

CELSON FÁVARO JUNIOR

**CONSTRUÇÃO DE VETORES PARA IDENTIFICAÇÃO DE LIGANTES DE  
SEMAFORINAS CLASSE 5 ATRAVÉS DO SISTEMA DE DUPLO-HÍBRIDO**

CURITIBA  
2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

**CONSTRUÇÃO DE VETORES PARA IDENTIFICAÇÃO DE LIGANTES DE  
SEMAFORINAS CLASSE 5 ATRAVÉS DO SISTEMA DE DUPLO-HÍBRIDO**

Trabalho de conclusão de curso para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas. Realizado no departamento de Patologia Básica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná – UFPR, sob a orientação da:

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Adriana Frohlich Mercadante.

Curitiba  
2009

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 A Família das Semaforinas e seu Envolvimento na Navegação Axonal.....	2
1.2 Semaforinas de Classe 5.....	4
1.3 Sistema Duplo - híbrido em Levedura.....	9
1.4 Resultados Anteriores.....	11
2. OBJETIVOS.....	13
Objetivo geral.....	13
Objetivos específicos.....	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3.1 Desenho de Iniciadores.....	14
3.2 Reação de Transcriptase Reversa.....	15
3.3 Obtenção dos Insetos por PCR.....	16
3.3.1 Inseto Sema5A domínio citoplasmático.....	16
3.3.2 Inseto Sema5B domínio citoplasmático.....	17
3.4 Replicação do pGILDA.....	17
3.5 Digestões.....	18
3.5.1 Digestão dos Insetos.....	18
3.5.2 Digestão dos Plasmídeos.....	18
3.6 Ligação.....	19
3.7 Replicação dos Vetores em Bactérias.....	20
3.8 PCR de Colônia.....	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.1 Desenho de Iniciadores.....	22
4.2 Obtenção de Insetos.....	23
4.3 Digestões.....	25
4.4 Quantificação, Ligação e Transformação.....	27
4.5 PCR de Colônia.....	29
5. CONCLUSÃO.....	32
REFERÊNCIAS.....	33

## RESUMO

Durante o desenvolvimento do sistema nervoso, os neurônios devem fazer contato correto com alvos específicos que normalmente estão muito afastados. Para isso são necessárias vias sinalizadoras que funcionam como guias no correto direcionamento do cone de crescimento do axônio. Tais vias sinalizadoras são constituídas por moléculas que atraem o axônio para o seu alvo e ao mesmo tempo o repele de vias inapropriadas. Dentre estas moléculas, as semaforinas (Semas) pertencem a uma grande família de proteínas secretadas ou associadas à membrana, envolvidas na navegação axonal, fasciculação, ramificação e formação de sinapses, além da participação na progressão tumoral, angiogênese e diferenciação de linfócitos B. As semaforinas de classe 5 são proteínas transmembrânicas, que contém sete repetições trombospondinas. Dois membros dessa família foram identificados em vertebrados, Sema5A e Sema5B. Na literatura há poucos estudos sobre essa classe específica, especialmente sobre Sema5B. Muitas questões sobre esta molécula permanecem em aberto, tais como sua modulação, expressão celular e papéis específicos. O trabalho em questão teve como objetivo construir vetores para expressão dos domínios citoplasmáticos das Semaforinas 5A e 5B (Sema\_5A e Sema\_5B) em leveduras, ferramentas que, posteriormente, serão utilizadas para identificar os parceiros moleculares desses domínios através do sistema de duplo-híbrido em leveduras. Essa metodologia é amplamente utilizada para detectar interações protéicas *in vivo* e será de grande importância para o desenvolvimento de projetos futuros e de muitas colaborações. Para as construções, fragmentos de DNA contendo as seqüências codificadoras dos domínios citoplasmáticos de Sema5A e Sema5B (Sema\_5A e Sema\_5B) foram amplificados por PCR, digeridos e inseridos no vetor pGILDA. Estas construções foram transformadas em bactérias DH5 $\alpha$ . As colônias que apresentavam o inserto, observados através de PCR de colônia, seguiram para repique, porém nenhum crescimento posterior foi observado. Dessa forma, verifica-se a necessidade de reconstruir o vetor com os insertos de interesse para o prosseguimento do trabalho. Essas construções constituem ferramentas úteis para a identificação de proteínas ligantes de semaforinas de classe 5 e podem nos trazer pistas valiosas sobre a participação destas proteínas em processos fisiológicos e patológicos, como desenvolvimento e regeneração do sistema nervoso central.

