 300mM as células foram utilizadas para purificação de *lipid rafts*. As frações correspondentes aos rafts (3 a 6) e frações solúveis em TX-100 (9 a 12) foram combinadas e solubilizadas em tampão TNE acrescido de deoxicolato de sódio 1%. Matriz de avidina/agarose foi previamente equilibrada em tampão TNE e em seguida incubada com as amostras por 30 minutos a temperatura ambiente e sob agitação (como descrito pelo fabricante - Pierce). Após sucessivas lavagens com PBS as amostras foram eluídas em tampão de amostra e separadas em SDS-PAGE 10%. Seguindo-se reação de *Western blot* com os anticorpos anti-Hsp 70 e anti-STI1. O resultado sugere que a localização da STI1 nos *lipid rafts* é intracelular.

O resultado da figura 34, deixar claro que a proteína STI1 biotilada está presente nas frações solúveis do gradiente, portanto fora dos *lipid rafts*, na porção extracelular da membrana plasmática. Esse resultado corrobora a hipótese de que a STI1 intracelular pode, também, se encontrar associada aos *lipid rafts*. Sendo assim, sua interação com a Rnd1, neste microdomínio da membrana plasmática seria possível. Mas apesar dos diversos ensaios de *pulldown* confirmarem este resultado, optou-se por utilizar outra abordagem experimental para confirmar este dado. Por este motivo, investimos na realização de ensaio de imunoprecipitação da proteína STI1, a partir de amostras de células PC-12 biotiladas na superfície celular.

4.19 Ensaio de imunoprecipitação (IP) a partir de purificação de *lipid rafts* de células PC-12 biotiniladas na superfície celular

Extratos de células PC-12 biotiniladas foram utilizados como material de partida para a purificação dos *lipid rafts* e a realização de ensaios de imunoprecipitação com o anticorpo anti-STI1. O principal objetivo destes ensaios foi confirmar o resultado de *pulldown* (figura 34) através de abordagem experimental complementar.

A imunoprecipitação da proteína STI1 biotinilada evidenciada pela figura 35, confirma o resultado obtido com o ensaio de *pulldown*. Podemos perceber, pela análise da figura 35, que a proteína STI1 biotinilada foi recuperada apenas da fração solúvel do gradiente de purificação dos *lipid rafts*. Esse dado sugere que, STI1 esteja localizada na porção citoplasmática dos *lipid rafts* e reforça a hipótese de que a interação entre Rnd1 e STI1, possa ocorrer nestes microdomínios de membrana ricos em colesterol e esfingolipídios.



Figura 35. Ensaio de imunoprecipitação sugere STI1 como proteína localizada na face intracelular dos *lipid rafts*. $2,5 \times 10^7$ células PC-12 foram utilizadas para biotinição de proteínas de superfície celular. Após bloqueio das biotinas livres com glicina 300mM as células foram utilizadas para purificação de *lipid rafts*. As frações correspondentes aos rafts (3 a 6) e frações solúveis em TX-100 (9 a 12) foram combinadas e solubilizadas em tampão TNE acrescido de deoxicolato de sódio 1%. Em seguida, as amostras foram incubadas por 2 horas a 4°C com matriz de proteína A para clareamento. Ao final das 2 horas, a matriz foi recuperada por centrifugação e as amostras foram incubadas por 16 horas a 4°C com o anti-STI1 (1:50) e como controle negativo do ensaio de imunoprecipitação utilizou-se soro não imune de coelho (1:50). Após sucessivas lavagens com o tampão de lise as amostras foram eluídas em tampão de amostra e separadas em SDS-PAGE 10% e letrotransferidas para membrana de nitrocelulose. Seguindo-se reação de *Western blotting* com a extravidina-HRP (1:5000). Podemos verificar que a STI1 biotinilada foi recuperada das frações solúveis do gradiente. Este resultado sugere que a STI1 presente nos *lipid rafts* encontra-se na porção citoplasmática, reforçando a hipótese de que os rafts podem ser um possível local para uma interação transitória entre Rnd1 e STI1.

5. DISCUSSÃO

5.1 Expressão, purificação da proteína recombinante ϵ His-STI1, produção e caracterização do anticorpo policlonal anti-STI1

Para a obtenção do anticorpo policlonal anti-STI1 foi feita a expressão e purificação da proteína recombinante ϵ His-STI1. Podemos verificar (figura 1) na canaleta correspondente à amostra mais concentrada (eluato 1), que aparentemente houve um pouco de degradação da proteína purificada. Entretanto fica claro pela análise do eluato 2, que o mesmo não apresentou perfil eletroforético com degradação de proteína, talvez por estar bem menos concentrado que o eluato 1. A possibilidade de uma eventual contaminação com proteínas de *E. coli* foi descartada pela análise e identificação das bandas de proteínas por espectrometria de massas e identificação por PMF (dados não mostrados). Esse resultado mostrou que, de fato, houve um pouco de degradação da recombinante durante sua purificação, já que todas as bandas removidas e utilizadas para a identificação por PMF geraram a identificação da proteína STI1 de camundongo.

A figura 4 A deixa evidente a qualidade do anticorpo obtido, uma vez que o soro anti-STI1 de coelho, reconhece especificamente a proteína STI1 presente em extrato total de encéfalo de camundongo adulto. O ensaio de bloqueio (figura 4 B) atesta a especificidade do anticorpo. A partir deste momento, com a segurança da qualidade do reagente produzido, diversas abordagens experimentais puderam ser planejadas e executadas.

A análise da figura 5 mostra que o anticorpo policlonal produzido contra a proteína STI1, não só reconhece a proteína desnaturada em reações de *Western blot* (figuras 4 A e B), como consegue, também, recuperar a proteína endógena, e na sua conformação nativa, presente em extrato total de encéfalo de camundongo adulto (figura 5, seta vermelha).

Um problema comum enfrentado em ensaios de imunoprecipitação é a reação cruzada do anticorpo secundário (anti-coelho-HRP), empregado na reação de *Western blot*, com as cadeias leves e pesadas das imunoglobulinas utilizadas na imunoprecipitação (figura 5). Este problema foi resolvido com o acoplamento

covalente de anti-STI1 na matriz sólida de sepharose, sem a perda da atividade de reconhecimento do anticorpo pelo seu antígeno complementar (figura 9).

A reação de ligação do anticorpo anti-STI1 foi realizada com o propósito de investir em ensaios de co-immunoprecipitações para investigar e confirmar a interação Rnd1/STI1. Assim, logo após a padronização da técnica evidenciada no gel da figura 11, onde percebemos que houve ligação covalente de grande parte das IgGs na resina, seguiu-se a etapa de imunoprecipitação. A reação de *Western blot*, confirma dados da literatura que sugerem que STI1 (Lin *et al.*, 2009, Caetano *et al.*, 2008) estaria localizada em regiões da membrana ricas em colesterol e esfingolipídios, os *lipid rafts*. O anticorpo ligado na matriz de proteína-A foi capaz de imunoprecipitar a proteína STI1 presente em preparação de *lipid rafts* (figura 12, input) de cérebro de camundongo adulto (figura 12). Esse dado é de grande relevância e será mais discutido adiante juntamente com os resultados dos *lipid rafts*.

5.2 Expressão, purificação das proteínas recombinantes GST e GST-Rnd1, produção e caracterização dos anticorpos policlonais anti-GST e anti-Rnd1

Para avançar nos estudos bioquímicos com propósito de caracterizar a interação entre as proteínas Rnd1 e STI1, foi necessário a produção do anticorpo policlonal anti-Rnd1. Para tanto, a proteína recombinante foi expressa e purificada (figura 2) com sucesso. Como foi expressa em fusão com a proteína GST, mesmo tendo características hidrofóbicas em razão da seqüência de seus aminoácidos (Nobes *et al.*, 1998) a proteína quimérica GST-Rnd1 foi expressa de forma solúvel. A qualidade da proteína recombinante obtida favoreceu a produção de um anticorpo policlonal também de boa qualidade.

As reações de *Western blot* das figuras 6 A e B deixam claro a afirmação de qualidade do reagente obtido. Podemos perceber que o soro hiper imune do coelho imunizado com a proteína GST-Rnd1 reconhece especificamente uma banda de massa molecular de 30 kDa, esperada para a Rnd1 (Nobes *et al.*, 1998). Esse dado é reforçado pela ausência de reação com o soro pré-imune do coelho imunizado, que não evidenciou nenhuma banda na mesma altura de massa molecular. Outro dado relevante é que, na concentração de proteína total usada na reação de

Western blot da figura 6 A (50 µg), a diluição 1:1600 reduziu muito a marcação de bandas inespecíficas, observadas nas outras diluições testadas do mesmo soro.

Rnd1, Rnd2 e Rnd3 compartilham 54-63% de homologia entre seus membros, ~ 45-49% de identidade com a GTPase Rho, e pouca semelhança com outros membros da família Rho (Rac, Cdc42 e etc)(Nobes *et al.*, 1998) sendo que os aminoácidos 53 a 61 compreendem uma seqüência específica da proteína Rnd1 (Ishikawa *et al.*, 2003). Assim, para confirmar se o anticorpo produzido faria reação cruzada com outra GTPase expressa no sistema nervoso, testou-se o reagente contra a GTPase recombinante GST-Rnd2 (Chardin *et al.*, 2006, Nakamura *et al.*, 2006, Nobes *et al.*, 1998). A reação de *Western blot* mostrada na figura 6 B, mostra que o soro policlonal anti-Rnd1 não reconhece a proteína GST-Rnd2. Esse resultado reforça a especificidade do reagente para o antígeno de interesse.

Na tentativa de imunoprecipitar a proteína Rnd1 a partir de amostras endógenas, realizou-se a purificação das IgGs anti-Rnd1 presentes no soro hiper imune do coelho imunizado. A figura 8, na canaleta referente a IgG anti-Rnd1 é possível perceber a presença das proteínas (cadeias leves e pesadas). Após a purificação, testou-se a eficiência das IgGs anti-Rnd1 contra extrato total de células N2a (neuroblastomas de camundongos) em reação de *Western blot* (figura 10). Podemos verificar que as IgGs anti-Rnd1 (figura 10) reconhecem especificamente a GTPase em reação de *Western blot*, evidenciando que o reagente não perdeu sua atividade após a purificação. Podemos inclusive, comparando a reação do soro hiper imune (figura 6 A) na diluição 1:800, constatar que o anticorpo purificado (IgGs) na mesma diluição (figura 10) não marca bandas inespecíficas. Com este anticorpo, e na concentração de 50µg de extrato total de células N2a, é possível ter uma reação de *Western blot* de excelente qualidade. Isso sugere que em ensaios futuros o anticorpo possa ser usado em diluições maiores, prevenindo eventuais marcações inespecíficas.