## 1. INTRODUÇÃO

Durante o desenvolvimento do sistema nervoso, o neurônio necessita navegar por um terreno constituído por diversos tipos celulares, processos neuronais e moléculas da matriz extracelular. Tal navegação é observada não só durante o desenvolvimento, mas também em processos regenerativos e patológicos do sistema nervoso, e é mediada por uma infinidade de interações protéicas. A informação que direciona o crescimento do axônio é captada e interpretada por uma estrutura sensorial altamente móvel localizada na extremidade mais distal do axônio, nomeada de cone de crescimento. Moléculas específicas que direcionam o crescimento axonal ligam-se a receptores na superfície do cone de crescimento e ativam vias de sinalização intracelular (WIT & VERHAAGEN, 2003). Um grande número de moléculas sinalizadoras e de seus respectivos receptores, que guiam os axônios para alvos apropriados, tem sido identificado por diferentes sistemas e em vários tipos de organismos (MUELLER, 1999). Estas moléculas, tanto atraentes como repelentes, incluem moléculas mediadoras através de contato, normalmente envolvidas no contato célula-célula, e moléculas secretadas. Muitas delas apresentam bifuncionalidade, ou seja, atuam de forma dual: como quimioatrativas ou quimiorepelentes. Essa diferença de função é dependente de uma variedade de fatores que incluem: o estado intracelular do cone de crescimento, expressão diferencial de complexos receptores e a relação entre as diferentes cascatas de sinalização intracelulares (HUBER *et al.*, 2003).

Dentre as famílias de moléculas sinalizadoras e receptoras que regulam o direcionamento axonal encontram-se os receptores do tipo tirosino-quinase (SCHLESSINGER, 2000) e tirosino-fosfatase; as moléculas de adesão celular pertencentes à família das imunoglobulinas (KAMIGUCHI & LEMMON, 2000); as caderinas (RANSCHT, 2000); as plexinas e neuropilinas, consideradas como receptores prototípicos de semaforinas (SEMA) (TAMAGNONE & COMOGLIO, 2000); as semaforinas (WIT & VERHAAGEN, 2003); as netrinas e os receptores de netrinas (KENNEDY, 2000; PÜSCHEL, 1999b) e a família Robo e os seus receptores (GIGER & KOLODKIN, 2001).

## 1.1 A Família das Semaforinas e seu Envolvimento na Navegação Axonal

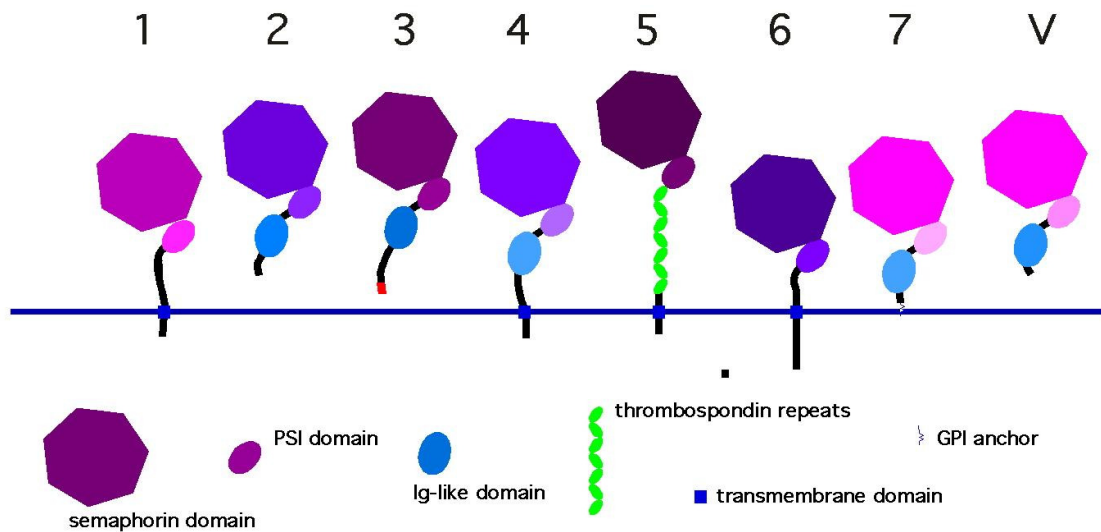
Existem vários mecanismos e moléculas que guiam os axônios na direção de alvos específicos, tanto no desenvolvimento como no processo de maturação e regeneração do sistema nervoso (PATEL & VAN VACTOR, 2002; MUELLER, 1999; TESSIER-LAVIGNE & GOODMAN, 1996). Entre os mecanismos existentes, algumas famílias de proteínas atuam como fatores de direcionamento axonal, provendo informações que permitem o encontro correto entre processos neuronais e alvos específicos do sistema nervoso.