A figura 7 mostra a reação de *Western blot* da titulação do anticorpo policlonal anti-GST produzido. A análise do resultado mostra que o reagente obtido é de excelente qualidade. Esse anticorpo pode ser utilizado em diluições maiores que 1:3200 (figura 7) em reações onde haja uma maior concentração de recombinantes com etiqueta de GST. A produção deste reagente proporcionou seu uso nos ensaios de *pull-down*, onde o controle de presença das proteínas recombinantes precisava ser mostrado.

A partir deste momento, tendo em mão diversas ferramentas bioquímicas, ou seja, anticorpos policlonais de qualidade e proteínas recombinantes purificadas pudemos dar início aos ensaios bioquímicos e de função biológica.

5.3 Ensaios de interação protéica

Para avançar na análise de especificidade da interação entre as proteínas Rnd1 e STI1 caracterizadas previamente (Rizzo *et al.*, dados não publicados e em anexo), foi necessária a expressão de diversas GTPases (figura 13). Podemos perceber que o rendimento das expressões entre as diversas proteínas expressas foi diferente (figura 13 A-E). Os resultados apresentados na figura 14 confirmam os obtidos por Souza (2007), que mostra a interação bioquímica entre GST-Rnd1 tanto com GFP-STI1 como com STI1 presente em extrato total de encéfalo de camundongo adulto. Entretanto, não foi analisada a especificidade desta interação em relação a outras GTPases nem a importância biológica para tal interação.

As proteínas da família Rho-like, da qual as Rnd (Rnd1, Rnd2 e Rnd3) fazem parte, são muito similares na seqüência de aminoácidos (BurrIDGE, 2004, Nobes *et al.*, 1998). As proteínas Rnd mostram diferenças significativas entre outros membros da família Rho em relação ao seu tamanho, carga, e propriedades bioquímicas (Nobes *et al.*, 1998). Entretanto, as Rnds compartilham 54-63% de homologia entre seus membros, ~ 45-49% de identidade com Rho, e pouca semelhança com outros membros da família Rho (por exemplo: Rac e Cdc42) como já mencionado (Nobes *et al.*, 1998).

Por esta razão, tornou-se necessário analisar se a interação bioquímica de STI1 poderia ser compartilhada com outras GTPases ou se a mesma seria específica para a Rnd1. Assim, ensaios de *pull-down*, com diversas GTPases expressas (figura 13) e amostras de encéfalo de camundongos adultos (figura 14 A e B) e embrionário (figura 14 C) foram realizados. Tais resultados evidenciam interação preferencial entre Rnd1 e a STI1 presente nas amostras de encéfalo.

Baseados em dados de localização previamente estabelecidos para Rnd1 e STI1 levantamos a hipótese que a interação Rnd1-STI1 poderia ocorrer tanto em corpos celulares quanto em neuritos de neurônios (Li *et al.*, 2010, Ishikawa *et al.*,

2006 e 2003, Lopes *et al.*, 2005, Zanata *et al.*, 2002a, Aoki, *et al.*, 2000, Rizzo *et al.*, dados não publicados e em anexo). Corroborando os resultados de *pulldown*, a co-imunoprecipitação da proteína Rnd1 com a STI1 (figura 15) também mostra a interação entre Rnd1 e STI1 em encéfalo de camundongo. Contudo, tanto *pulldown* quanto co-imunoprecipitação não descartariam uma possível interação via formação de um heterocomplexo. Por esta razão foi realizado o ensaio de ligação (figura 16).

Como pode ser observado, a interação $_{6}\text{His-STI1/GST-Rnd1}$ foi significativamente diferente e maior se comparada aos controles. Esse dado deixa forte evidência de que a interação caracterizada por *pulldown* e co-imunoprecipitação, ocorre de forma direta. Assim, baseado neste resultado e em dados da literatura (Ishikawa *et al.*, 2003), podemos propor que o possível sítio de interação entre Rnd1 e STI1, seria o peptídeo compreendido entre os aminoácidos 53 a 61 em Rnd1, já que esta região não está presente em nenhuma outra GTPase (Ishikawa *et al.*, 2003). Entretanto, ensaios com mutantes da proteína Rnd1 com essa região deletada são fundamentais para tal afirmação. Essa pequena diferença entre a seqüência de aminoácidos de Rnd1 em relação à Rnd2 e a RhoD, podem justificar a interação residual entre STI1 e tais moléculas observadas nos ensaios de *pulldown*.

Curiosamente, nos ensaios de interação feitos em placa de poliestireno, podemos observar que em concentrações maiores que 0,2 μg da proteína recombinante $_{6}\text{His-STI1}$ (figura 16), a interação entre ela e a GST-Rnd1 imobilizada na placa reduz. Este dado pode ser explicado pela tendência, fisiológica, da proteína STI1 em fazer dímeros em solução, de forma concentração-dependente (Van der Spuy *et al.*, 2001). Essa dimerização possivelmente deve esconder o sítio de interação entre as recombinantes, reduzindo desta forma a absorvância no experimento. Além disso, a existência de STI1 como monômero ou dímero é fisiologicamente relevante para a proteína, já que sua interação com Hsp90 ocorre na forma de dímero-dímero e com a chaperona Hsp70 na forma de monômero com monômero (Longshaw *et al.*, 2004, Van der Spuy *et al.*, 2001, Prodromou *et al.*, 1999).

Após extensiva investigação, a respeito da caracterização bioquímica da especificidade da interação entre as proteínas Rnd1/STI1 foi necessário avaliar se tal interação fazia sentido biológico. Por esta razão, diversas abordagens experimentais biológicas foram feitas.

5.4 Ensaios biológicos

5.4.1 A neuritogênese

É possível concluir pela análise da figura 17 A que a dupla transfecção das células PC-12 com Rnd1 e STI1 foi capaz de promover a redução do percentual de células com neuritos induzido pela atividade da proteína GFP-Rnd1 (Aoki *et al.*, 2000) sendo que esta neuritogênese não promove uma extensão numerosa de neuritos entre as células (17 B). Entretanto, quando se analisa o comprimento médio destes neuritos (17 C) é possível constatar que a dupla transfecção promove a extensão de neuritos mais longos, sendo que um percentual significativo destes neuritos são maiores que 100 μm (figura 17D).

Tal resultado revela-se significativo uma vez que a proteína STI1 pode estar de alguma forma regulando a atividade intrínseca constitutiva da GTPase Rnd1 (Nobes *et al.*, 1998) assim como regula atividade GTPásica das proteínas Hsp70 e Hsp90 (Prodromou *et al.*, 1999, Wegele *et al.*, 2003 e Richter *et al.*, 2003) revertendo portanto sua capacidade de promover extensão de neuritos.

A neuritogênese induzida por Rnd1 estaria na dependência da GTPase Rac e esta proteína é ativada a jusante de Rnd1 na cascata de sinalização (Aoki *et al.*, 2000). Além disso, a ativação de Rac é necessária para a neuritogênese induzida por NGF em células PC-12, sugerindo a participação de Rnd1 neste evento celular (Aoki *et al.*, 2000). Assim como Rnd1, STI1 também está envolvida em eventos de neuritogênese (Lopes *et al.*, 2005) levantando a hipótese de que a interação entre as duas proteínas possa promover a extensão de neuritos mais longos, como observado na figura 17 D por indução de diferenciação celular. Não deixando de mencionar e relatar que a proteína STI1 também é expressa pelas células PC-12 (figura 17 C, *Western blot*), essa expressão endógena da proteína pode atuar de forma sinérgica com a GFP-STI1 potencializando o efeito da interação GFP-Rnd1/GFP-STI1.

Os resultados obtidos com as células PC-12 foram confirmados com as duas outras linhagens celulares a N2a (figura 18 A-D) e a SHSY-5Y (figura 19 A-D). Com as duas últimas linhagens celulares, foi possível perceber, não só a redução na atividade da GTPase associada à redução na neuritogênese, como também uma diferença no comprimento médio e na extensão de neuritos mais longos. Sendo que

também, nestas duas linhagens celulares há a expressão endógena da STI1 (dados não mostrados).

Fato relevante é que o tratamento de células PC-12 com NGF em diferentes concentrações pode induzir sua diferenciação em células semelhantes a neurônios e promover neuritogênese, por ativação da via ERK 1/2 por até dez dias, sugerindo ser a atividade desta via um evento sustentado (Waetzig *et al.*, 2003). Assim, decidiu-se analisar a possível participação da interação entre STI1 e Rnd1 na promoção da diferenciação celular em células PC-12. Este dado poderia explicar a presença de neuritos longos ou maduros (Aoki *et al.*, 2000) nas células PC-12 (figura 17 D).

Ensaio realizado isoladamente e nas mesmas condições dos realizados para análise de neuritogênese, revelam que as células que foram transfectadas com GFP-STI1 e duplamente transfectadas (GFP-Rnd1/GFP-STI1) expressaram neurofilamentos (145 kDa) (figura 20, painel superior) assim como o controle positivo de diferenciação celular (células tratadas com 100ng/mL de NGF (Invitrogen)). Como os neurofilamentos de 145 kDa são característicos de neuritos maduros e longos (Greenberg *et al.*, 1985; Lindenbaum *et al.*, 1987) este resultado sugere que as células PC-12 possam, de fato, estar diferenciando e assim estendendo neuritos mais longos e maduros, com a presença da proteína neurofilamento médio em sua estrutura. Portanto, STI1 pode estar regulando a atividade GTPásica intrínseca da proteína Rnd1 e promovendo assim a diferenciação de células PC-12.

A diferença no comprimento de neuritos em células PC-12 (confirmada com o uso das linhagens celulares N2a e SHSY-5Y) sugeriu a possibilidade da diferenciação destas células provavelmente pela mesma via que o NGF induz, a via de ERK 1/2. Como tanto Rnd1 quanto STI1 são descritas como proteínas que atuam nesta via de sinalização levando a diferenciação de células PC-12 e neurônios em cultivo primário (Roffé, *et al.*, 2010, Arantes *et al.*, 2009, Caetano *et al.*, 2008, Lopes *et al.*, 2005, Aoki *et al.*, 2000) decidiu-se, portanto avaliar a possível regulação e envolvimento desta via de sinalização no modelo de neuritogênese usado nesta tese. Assim, os resultados apresentados na figura 21 (A e B), dão significativas evidências que, de fato, a interação entre Rnd1 e STI1 promovem aumento da atividade de ERK 1/2, induzindo desta forma a diferenciação celular das células PC-12 em células semelhantes a neurônios simpáticos. Desta forma, os ensaios de neuritogênese, diferenciação celular (figura 20) e os ensaios de atividade de ERK 1/2 analisados em conjunto, corroboram a hipótese que a interação Rnd1/STI1, leva à

redução da atividade da GTPase GFP-Rnd1 e que tal interação, promove a diferenciação das células PC-12 aumentando a atividade de ERK1/2.

5.4.2 Ensaio de colapso de citoesqueleto em células COS-7

A superexpressão da GTPase Rnd1 reduz a formação das fibras de estresse, regula a plasticidade do citoesqueleto de actina em células COS-7, interage e controla a atividade da proteína SCG10 que por sua vez, quando ativada desorganiza os microtúbulos comprometendo a formação de axônios (Li *et al.*, 2008, Zanata *et al.*, 2002b, Ridley *et al.*, 1992). Em 2002b, Zanata e colaboradores demonstraram que Rnd1 interage com plexina-A1, e que esta interação é capaz de induzir o colapso do citoesqueleto em células COS-7 e neurônios do gânglio simpático. Entretanto este mesmo grupo mostrou que a expressão de RhoD inibe a atividade de Rnd1, e mais uma vez Rnd1 parece competir com menor afinidade pelo sítio de interação com a plexina.

Os autores citados anteriormente mostraram, inclusive que a interação entre a porção citoplasmática da proteína plexina-A1 (Plex-A1cit) e GTPase quimérica GFP-Rnd1, é capaz de promover o colapso do citoesqueleto em células COS-7, independentemente da participação da Sema-3A e de seu co-receptor, a proteína neuropilina-1 (Rohm *et al.*, 2000a, Rhom *et al.*, 2000b, Takahashi *et al.*, 1999, Takahashi *et al.*, 1998). Assim, além da participação das proteínas Rnd1 e STI1 na neuritogênese, levantou-se também outra hipótese, que seria o envolvimento intracelular de STI1 na via de colapso do citoesqueleto no cone de crescimento em resposta à sinalização desencadeada pela via semaforina3A/neuropilina-1/plexinaA1/Rnd1 (Zanata *et al.*, 2000b). Para analisar tal hipótese, escolheu-se o ensaio de colapso de citoesqueleto em células COS-7, que mimetiza as alterações morfológicas de citoesqueleto observadas em cones de crescimento (Rohm *et al.*, 2000a, Rhom *et al.*, 2000b, Zanata *et al.*, 2000b, Takahashi *et al.*, 1999, Takahashi *et al.*, 1998).

O modelo escolhido como segunda abordagem experimental é bem estabelecido na literatura e amplamente utilizado para estudo da função das proteínas da família das semaforinas mediada pelas plexinas (Yukawa *et al.*, 2010, Uesugi *et al.*, 2009, Artigiani *et al.*, 2004, Oinuma *et al.*, 2003, Rohm *et al.*, 2000 b,

Takahashi *et al.*, 1999 e 1998). Por esta razão este modelo de estudo *in vitro* se aplica bem ao objetivo de estudar o possível papel regulador que STI1 exerce sobre a GTPase Rnd1, hipótese esta confirmada evidenciada pelos resultados de neuritogênese.

Os dados obtidos tanto com as células COS-7 expressando as quimeras GFP-Rnd1-GFP-STI1 quanto àquelas que expressaram a GFP-Rnd1 e foram tratadas com a STI1 recombinante, verificamos uma redução significativa no percentual de células colapsadas. Este dado traz à tona uma significativa evidência que, de fato, baseado nos dados apresentados nesta tese, a proteína STI1 interage com a GTPase GFP-Rnd1 e regula negativamente a sua atividade sobre o citoesqueleto das células COS-7. Curiosamente, os ensaios de *pulldown* mostraram que STI1 não interage com a GTPase RhoD (figura 14) sendo que já é conhecido da literatura que, RhoD antagoniza o efeito da Rnd1 tanto em cones de crescimento de neurônios da raiz do gânglio nervoso, em cultivo primário, quanto em ensaios de colapso de citoesqueleto em células COS-7 (Zanata *et al.*, 2002b).

Pelo motivo descrito no parágrafo anterior, é possível sugerir que STI1 possa ligar-se à Rnd1 bloqueando sua interação com o domínio GAP citoplasmático da plexina-A1. Tal impedimento pode ser induzido pelo seqüestro de Rnd1 para o citoplasma pela STI1, impedindo sua interação com a porção citoplasmática da plexina-A1 como descrito por Zanata e colaboradores (2002b), simples sobreposição de sítios de interação em Rnd1, responsável pela interação com a porção citoplasmática da plexina-A1 e com a STI1. Outra possibilidade seria a de que a interação de STI1 com Rnd1 poderia promover uma alteração conformacional em Rnd1 que a impeça de interagir com a plexina-A1. Nas três possibilidades levantadas, a ligação de RhoD com a plexina-A1 promoveria a conseqüente reversão da desorganização do citoesqueleto de actina induzido pela interação Rnd1/plexina-A1.

Guirland e colaboradores (2004), mostraram que a desorganização de *lipid rafts* em neurônios de embrião de *Xenopus*, induzida droga M β CD, compromete os efeitos repulsores da semaforina-3A. Os autores perceberam que o tratamento dos neurônios com 5mM da droga M β CD, não compromete a motilidade dos cones de crescimento e sua morfologia, mas em ensaios de *turning*, quando os neurônios tratados com a M β CD não eram atraídos pelos estímulos (BDNf ou netrina-1). Como a semaforina funciona, nestes neurônios como uma molécula quimiorrepulsora, os

neurônios com os *lipid rafts* desorganizados deixaram de ser repelidos no ensaio de *turning*.

Os resultados obtidos com os ensaios de colapso (figuras 22 e 23) analisados em conjunto com os dados da literatura que mostram a participação de Rnd1 na via de sinalização desencadeada pela semaforina-3A (Zanata *et al.*, 2000b) e os resultados de Guirland e colaboradores com neurônios de embriões de *Xenopus*, sugerem a participação dos *lipid rafts* na mesma via caracterizada por Zanata e colaboradores. Além destes dados envolvendo a GTPase Rnd1, dados recentes da literatura sugerem e mostram por espectrometria de massas a localização de STI1 nos *lipid rafts* em diversos tipos celulares (Caetano *et al.*, 2008, Lin *et al.*, 2009).

Por esta razão, investiu-se na padronização da técnica descrita por Keshet e colaboradores (2000) para o estudo da distribuição de Rnd1 e STI1 nos *lipid rafts*. A análise destes resultados poderia ajudar na elaboração, de um provável mecanismo de atuação de STI1 na regulação da atividade de Rnd1.

5.5 Análise da possível localização das proteínas STI1 e Rnd1 em microdomínios de membrana (*lipid rafts*)

Os *Lipid rafts* são microdomínios ricos em colesterol e esfingolipídios, presentes na membrana plasmática e que são resistentes à solubilização por detergentes em baixa temperatura. Evidências na literatura sugerem que tais estruturas estariam envolvidas em eventos relacionados à neuritogênese e a diversos processos de sinalização intracelulares e que proteínas miristoiladas e/ou palmitoiladas estariam localizadas na porção intracelular destes microdomínios de membrana (Limpert *et al.*, 2007, Allen *et al.*, 2007, Mishra *et al.*, 2007, Resh, 1999, Prinetti *et al.*, 1999). A proteína Rnd1 é farnesilada e localiza-se na porção intracelular da membrana plasmática (Nobes *et al.*, 1998), não apresentando, portanto, uma modificação pós-traducional capaz de direcioná-la para os *lipid rafts*.

Pela ausência, também, de um sinal que a direcione para os *lipid rafts*, STI1 não pode ser caracterizada, assim como Rnd1, como uma proteína residente destes microdomínios. Entretanto, tanto Rnd1 quanto STI1 podem atuar como moléculas transitórias desta região da membrana plasmática, em resposta a um estímulo bioquímico, assim como as proteínas adaptadoras SOS que se associa aos *lipid rafts* após estímulo com EGF em células Rat-1 e CAP que apesar de ter o domínio SoHo de direcionamento para *lipid rafts*, só se acumula nestes domínios de membrana após estímulo com NGF, e além de SOS e CAP, os receptores para NGF, as proteínas TrkA e TrkB quando fosforiladas (Limpert *et al.*, 2006, Suzuki *et al.*, 2004, Mineo *et al.*, 1996).

A eficiência da técnica foi confirmada com as diversas abordagens utilizadas. A reação de *Western blot* das figuras 24 B e 26 e 27, não deixa dúvida quanto à eficiência da padronização do método, pois proteínas marcadoras de *lipid rafts* como PrP^C e flotilina-1 foram imunodetectadas nas diversas purificações realizadas, sendo que a primeira é GPI ancorada na célula e a segunda acilada e intracelular (Carcea *et al.*, 2010, Mishra *et al.*, 2007, Taylor *et al.*, 2005, Keshet *et al.*, 2000, Naslavsky *et al.*, 1997). Além destas evidências, as proteínas identificadas por espectrometria de massas (tabela 2) de uma faixa determinada de massas do gel da figura 25, também confirmam a qualidade das purificações dos *lipid rafts*.