Dentre estas moléculas, as semaforinas (SEMA) pertencem a uma grande família de proteínas secretadas ou associadas à membrana, sendo muitas dessas proteínas envolvidas na navegação axonal, fasciculação, ramificação e formação de sinapses, atuando como inibidores ou quimiorepelentes (KOLODKIN *et al.* 1992; MATTHES *et al.*, 1995). Porém estudos recentes indicam que as semaforinas também podem influenciar a navegação axonal realizando quimioatração (PASTERKAMP *et al.*, 2003).

A família SEMA inclui pelo menos vinte membros diferentes em vertebrados e três em invertebrados. Até o presente momento, as semaforinas foram descritas como moléculas ligantes que atuam sobre determinados receptores como as plexinas, neuropilinas, Off-track, receptor tirosino-quinase Met, CD-72, Tim-2 e integrina. (WIT & VERHAAGEN, 2003). Todas as semaforinas contêm um domínio amino-terminal extracelular de cerca de 500 aminoácidos nomeado domínio semaforina (SEMA) contendo 17 cisteínas altamente conservadas e uma região carboxi-terminal classe-específica que pode conter motivos adicionais.

As semaforinas também diferem com respeito à sua topologia, podendo ser secretadas, transmembrânicas ou ancoradas à superfície celular por glicosilfosfolinositol (GPI) (RAPER; 2000).

Estas características estruturais juntamente com a análise filogenética permitiram a designação de 8 classes, onde todas as semaforinas conhecidas até o momento podem ser agrupadas (SEMAPHORIN NOMENCLATURE COMMITTEE, 1999). Semaforinas classe 1 e classe 2 são encontradas em invertebrados; classes 3 a 7 estão presentes em vertebrados, e uma classe final (classe V) são proteínas codificadas por vírus. (**Fig. 1**)



**Figura 1:** Representação esquemática da família de proteínas Semaforina. As 8 classes estão representadas conforme a topologia e domínios conservados na seqüência protéica. As classes 1 e 2 são encontradas em invertebrados; classes 3 a 7 em vertebrados e classe V engloba semaforinas virais. As semaforinas 1, 4, 5 e 6 são proteínas transmembrânicas, as semas 2, 3 e V são secretadas e a Sema classe 7 pode ser encontrada GPI ancorada ou na forma secretada (adaptado a partir de Semaphorin nomenclature committee, 1999).

Os receptores característicos da Semaforinas são as Plexinas. Nove tipos de plexinas já foram identificados em mamíferos e classificados em quatro classes distintas (classes A-D), sendo que seqüências relacionadas também foram encontradas em *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans* (WINBERG *et al.*, 1998). Plexinas são proteínas transmembrânicas cujo domínio extracelular rico em cisteína compartilha regiões de homologia com receptores para fator de cicatrização. O domínio extracelular das plexinas contém cerca de 500 aminoácidos correspondentes ao domínio semaforina. Deve-se ressaltar que este último apresenta-se relacionado de forma distante ao domínio Sema das Semaforinas. A região citoplasmática contém uma seqüência de aproximadamente 600 aminoácidos, altamente conservada entre as diferentes plexinas, apresentando similaridade de seqüência a proteínas ativadoras de Ras GTPase (GAPs) (SEMAPHORIN NOMENCLATURE COMMITTEE, 1999; ROHM *et al.* 2000b, OSTER *et al.* 2003). Evidências na literatura (ROHM *et al.*, 2000a; ZANATA *et al.*, 2002) apontam que as plexinas podem possuir atividade GAP intrínseca que é essencial para sua habilidade de induzir colapso do cone de crescimento e regular diretamente a atividade de pequenas GTPases, como Rnd1 e RhoD. Semaforinas secretadas (classe 3) não se ligam diretamente a plexinas; estas últimas se associam com neuropilinas, formando um receptor heterodimérico para estas semaforinas (OSTER *et al.*, 2003). Contudo, as plexinas provavelmente são os

receptores comuns protótipos das semaforinas, enquanto que o requerimento de proteínas auxiliares como as neuropilinas podem representar um caso especial para semaforinas classe 3 (RAPER, 2000).