Os *lipid rafts* purificados a partir de amostras de cérebro e cerebelo de camundongos selvagens adultos para a proteína PrP^C, foram imunodetectados com

anticorpo anti-PrPc nas frações 3 a 6 de cérebro e 3 a 5 de cerebelo (figuras 26 A e B, respectivamente). Nas mesmas figuras, assim como na imunoprecipitação de STI1 a partir de amostras de *lipid rafts* (figura 12), é possível verificar que STI1 também é evidenciada nos *lipid rafts* assim como PrP^C. O mesmo padrão de distribuição de STI1 é observado em encéfalos de embriões com 17 dias de desenvolvimento (figura 28). Entretanto, é notável a presença de STI1 nas frações de membranas do gradiente que são solúveis em Triton X-100 (frações solúveis) a 4°C em todas as amostras analisadas.

É possível também observar a presença de Rnd1, nas frações correspondentes aos *lipid rafts* em cérebro, e encéfalo de camundongos E17 (figura 28), entretanto, não foi possível detectar a presença da GTPase nos *lipid rafts* de cerebelo de camundongo adulto, provavelmente em função da heterogeneidade da composição destes microdomínios de membrana (revisito por Mishra *et al.*, 2007). Entretanto, é significativa a concentração maior das duas proteínas nas frações solúveis em Triton X-100 do gradiente, sendo que estes resultados corroboram a hipótese de interação entre as duas proteínas em *lipid rafts* de cérebro de forma transitória.

A análise do perfil eletroforético das amostras de *lipid rafts* (figura 30 A) e fração solúvel (figura 30 B) em duas dimensões, deixa claro a riqueza de moléculas presentes na fração solúvel, justificável pelo fato de que nesta fração do gradiente estão presentes todo o *proteoma* intracelular e de membranas solúveis em Triton X-100 a 4°C. Contudo, também não é novidade a baixa concentração de proteínas nos *lipid rafts*, resultado já constatado pelos géis corados com *Coomassie* (figuras 24 A e 32 A). Esses microdomínios da membrana plasmática comporta moléculas muitas vezes de forma transitória, sendo as residentes pouco representativas, justificando desta forma a pouca concentração protéica. Somando-se à baixa concentração de proteínas presentes nos *lipid rafts* esta a dificuldade em se separar proteínas de membranas com boa qualidade em géis bidimensionais.

Resultados relevantes podem ser observados nas figuras 31 A e B. Nas reações de *Western blot* com o anticorpo anti-STI1, podemos perceber uma nítida diferença no perfil eletroforético da STI1 presente na fração solúvel (figura 31 A) quando comparada com a STI1 presente nos *lipid rafts* (figura 31 B). Na figura 31 A (painel superior, WB anti-STI1) podemos perceber a presença de seis *spots* com massa molecular esperada de 66 kDa (da esquerda para a direita, a partir do

marcador de massa molecular) com diferenças variáveis de pI. O primeiro *spot* tem pI mais ácido, enquanto o quarto e o quinto *spot*, são bem mais representativos, e possuem pI mais básicos, em comum todos estão na mesma altura. Dentre os spots de massa molecular mais baixa, não percebemos nem o primeiro e mais ácido nem o último e mais básico. Entretanto é visível a mesma predominância, observada na isoforma da STI1 de massa maior, do quarto e quinto spots na reação de *Western blot*.

STI1 pode ser encontrada no citoplasma, sistema de Golgi, lisossomos e na superfície celular (Zanata *et al.*, 2002a, Agarraberes *et al.*, 2001, Lässle *et al.*, 1997; Martins *et al.*, 1997, Honoré *et al.*, 1992) e mais recentemente, foi descrito e fisiologicamente caracterizado um sinal de localização nuclear, denominado NLS (Longshaw *et al.*, 2000 and 2004). Somando-se a estes dados relatados inclui-se o fato de que STI1, em estudos com células NIH3T3 usando inibidores de serina/treonina fosfatases, sugerem fosforilação da STI1 nestes resíduos de aminoácidos (Daniel *et al.*, 2008), por esta razão, hoje STI1 é também conhecida como STIP1 (Stress-Inducible Phospho-Protein-1). Esses dados analisados em conjunto com os discutidos no parágrafo anterior, podem explicar a variedade de pI apresentados pela STI1 presente na fração solúvel, já que a depender do local onde STI1 se encontre e da sua condição fisiológica no momento da purificação dos *lipid rafts*, esta proteína pode ser fosforilada em maior ou menor intensidade.

Quanto à diferença de massa molecular entre as duas isoformas, detectadas em trabalhos anteriores (Hajj *et al.*, 2009) e também detectadas na reação de *Western blot* da figura 31 A, fica evidente que a isoforma de massa maior, está provavelmente restrita ao citoplasma ou frações de membranas solúveis das células de cérebro de camundongos adultos. Tanto na fração solúvel quanto nos *lipid rafts* (figura 31 A e B, respectivamente), podemos perceber que Rnd1 sofreu alteração aparente em seu pI, pois os spots nas duas reações com o anticorpo anti-Rnd1 apresentam pI mais ácido do que o esperado. O pI calculado (Expasy – Computer pI/MW) para a seqüência de aminoácidos da Rnd1 de camundongo (Nº de acesso Q8BLR7 - UniProtKB/Swiss-Prot) seria de 7,9. Essa alteração no pI observado na reação de *Western blot*, pode ser decorrente da preparação da amostra.

Até o presente momento, não houve na literatura nenhum relato da presença de Rnd1 nos *lipid rafts*. Entretanto trabalhos recentes têm evidenciado a participação

da via Sema-3A/Neuropilin-1(Nrp1)/plexinaA1 na regulação da apoptose (Moretti *et al.*, 2008, Shirvan *et al.*, 2002, Bagnard *et al.*, 2001). Moretti e colaboradores (2008) mostraram que a sema-3A, através da atividade de plexina-A1, aumenta o deslocamento da proteína Fas, ligante de morte celular para receptores da família TNF, das frações solúveis de membrana para os *lipid rafts* em células *Jurkat* e HUT78 induzido as células a apoptose. Neste mesmo trabalho, os autores caracterizaram a presença da proteína Nrp1 nos *lipid rafts* de células *Jurkat*, além disso, conseguiram mostrar que o tratamento das células *Jurkat* com o anticorpo anti Nrp1 evitou a atividade da Sema-3A –Fc sobre a proteína Fas, evitando seu deslocamento das frações solúveis de membrana para os *lipid rafts*. Além deste relevante achado, o mesmo trabalho mostra que com a exposição de células *Jurkat* a sema-3A-Fc, o receptor plexina-A1 seria o responsável por transportar a proteína Fas, para os *lipid rafts*, de forma não caracterizada pelos autores, associada à proteínas envolvidas na regulação de citoesqueleto como RhoA, Ezrin e RhoGDI.

Assim, existem fortes evidências de que Rnd1, assim como a RhoA em células *Jurkat*, possa também transitar entre frações solúveis de membranas e os *lipid rafts* de neurônios de *Xenopus* (Guirland *et al.*, 2004) ou de neurônios da raiz ganglionar (DRG) (Zanata *et al.*, 2000b), em associação com a plexina-A1 por exemplo. Neste caso, levando em consideração a ação de STI1 sobre a atividade de GFP-Rnd1 nos ensaios de colapso (figura 22 e 23) poderíamos propor que STI1 poderia impedir que Rnd1 deslocasse das frações solúveis para os *lipid rafts* em resposta ao estímulo da sema-3A, assim como descrita para a GTPase RhoA por Moretti e colegas (2008). Entretanto, novos ensaios de colapso com células COS-7 precisariam ser feitos, agora reconstituindo todas as condições para desencadear a resposta nas células frente ao seu tratamento com a Sema-3A (Zanata *et al.*, 2000b) e a STI1 recombinante. A partir deste ensaio, poderíamos realizar a purificação dos *lipid rafts* das células COS-7 e avaliar o comportamento das proteínas Rnd1 e STI1.

Apesar dos resultados relevantes mostrados até aqui, mais perguntas surgiram. Uma delas foi a qual porção dos *lipid rafts* STI1 estaria associada? Na porção intracelular ou extracelular da membrana plasmática? Essa pergunta precisaria ser respondida, pois a hipótese de que os *lipid rafts* possam atuar como uma plataforma para regular a atividade de Rnd1 pela STI1, depende da localização intracelular de STI1 nos *lipid rafts*.

Para tentar responder a esta pergunta investiu-se no uso da linhagem celular PC-12. Mas esta alternativa trouxe alguns problemas. O principal seria saber se tais células também secretariam a proteína STI1 como descrito para a proteína endógena de camundongos (Lima *et al.*, 2007; Caetano *et al.*, 2008). Resultados obtidos no laboratório, mostraram ser possível detectar a proteína STI1 em meio condicionado de células PC-12, HEK 293T transfectadas com o vetor para a expressão da quimera GFP-STI1. Assim, mostramos que STI1 é secretada por estas linhagens celulares (dados não mostrados). A partir da confirmação da secreção de STI1 pelas células PC-12, passamos a utilizar esta linhagem para analisar a localização de STI1 nos *lipid rafts*. O estabelecimento desta linhagem, na padronização do estudo da localização celular de STI1 nos *lipid rafts*, favoreceria também a ensaios futuros de neuritogênese para analisar a importância dos *lipid rafts* para a função da GTPase Rnd1 e sua interação com a STI1.

As purificações foram bem sucedidas (figura 32 A e B) e a desorganização dos *lipid rafts* com a M β CD, foi capaz de promover a desorganização dos microdomínios de membrana das células PC-12 (figuras 32 C e D). A desorganização dos *lipid rafts* causada pela ação M β CD pode ser constatada pela maior distribuição da proteína PrPc ao longo do gradiente de purificação (figura 32 D, painel inferior). Essa desorganização promoveu também um deslocamento de STI1, sendo que esta proteína acumulou-se nas frações 7 e 8 (figura 32 D), que correspondem a frações solúveis.

As proteínas da figura 33 A (1 e 2), que foram utilizadas para a espectrometria de massas e identificação por PMF, actina e a miosina não muscular reforçam a qualidade da purificação. Tais moléculas são descritas como componentes de *lipid rafts* (Lin *et al.*, 2010, Berkane *et al.*, 2007, Kim *et al.*, 2006, Pompach *et al.*, 2004, Chen *et al.*, 2003, Nebl *et al.*, 2002) por associação com uma proteína conhecida como supervilina (SV) (Nebl *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003). A supervilina é uma proteína fortemente ligada à membrana plasmática interna, concentrada em pontos de interação célula-célula em tecido epitelial e em adesões focais (Takizawa *et al.*, 2006, Pestonjamas *et al.*, 1997). Esta proteína também já foi caracterizada como um componente dos *lipid rafts* de células *Jurkat* (von Haller *et al.*, 2001). Em 2002, Nebl e colaboradores mostraram através de ensaios de interação protéica, que algumas proteínas presentes nos *lipid rafts* de células *Jurkat*

interagem com a supervilina, dentre elas a actina e a miosina não muscular, também identificadas em nossos *lipid rafts* (tabela 2 e figura 33).

Como a supervilina foi caracterizada como ligante da miosina não muscular (II) e de F-actina, ela foi proposta como molécula organizadora do complexo actina/miosina nos *lipid rafts* (Nebl *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003). Assim, a presença de actina e miosina, apesar de não termos isolado banda no gel que identificasse a proteína SV, na nossa purificação de *lipid rafts* de células PC-12 sugere a presença da SV, que como é fortemente ligada aos *lipid rafts*, provavelmente arrastou tanto actina quanto a miosina para tais frações (figuras 32 A e C e 33 A). As mesmas bandas não são observadas (figura 33 A) quando as células são tratadas com a M β CD, confirmando a desorganização dos *lipid rafts*. Este dado confirma, portanto, que a STI1 está realmente presente nos *lipid rafts*, tanto de células PC-12 quanto em amostras de encéfalo, por analogia entre os resultados. Mas estes dados ainda não mostram a localização de STI1 (intra ou extracelular) nos microdomínios de membrana em estudo.

Para conhecer a localização, intra ou extracelular da STI1 nos *lipid rafts*, as células PC-12 foram biotinizadas na superfície celular, como descrito em material e métodos. Após purificação dos *lipid rafts* as frações (3 a 6) correspondentes aos *lipid rafts* em cérebro, foram combinadas e o mesmo foi feito com as frações 9 a 12 que correspondem à frações de membranas solúveis em cérebro de camundongo. Após solubilização dos *lipid rafts* (ver detalhes na legenda das figuras 34 e 35) realizou-se ensaios de *pulldown* (figura 34) e imunoprecipitação (figura 35) incubando as amostras com matriz de avidina-agarose ou anti-STI1 respectivamente. O ensaio de *pulldown* (figura 34) deixa evidente que a proteína STI1 foi preferencialmente recuperada da fração solúvel, entretanto a pouca concentração de STI1 presente nos *lipid rafts* (input, primeira canaleta), dificulta a exclusão da presença da proteína STI1 na porção extracelular dos *lipid rafts*. Esse resultado mostra que, na face extracelular da membrana plasmática, STI1 está marcadamente distribuída na fração solúvel de membranas.

Outra abordagem experimental, a imunoprecipitação da proteína STI1 biotinizada (figura 35), foi utilizada para confirmar o resultado do *pulldown*, pois Caetano e colaboradores em 2008, evidenciaram que a capacidade de STI1 em ativar a via de ERK 1/2 (Lopes *et al.*, 2005) dependeria de sua secreção (Lima *et al.*, 2007, Arantes *et al.*, 2009), interação com seu ligante PrPc (Zanata *et al.*, 2002a), e

finalmente sua internalização. Essa investigação da presença de STI1 na porção extracelular dos *lipid rafts*, também é de grande importância para esta tese, já que a interação Rnd1/STI1 foi capaz de induzir a diferenciação celular em células PC-12 (figuras 20 e 21) por ativar a via de sinalização de ERK 1/2.

A análise do resultado da imunoprecipitação (figuras 12 e 35) sugere que a proteína STI1 estaria associada aos *lipid rafts* na sua porção intracelular uma vez que somente é evidenciada pela reação com Extravidina-HRP a proteína STI1 presente nas frações solúveis em Triton X-100. Portanto, a sua participação na promoção da internalização de PrPc descrita por Caetano e colaboradores (2008) deve ocorrer provavelmente através de seu possível deslocamento da fração solúvel, extracelular de membranas, para os *lipid rafts*, também extracelular, promovendo a internalização de PrPc com conseqüente ativação da via de diferenciação de ERK1/2.

São poucos os trabalhos em proteômica de *lipid rafts* que identificaram STI1 em diversos tipos celulares e tecidos. Curiosamente, em 2009, Lin e colaboradores mostraram que em células Jurkat transfectadas com vetor para a expressão do receptor para a quimiocina CCR6, com atividade rafts dependente, e estimuladas com a quimiocina CCL20 em ensaio de migração em *transwell* houve um aumento na presença da proteína STI1 nos *lipid rafts* (Baggiolini *et al.*, 2001, Greaves *et al.*, 1997). A desorganização dos *lipid rafts*, com a M β CD comprometeu a ação quimiotática de CCR6 sobre as células Jurkat estimuladas pela quimiocina CCL20, sugerindo importante papel desta estrutura para a atividade da via CCR6-CCL20. A presença de STI1, assim como outras moléculas como Hsp90 e L-plastina, reduziu após 5 minutos de estímulo com CCL20. Mesmo comportamento descrito para STI1, Hsp90 e L-plastina, foi observado para a atividade de ERK 1/2. Curiosamente, neste trabalho o maior percentual de proteínas recrutadas para os *lipid rafts*, além da STI1, foram aquelas relacionadas com a regulação do citoesqueleto e migração celular.

Desta forma, diversos dados da literatura apontam para uma provável transição entre fração solúvel e *lipid rafts* para as proteínas Rnd1 e STI1. Entretanto, mais evidências precisam ser obtidas para que possamos propor a movimentação de Rnd1, em associação com STI1 para dentro ou para fora dos *lipid rafts*. Esse dado, caso confirmado, abrirá novas perspectivas de compreensão da regulação da atividade da GTPase Rnd1, e possivelmente Rnd2 e Rnd3 por analogia, em eventos celulares relacionados a regulação da plasticidade do citoesqueleto e migração

celular. Compreender o mecanismo da regulação de GTPases relacionadas a migração celular pode inclusive ajudar a controlar a migração de células tumorais em diversos tipos de tumores onde a atividade de GTPases já tenha sido descrita (Parri *et al.*, 2010, Yamazaky *et al.*, 2005, Fukata *et al.*, 2003, Price *et al.*, 2001, Wittmann *et al.*, 2001).

5.6 Hipótese para via de sinalização mediada pela interação entre as proteínas Rnd1 e STI1

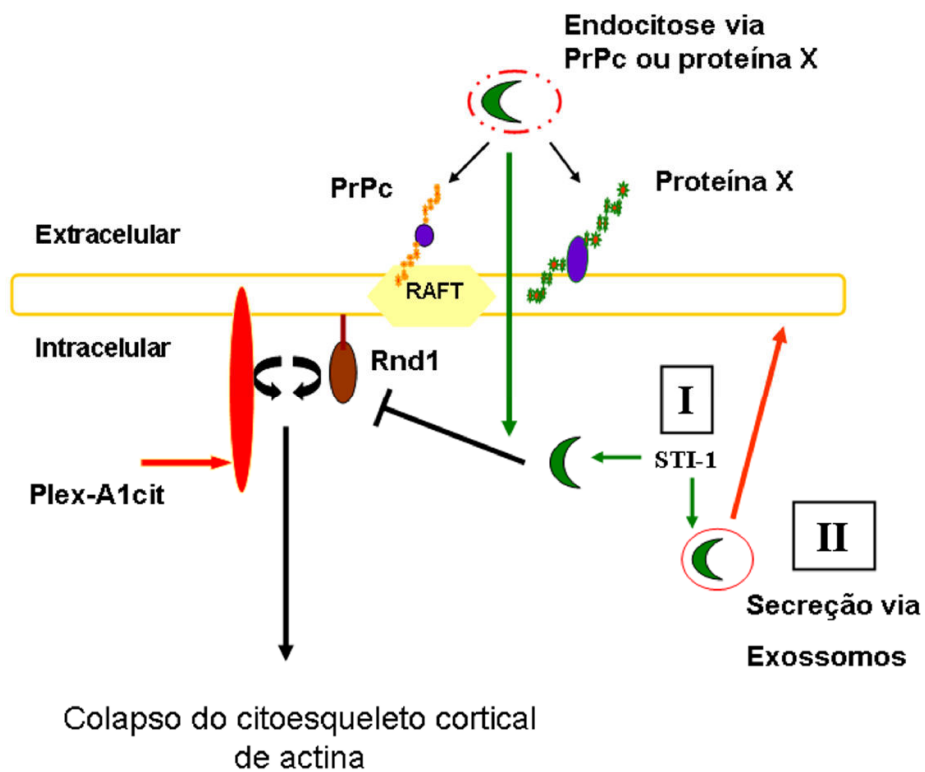


Figura 36. Prováveis vias de regulação da atividade de Rnd1 mediada pela interação com a proteína STI1. Baseado nos resultados apresentados neste trabalho e de dados da literatura é possível propor dois mecanismos de regulação da atividade de Rnd1 pela interação com a proteína STI1. O mecanismo I seria o bloqueio direto do colapso mediado por PlexA1cit/Rnd1 pela interação direta entre a STI1 citoplasmática e a GTPase Rnd1, comprometendo assim a interação Rnd1/PlexA1cit. No mecanismo II STI1 seria secretada por exossomos como já descrito na literatura. Uma vez endocitada seja por ligar em PrPc ou por interagir com outro ligante de superfície desconhecido (proteína X), a proteína STI1 seria endocitada e promoveria a regulação da atividade de Rnd1 como descrito para a forma citoplasmática. A participação dos *lipid rafts* nesta sinalização será uma possibilidade de estudos futuro, uma vez que os diversos resultados apresentados neste trabalho sugerem uma possível participação na sinalização mediada pela interação Rnd1/STI1.

A partir da análise de todos os dados apresentados nesta tese, a figura 36 propõe e resume uma possível atividade biológica de caráter regulatório para a interação Rnd1/STI1 caracterizada. O possível mecanismo proposto na figura 36 leva em consideração todo o embasamento teórico provido por anos de estudos de diversos grupos interessados na fisiologia das proteínas Rnd1 e STI1 envolvidas com o desenvolvimento do sistema nervoso. Portanto, quando a proteína Rnd1 interage com a porção citoplasmática da plexina-A1, como descrito por Zanata e colaboradores (2002b), esta proteína promove um desbalanço na regulação de Rac1 e Rho (Hall, 1998, Sander *et al.*, 1999), levando ao aumento da atividade da proteína quinase LIMK-1, que por vez regula a plasticidade do citoesqueleto de actina por fosforilar e assim inativar a proteína cofilina-1 (Bernard, 2007, Huang *et al.*, 2006).

Assim, levando em consideração que os ensaios de colapso em células COS-7 (figuras 22 e 23) evidenciou que a proteína GFP-STI1 expressa e presente na porção citoplasmática da célula possa interagir com a proteína GFP-Rnd1 possivelmente através da sequência dos aminoácidos 53-61 (Ishikawa *et al.*, 2003) exclusiva de Rnd1. Tal interação bloqueia a atividade de GFP-Rnd1 sobre o citoesqueleto das células COS-7, evitando conseqüentemente o colapso. Assim, a partir destes dados propomos a via I (figura 36). Rnd1 ligada em STI1 não interage com o domínio GAP da plexina-A1 (Zanata *et al.*, 2002b), deixando tal região da plexina-A1 disponível para a ligação, por exemplo, à GTPase RhoD, que interessantemente, não mostrou afinidade à proteína STI1 nos nossos ensaios de *pull-down* (figuras 14 A e B).

Tal regulação da atividade de Rnd1 pela interação com a STI1, nesta via particularmente relacionada ao mecanismo de repulsão de neurônios mediado pela Sema-3A (Zanata *et al.*, 2002b) sugere fortemente o envolvimento dos *lipid rafts*, já que diversos trabalhos mostraram e sugeriram a participação destes microdomínios na via de sinalização de Sema-3A (Guirland *et al.*, 2004, Carcea *et al.*, 2010, Moretti *et al.*, 2008). Entretanto, mais experimentos precisam ser feitos para futuramente associar a interação Rnd1/STI1 à participação dos *lipid rafts*. Ensaios envolvendo o modelo de colapso em células COS-7 com a montagem de seus ligantes por transfecção e exposição das células às proteínas recombinantes Sema-3A e ⁶His-STI1 (de acordo com a figura 15), seguido da purificação dos *lipid rafts*, poderia nos

dar uma forte evidência do comportamento da proteína Rnd1 e da distribuição das diversas moléculas envolvidas (Plexina-A1, Nrp-1 e STI1).

Entretanto devido a diversidade da distribuição de STI1 nos mais variados compartimentos celulares e de sua possível secreção via exossomos (Daniel *et al.*, 2008, Caetano *et al.*, 2008, Lima *et al.*, 2007, Arantes *et al.*, 2009, Longshaw *et al.*, 2004, Lässle *et al.*, 1997, Honoré *et al.*, 1992, Martins *et al.*, 1997), levantou-se a possibilidade de se investigar a participação da STI1 secretada (no nosso caso mimetizada pelo uso da $_6$ His-STI1) na regulação da atividade da Rnd1 sobre o citoesqueleto de células COS-7. Assim, as células foram tratadas com a proteína recombinante ($_6$ His-STI1) que foi capaz de reverter o efeito da GTPase quimérica GFP-Rnd1 (figura 23). Curiosamente, Lin e colaboradores (2009), em análise de expressão proteômica quantitativa em células T migratórias, identificaram aumento de diversas proteínas associadas à regulação da plasticidade do citoesqueleto, e dentre elas a proteína STI1, relacionando desta forma citoesqueleto e a proteína STI1.

A partir da interpretação deste resultado e dados da literatura que evidenciaram a internalização de STI1 via *lipid rafts*, independentemente da proteína príon celular (Caetano *et al.*, 2008), propusemos uma segunda via de regulação da atividade de Rnd1 mediada pela sua interação com a STI1 (figura 36, II). Assim, STI1 seria secretada via exossomos, internalizada via *lipid rafts* e então novamente liberada ou exposta no meio intracelular, onde interagiria com a GTPase Rnd1, bloqueando sua interação com o domínio citoplasmático da plexina-A1, favorendo, assim, em neurônios a ligação da GTPase RhoD com a plexina-A1 evitando o colapso do citoesqueleto em cones de crescimento (Caetano *et al.*, 2008, Lima *et al.*, 2007, Zanata *et al.*, 2002b).

Desta forma, ao final deste trabalho propomos STI1 como mais um parceiro molecular para a pequena GTPase monomérica Rnd1 (Nobes *et al.*, 1998). Esta relevante colaboração para a compreensão do mecanismo de regulação da Rnd1 abre novos caminhos, inclusive, para relacionar a atividade de STI1 com a regulação do citoesqueleto e migração celular.

6. CONCLUSÕES

- As proteínas GST, GST-Rnd1 e $_{6}$ His-STI1 foram devidamente expressas e purificadas;
- As proteínas GST, GST-Rnd1, GST-Rnd2, GST-RhoG, GST-RhoD foram devidamente expressas para os ensaios de *pulldown*;
- Os anticorpos policlonais produzidos (anti-GST, anti-STI1 e anti-Rnd1) reconhecem especificamente as proteínas de interesse;
- Os ensaios de interação, *pulldown* e co-immunoprecipitação evidenciaram interação preferencial entre as proteínas GST-Rnd1 e a STI1 presente em encéfalos de camundongos adultos e embrionário (E17);
- A proteína STI1 reverte o efeito de colapso de citoesqueleto induzido pela interação plexina-A1 (porção citoplasmática) e da GFP-Rnd1 em células COS-7, sugerindo papel regulador da STI1 sobre a atividade da GTPase Rnd1. Tal regulação pode ser promovida tanto pela STI1 citoplasmática quanto pela secretada, como sugerido no ensaio com a STI1 recombinante;
- Em células PC-12, N2a e SHSY-5Y transfectadas, STI1 reverte o efeito neurotrogênico da Rnd1 reduzindo o percentual de células com neuritos e promovendo junto com a STI1 a extensão de neuritos maduros;
- A expressão de STI1 induz a expressão de neurofilamento médio (145 kDa) sugerindo diferenciação celular. A dupla transfecção parece promover uma maior atividade da via clássica de ERK1/2;
- Rnd1 e STI1 foram evidenciadas em *lipid rafts* de cérebro de camundongos;
- STI1 parece estar localizada na porção intracelular dos *lipid rafts* em células PC-12.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allen, J., Halverson-Tamboli, R. A., Rasenick, M. – **Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling.** Nature review/neuroscience, vol. 8, p 128-140, fevereiro/2007.

Aokil, J. *et al.* - **Rnd1, a novel Rho family GTPases, induces the formation of neuritic processes in PC12 cells.** Biochem. and Biophysical Research Communications, vol. 278, nº 3, p 604-608, 2000.

Arantes, C. *et al.* – **Prion protein and its ligand Stress-inducible Protein 1 regulate astrocyte development.** Glia, nº 57, p 1439-1449, 2009.

Baberis, D. *et al.* – **p190 Rho-GTPase activating protein associates with plexins and it is required for semaphoring signaling.** Journal of Cell Science, vol. 20, nº 118, p 4689-4700, julho/2005.

Bamji, S. – **Cadherins: actin with the cytoskeleton to form synapses.** Neuron, minireview, vol. 47, p 175-178, julho/2005.

Bar-Sagi, D. e Hall, A. – **Ras and Rho GTPases: a family reunion.** Cell, review, vol.103, p 227-238, outubro/2000.

Beraldo, F. H. *et al.* – **Role of α -7 nicotinic acetylcholine receptor in calcium signaling induced by prion protein interaction with Stress-Inducible Protein-1.** The Journal of Biological Chemistry, vol. 285, nº 47, p 36542-36550, novembro/2010.

Bernard, Ora – **Lim kinases, regulators of actin dynamics.** The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, nº 39, p 1071-1076, 2007.

Bernards, A. e Settleman, J. – **GAPs in growth factor signalling.** Growth Factors, vol. 23, nº 2, p 143-149, junho/2005.

Blatch, G.L. *et al.* **Isolation of a mouse cDNA encoding mSTI1, a stress-inducible protein containing the TPR motif gene.** 194, p 277-282, 1997.

Blatch, G. e Lässle, M. – **The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions.** BioEssays, vol. 21, p 932-939, 1999.

Bosco, E.E., Mulloy, J. C. e Zheng, Y. – **Rac1 GTPase: a “Rac” of all trades.** Cellular and Molecular Life Sciences, vol. 66, nº 3, p 370-374, 2009.

Bradford, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Anal. Biochem., vol 72, p 248-254, 1976.

Burrige, K. e Wennerberg, K. – **Rho and Rac take center stage.** Cell, vol. 116, p 167-179, janeiro/2004

Caetano, F. *et al.* – **Endocytosis of prion protein is required for ERK 1/2 signaling induced by Stress-Inducible Protein 1.** The Journal of Neuroscience, Neurobiology of Disease, vol.28, nº 26,p 6691-6702, junho/2008.

Calderwood, S. *et al.* – **Extracellular heat shock proteins in cell signaling.** FEBS Letters, nº 581, p 3689-3694, 2007.

Carcea, I. *et al.* – **Flotillin-mediated endocytic events dictate cell type-specific responses to semaphorin-3A.** The Journal of Neuroscience, vol. 30, nº 45, p 15317-15329, novembro/2010.

Carrigan, P. E. *et al.* – **Multiple domains of the co-chaperone Hop are important for Hsp70 binding.** The Journal of Biological Chemistry, vol. 279, nº 16, p 16185-16193, abril/2004.

Chardin, P. – **Function and regulation of Rnd proteins.** Nature reviews/Molecular Cell Biology, vol. 7, p 54-62, janeiro/2006.

Chiarini, L.B. Freitas *et al.* – **Cellular prion protein transduces neuroprotective signals.** EMBO, 2002.

Costa, M.D.M *et al.* – **Characterization of a specific interaction between ADAM-23 and cellular prion proteína.** Neuroscience Letters, 2009.

Daniel, S. *et al.* - **Nuclear translocation of the phosphoprotein Hop (Hsp70/Hsp90 organizing protein) occurs under heat shock, and its proposed nuclear localization signal is involved in Hsp90 binding.** Biochimica et Biophysica Acta, nº 1783, p 1003-1014, 2008.

Del Pozo, M. A. *et al.*, **Adhesion to the extracellular matrix regulates the coupling of the small GTPase Rac to its effector PAK.** The EMBO Journal, vol. 19, nº 9, p 2008-2014, 2000.

Diesbach, P. *et al.* – **Differential subcellular membrane recruitment of src may spcify its downstream signaling.** Experimental Cell Research, nº 314, p 1465-1479, janeiro/2008.

Ettienne-Manneville, S. e Hall, A. – **Rho GTPases in cell biology.** Nature review, vol. 420, p 629-635, dezembro/2002.

Flom, Gary *et al.* – **Definition of the minimal fragments of STI1 required for dimerization, interaction with Hsp70 and Hsp90 and *in vivo* functions.** Biochem. Journal, nº 404, p 159-167, 2007.

Flom, Gary *et al.* – **Effect of mutation of the tetratricopeptide repeat and asparatate-proline 2 domains of STI1 on the Hsp90 signaling and interaction in *Saccharomyces cerevisiae*.** Genetics, nº 172, p 41-51, janeiro/2006.

Foster, L., Hoog, C. L. e Mann, M. – **Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors.** PNAS, vol. 100, nº 10, p 5813-5818, maio/2003.

Fujita, H. *et al.* – **Rapostlin is a novel effector of Rnd2 GTPase inducing neurite branching.** The Journal of Biological Chemistry, vol. 277, nº 47, p 45428-45434, novembro/2002.

Fukata, M., Nakagawa, M. e Kaibuchi, K. – **Roles of Rho-family GTPases in cell polarization and directional migrations.** Current Opinion, nº 15, p 590-597, 2003.

Eustace, B. K. *et al.* – **Functional proteomic screens reveal an essential extracellular role for Hsp90 α in cancer cell invasiveness.** Nature Cell Biology, 2004.

Gastpar, R. *et al.* – **Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells.** Cancer Research, vol. 12, nº 65, p 5238-5247, junho/2005.

Greenberg, M. E. *et al.* – **Nerve growth factor and epidermal growth factor induce rapid transient changes in proto-oncogene transcription in PC-12 cells.** JBC, 1985.

Goh, L. L. e Manser, Ed – **The RhoA GEF Syx is a target of Rnd3 and regulate via Raf-1 ubiquitin-related domain.** PLoS One, vol. 5, nº 8, p 1-10, 2010.

Guirland, *et al.* – **Lipid rafts mediate chemotropic guidance of nerve growth cones.** Neuron, vol. 42, p 51-62, abril/2004.

Hajj, G. *et al.* – **Developmental expression of prion protein and its ligands Stress-Inducible Protein 1 and vitronectin.** The Journal of Comparative Neurology, nº 517, p 371-384, julho/2009.

Harada, A. Katoh, H. e Negishi, M. – **Direct interaction of Rnd1 with FRS2 β regulates Rnd1-induced down-regulation of RhoA activity and is involved in fibroblast growth factor-induced neurite outgrowth in PC-12 cells.** The Journal of Biological Chemistry, vol. 280, nº 18, p 18418-18424, maio/2005.

Harlow, E.; Lane, D. - **Antibodies: a laboratory manual.** 1^a Edição, CSH Press, USA, 1988.

Hernandez, M. P., Sullivan, W. P. e Toft, D. O. – **The assembly and intermolecular properties of the Hsp70-Hsp90 molecular chaperone complex.** The Journal of Biological Chemistry. Nº 277, p 38294-38304, 2002.

Honoré, B. *et al.* - **Molecular cloning and expression of a transformationsensitive human protein containing the TPR motif and**

sharing identity to the stress-inducible yeast protein STI1. The Journal of Biological Chemistry, vol. 267, n° 12, p 8485-8491, abril/1992.

Ishikawa, Y., Katoh, H. e Negishi, M. – **Small GTPase Rnd1 is involved in neuronal activity-dependent dendritic development in hippocampal neurons.** Neuroscience Letters, n° 400, p 218-223, 2006.

Ishikawa, Y., Katoh, H. e Negishi, M. – **A role of Rnd1 GTPase in dendritic formation in hippocampal neurons.** The Journal of Neuroscience, vol. 23, n° 35, dezembro/2003.

Karaulanov, E. *et al.* – **Unc5B interacts with FLRT3 and Rnd1 to modulate cell adhesion in *Xenopus* embryos.** PLoSOne, vol. 4, n° 5, p 1-9, maio/2009.

Katoh, H. *et al.* – **Socius is a novel Rnd GTPase-interacting protein involved in disassembly of actin stress fibers.** Molecular and Cellular Biology, vol. 22, n°9, p 2952-2964, maio/2002.

Keshet, G. I. *et al.* – **The cellular prion protein colocalizes with the dystroglycan complex in the brain.** Journal of Neurochemistry, vol. 75, n° 05, p 1889-1897, julho/2000.

Kim, Yoon-Sun *et al.* – **Differences in the gestational pattern of mRNA expression of the Rnd family in rat and human myometria.** Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, n° 142, p 410-415, 2005.

Kim, Yoon-Sun *et al.* – **Up-regulation of Rnd1 during pregnancy serves as a negative-feedback control for Ca²⁺ sensitization of contractile elements in rat myometrium.** BBRC, n° 311, p 972-978, 2003.

Kinbara, K. *et al.* – **Ras GTPases: integrins friends or foes?** Nature reviews/Molecular Cell Biology, vol. 4, p 767-776, outubro/2003.

Kruger, R. Aurand, J. e Guan, Kun-Liang – **Semaphorins commad cells to move.** Nature reviews/molecular cell biology, vol. 6, p 789-800, outubro/2005.

Lässle, M. *et al.* - **Stress-inducible, murine protein mSTI1. Characterization of binding domains for heat shock proteins and *in vitro* phosphorylation by different kinases.** Journal of Biological Chemistry, vol. 272, n° 3, p 1876-1884, janeiro/1997.

Li, Ying-Hua *et al.* - **Rnd1 regulates axon extension by enhancing the microtubule destabilizing activity of SCG10.** The Journal of Biological Chemistry, 2008.vol. 284, n° 1, p 363-371, janeiro/2009

Lima, F. R. S. *et al.* – **Cellular prion protein expression in astrocytes modulates neuronal survival and differentiation.** Journal of Neurochemistry, 2007.

Limpert, A, Karlo, j. C., Landreth, G. E. - **Nerve growth factor stimulates the concentration of TrkA within lipid rafts and extracellular signal-regulated kinase activation through c-Cbl-associated protein.** Molecular and Cellular Biology, vol. 27, nº 16, p 5686-5698, agosto/2007.

Lin, Shu-Ling *et al.* – **Temporal proteomics profiling of lipid rafts in CCR6-activated T cells reveals the integration of actin cytoskeleton dynamics.** Journal of Proteomic Research, 2010.

Lindenbaum, M.H. *et al.* – **Nerve growth factor enhances the synthesis, phosphorylation, and metabolic stability of neurofilament proteins in PC-12 cells.** JBC, 1987.

Longshaw, *et al.* - **Nuclear translocation of the Hsp70/Hsp90 organizing protein mSTI1 is regulated by cell cycle kinases.** Journal of Cell Science, nº 117, p 701-710, 2004.

Longshaw, *et al.* – **The TPR2B domain of the Hsp70/Hsp90 organizing protein (Hop) may contribute towards its dimerization.** Protein and Peptides Letters, vol. 16, nº 4, p 402-407, 2009.

Longshaw, *et al.* – **Knockdown of the co-chaperone Hop promotes extranuclear accumulation of Stat3 in mouse embryonic stem cells.** European Journal of Cell Biology, nº 88, p 153-166, 2009.

Lopes, M. H., *et al.* - **Interaction of cellular prion and Stress Inducible Protein 1 promote neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways.** Journal of Neuroscience, vol. 25, nº 49, p 11330-11339, dezembro/2005.

Mannová, *et al.* – **Modification of host lipid raft proteome upon hepatitis C virus replication.** Molecular and Cellular Proteomics, vol. 5, nº 12, p 2319-2325, agosto/2006.

Madore, N. *et al.* – **Functionally different GPI proteins are organized in different domains on the neuronal surface.** The EMBO Journal, vol. 18, nº 24, p 6917-6926, 1999.

Martins, V.R. *et al.* - **Complementary hydrophathy identifies a cellular prion protein receptor.** Nature Méd., 3, p 1376-1382, 1997.

Matallanas *et al.* – **Distinct utilization of effectors and biological outcomes resulting from site-specific Ras activation : Ras functions in lipid rafts and Golgi complex are dispensable for proliferation and transformation.** Molecular and Cellular Biology, vol. 26, nº 1, p 100-116, janeiro/2006.

Mathew, A., Bell, A. e Johnstone, R. M. – **Hsp70 is closely associated with the transferring receptor in exosomes from maturing reticulocytes.** Biochemical Journal, nº 308, p 823-830, 1995.

Mendes, F. *et al.* - **Concentration-dependent actions of glial chondroitin sulfate on the neuritic growth of midbrain neurons.** Developmental Brain Research, vol 142, p 111-119 2003.

Mishra, S. e Joshi, P. G. – **Lipid raft heterogeneity: an enigma.** Journal of Neurochemistry, 2 n° 103, p 135-142, 2007.

Miyamoto, S. *et al.*, **Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules.** The Journal of Cell Biology, vol. 131, n° 3, p 791-805, 1995.

Moretti, S. *et al.* – **Semaphorin-3A signaling controls Fas (CD95)-mediated apoptosis by promoting Fas translocation into lipid rafts.** Blood, vol. 111, n° 4, p 2290-2299, fevereiro/2008.

Naslavsky, N. *et al.* – **Characterization of detergent-insoluble complex containing the cellular prion protein and its scrapie isoform.** Journal of Biological Chemistry, vol. 272, n° 10, p 6324-6331, março/1997.

Naud, N. *et al.* – **Rho family GTPase Rnd2 interacts and co-localizes with MgcRacGAP in mail germ cells.** Biochem. Journal, n° 372, p 105-112, 2003.

Negishi, M. Oinuma, I. e Katoh, H. – **Plexins: axon guidance and signal transduction.** Cellular and Molecular Life Sciences, n° 62, p 1363-1371, 2005.

Nobes, C. D. *et al.* - **A new member of the Rho family, Rnd1, promotes disassembly of actin filament structures and loss of cell adhesion.** The Journal of Cell Biology, vol. 141, n° 1, p 187-197, abril/1998.

Odunuga, O. O., Longshaw, V. M. e Blatch, G. L. – **Hop: more than an Hsp70/Hsp90 adaptor protein.** BioEssays, vol. 26, p 1058-1068, 2004.

Odunuga, O. O. *et al.* – **Tetratricopeptide repeat motif-mediated Hsc-70-mSTI1 interaction. Molecular characterization of the critical contacts for successful binding and specificity.** The Journal of Biological Chemistry, vol. 278, n° 9, p 6896-6904, fevereiro/2003.

Ogata, S. *et al.* – **TGF-beta signaling-mediated morphogenesis: modulation of cell adhesion via cadherin endocytosis.** Genes Dev., n° 21, p 1817-1831, 2007.

Oinuma, I. *et al.* – **Direct interaction of Rnd1 with plexin-B1 regulates PDZ-RhoGEF-mediated Rho activation by plexin-B1 and induces cell contraction in COS-7 cells.** The Journal of Biological Chemistry, vol. 278, n° 28, p 25671-25677, julho, 2003.

Okada, A. *et al.* – **Plexin-A4 is expressed in oligodendrocyte precursor cells and acts as a mediator of semaphoring signals.** BBRC, n° 352, p 158-163, 2007.

Ongusaha, P.P. *et al.* – **Rho-E is a pro-survival p53 target gene that inhibits ROCK I-mediated apoptosis in response to genotoxic stress.** *Current Biology*, nº 16, p 2466-2472, dezembro/2006.

Onuoha, S. C. *et al.* – **Structural studies on the co-chaperone Hop and its complexes with Hsp90.** *Journal of Mol. Biology*, nº 379, p 732-744, 2008.

Parri, M. e Chiarugi, P. – **Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control.** *Cell Communication Signaling*, review, vol. 8, nº 23, p 2-14, 2010.

Price, L. S. e Collard, J. G. – **Regulation of the cytoskeleton by Rho-family GTPases: implications for tumor cell invasion.** *Cancer Biology*, vol. 11, p 167-173, 2001.

Prinetti, A. *et al.* – **Glycosphingolipid-enriched signalling domain in mouse neuroblastoma Neuro2a cells – Mechanism of ganglioside-dependent neuritogenesis.** *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, nº 30, p 20916-20924, julho/1999.

Prodromou, C. *et al.* - **Regulation of Hsp90 ATPase activity by tetratricopeptide repeat (TPR)-domain co-chaperones.** *The EMBO Journal*, vol. 18, nº 03, p 754-762, 1999.

Püschel, A. W. – GTPase in semaphoring signaling. In: Pasterkamp, R. J. - **Semaphorins: Receptor and Intracellular Signaling Mechanisms.** Nova Iorque, Springer+Business Science, 2007. p 12-23.

Radeva, G. e Sharon, F. J. – **Isolation and characterization of lipid rafts with different properties from RBL-2H3 (rat basophilic leukaemia) cells.** *Biochem. J.*, nº 380, p 219-230, fevereiro/2004.

Resh, M. D. - **Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1451, 1999.

Richter, K. *et al.* – **STI1 is a non-competitive inhibitor of the Hsp90 ATPase. Binding prevents the N-terminal dimerization reaction during the ATPase cycle.** *JBC*, 2003.

Ridley, A. J. – **Rho proteins and cancer.** *Breast Cancer Research and Treatment*, nº 84, p 13-19, 2004.

Ridley, A. J.; HALL, A. **The small GTP-binding protein Rho regulates the assembly of focal adhesion and actins stress fibers in response to growth factors.** *Cell*, 70, p 389-399, 1992.

Riento, K. *et al.* – **Function and regulation of RhoE.** *Biochemical Society Transactions*, vol. 33, part4, p 649-651, 2005.

Riou, P., Villalonga, P. e Ridley, A. – **Rnd proteins: multifunctional regulators of the cytoskeleton and cell cycle progression.** BioEssays, p 1-7, 2010.

Rhom, B. *et al.* – **Plexin/neuropilin complexes mediate repulsion by the axonal guidance signal semaphoring-3A.** Mechanisms of Development, vol. 93, p 95-104, janeiro/2000a.

Rhom, B. *et al.* – **The semaphoring-3A receptor may directly regulate the activity of small GTPases.** FEBS Letters, n° 486, p 68-72, 2000b.

Rodal, S. K. *et al.* – **Extraction of cholesterol with Methyl- β -cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles.** Molecular Biology of the Cell, vol. 10, p 961-974, abril, 1999.

Roffé, M. *et al.* – **Prion protein interaction with Stress-Inducible Protein 1 enhances neuronal protein synthesis via mTOR.** PNAS, p 1-6, junho/2008.

Sakudo, A. *et al.* – **PrP cooperates with STI1 to regulate SOD activity in PrP-deficient neuronal cell line.** BBRC, n° 328, p 14-19, janeiro/2005.

Sidera, K. *et al.* – **Involvement of cell surface Hsp90 in cell migration reveals a novel role in the developing nervous system.** Vol. 279, n° 29, p 45379-45388, 2004.

Silva Da, J. S. e Dotti, C. G. – **Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis.** Nature reviews/Neuroscience, vol. 3, p 694-704, 2002.

Simons, K. e Toomre, D. – **Lipid rafts and signal transduction.** Nature reviews/molecular cell biology, vol. 01, p 31-41, outubro/2000.

Scheufler, C. *et al.* - **Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine.** Cell, vol 101, p 199-210, 2000.

Schumaker, R. J. *et al.* – **ATP-dependent chaperonin activity of reticulocyte lysate.** The Journal of Biological Chemistry, n° 269, p 9493-9499, 1994.

Schwamborn, *et al.* – **Semaphorin-3A stimulates neurite extension and regulates gene expression in PC-12 cells.** The Journal of Biological Chemistry, vol. 279, n° 30, p 30923-30926, julho/2004

Tateiwa, K., Katoh, H. e Negishi, M. – **Socius, a novel binding partner of $G\alpha_{12/13}$, promotes the $G\alpha_{12}$ -induced RhoA activation.** BBRC, n° 337, p 615-620, setembro/2005.

Takahashi, T *et al.* – **Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors.** Cell, vol. 99, p 59-99, outubro/1999.

Taylor, A. R. *et al.* – **Regulation of heat shock protein 70 release in astrocytes: role of signaling kinases.** *Developmental Neurobiology*, p 1815-1829, junho/2007.

Tsutsumi, S. e Neckers, L. – **Extracellular heat shock protein 90: a role for a molecular chaperone in cell motility and cancer metastasis.** *Cancer Science*, vol. 98, nº 10, p 1536-1539, outubro/2007.

Van der Spy, J. *et al.* – **The co-chaperone murine Stress-Inducible Protein 1: overexpression, purification and characterization.** *Protein Expression and Purification*, vol. 21, p 462-469, 2001.

Van der Spy, J. *et al.* – **Heat shock proteína 70 chaperone-binding site in the co-chaperone murine Stress-Inducible Protein 1 maps to within consecutive tetratricopeptide repeat motifs.** *Biochem. Journal*, nº 345, p 645-651, 2000.

Vayessière, B. *et al.* – **Interaction of the Grb7 adapter protein with Rnd1, a new member of the Rho family.** *FEBBS Letters*, nº 467, p 91-96, 2000.

Waetzig, V. e Herdegen, T. – **The concerted signaling of ERK 1/2 and JNKs is essential for PC-12 cell neuritogenesis and converges at the level of target proteins.** *Molecular and Cellular Neuroscience*, 2003.

Wegele, H. *et al.* – **Dissection of the contribution of individual domains to the ATPase mechanism of Hsp90.** *JBC*, 2003.

Yi, F., Doudevski, I. e Regan, L. – **Hop is a monomer: investigation of the oligomeric state of the co-chaperone Hop.** *Protein Science*, vol. 19, p 19-25, 2010.

Wennerberg, K. *et al.* – **Rnd proteins function as a RhoA antagonists by activating p190 RhoGAP.** *Current Biology*, vol. 13, p 1106-1115, julho/2003.

Wittmann, T. e Waterman-Storer, C. M. – **Cell motility: can Rho GTPases and microtubules point the way ?** *Journal of Cell Science*, commentary, nº 114, p 3795-3803, 2001.

Yamauchi, J., Chan, J. R. e Shooter, E. M. – **Neurotrophins regulate Schwann cell migration by activating divergent signaling pathways dependent on Rho GTPases.** *PNAS*, vol. 101, nº 23, p 8774-8779, 2004.

Yukawa, K. *et al.* – **Sema-4A induces cell morphological changes through B-type plexin-mediated signaling.** *International Journal of Molecular Medicine*, nº 25, p 225-230, 2010.

Yuyama, K. *et al.* – **Translocation of activated heterotrimeric G protein $G\alpha_o$ to ganglioside-enriched detergent-resistant membrane rafts in developing cerebellum.** *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, nº 36, p 26392-26400, setembro/2007.

Zanata, S.M. et al. **The stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion protein that triggers neuroprotection.** The EMBO Journal, vol. 21, n° 13, p 3307-3316, maio/2002a.

Zanata, S.M. et al. **Antagonistic effects of Rnd1 and RhoD GTPases regulate receptor activity in Semaphorin 3A-induced cytoskeletal collapse.** Journal of Neuroscience, vol. 22, n° 2, p 471-477, janeiro/2002b.

Zhao, H. *et al.* – **Neurite outgrowth is dependent on the association os c-Src and lipid rafts.** Neurochem. Research, maio/2009.