Muitos estudos sobre a sinalização mediada por Semaforinas focaram-se em como a ativação de Plexinas regulam as mudanças que ocorrem no citoesqueleto e provocam um sinal repulsivo (revisado em HALLORAM & WOLMAN, 2006). Uma forma secretada de Semaforina, Semaforina 3A (Sema3A), é sintetizada como um precursor inativo, tornando-se repulsiva para neuritos sensoriais e simpáticos após processamento proteolítico (ADAMS *et al.*, 1997). A exposição de Sema 3A aos cones de crescimento de axônios induz a uma dramática redistribuição dos filamentos de F-actina resultando no seu colapso. Contudo os eventos posteriores na cascata de transdução de sinal que traduz os sinais desencadeados a partir da interação dos fatores quimiossolúveis com seus receptores e que leva às modificações do citoesqueleto, não são completamente conhecidos (CASTELLANI & ROUGON, 2002).

Os mecanismos de sinalização mediados por alguns membros das Semaforinas, principalmente pela Sema3A, já estão bem compreendidos. Contudo, como será visto a seguir, muito pouco se sabe sobre as funções fisiológicas e sinalizações envolvidas realizadas pelas semaforinas de classe 5, que são proteínas integrais de membrana. Destas últimas, a Sema 5B é a menos conhecida. Nesse sentido, o presente trabalho pretende contribuir para o estudo de Sema 5B através da capacitação de estudos para a identificação e caracterização de interações realizadas por essa proteína.

## **1.2 Semaforinas de Classe 5**

A nomenclatura para semaforinas foi revisada em 1999 a fim de se padronizar as diferentes denominações para as proteínas desta família. As semaforinas F e G foram renomeadas para semaforinas 5A e 5B, respectivamente (SEMAPHORIN NOMENCLATURE COMMITTEE, 1999).

As semaforinas 5A e 5B pertencem à classe 5 e foram identificadas em 1996, por ADAMS e colaboradores. Ambas são constituídas de uma região N-terminal extracelular contendo 485 aminoácidos, correspondente ao domínio Sema (esse



Sema5A e 5B são diferencialmente expressas nos tecidos embrionários e adultos. Análise de “Northern blot” de mRNAs isolados de embriões de camundongos revelou a presença de dois transcritos para Sema5A com 5.5 e 9.4 kb e um único mRNA para Sema5B com 5.9 kb, cuja abundância diminui do dia embrionário 10 (E10) ao nascimento (ADAMS et al., 1996) Nos tecidos adultos, além do cérebro, são encontrados três transcritos de Sema5A. Já para Sema5B verificou-se a presença de um único transcrito de 5.9 kb, o qual é expresso exclusivamente no cérebro (ADAMS et al., 1996). Ensaio de hibridização *in situ* em tecidos de camundongos (E9,5) detectaram transcritos de Sema5A em células mesodérmicas, esclerótomos, placa lateral mesodérmica, arcos branquiais, membros em desenvolvimento e na notocorda. Enquanto Sema5B é expressa exclusivamente no neuroepitélio ao longo do eixo antero-posterior, e apresenta uma fraca expressão na região mais caudal do tubo neural (ADAMS et al., 1996).

As semaforinas de classe 5 são caracterizadas pela presença de repetições tipo tromboespondina (TSP), sugerindo a participação dos membros desta classe nos fenômenos de neuritogênese e quimioatração neuronal (ADAMS & TUCKER 2000; ADAMS *et al.*, 1996). Tromboespondinas constituem uma família de glicoproteínas extracelulares ligantes de cálcio. São abundantemente expressas na matriz extracelular embrionária. Várias proteínas compartilham as repetições do tipo tromboespondina -1 (TSP-1), sendo muitas destas expressas no sistema nervoso em desenvolvimento. O padrão de expressão e propriedades *in vitro* sugerem funções potenciais para TSP-1 na navegação axonal e migração do cone de crescimento. As repetições de TSP-1 têm sido implicadas na diferenciação, no crescimento de neuritos, no desenvolvimento do sistema nervoso e em processos de regeneração e adesão neuronal (ADAMS & TUCKER, 2000).

É possível que as repetições TSP estejam implicadas na associação de Sema 5A com outras proteínas. Foi visto que Sema 5A liga-se a plexina 3B e que o domínio TSP é importante para essa interação (ARTIGIANI *et al.*, 2004). Nesse mesmo trabalho, os autores usaram Sema 5B como controle e não identificaram ligação desta com as plexinas 3A, 3B ou 3C. A proteína Sema 5B também possui o domínio TSP (ADAMS & TUCKER 2000; ADAMS *et al.*, 1996), porém não está claro se esta molécula está envolvida com neuritogênese, desde que resultados preliminares utilizando Sema 5B recombinante mostraram uma ausência de modulação positiva ou negativa da neuritogênese (PÜSCHEL, 1999a).

KANTOR *et al* (2004) foram capazes de mostrar que Sema5A pode desencadear respostas tanto atrativas quanto repulsivas no direcionamento de axônios do fasciculus retroflexus (FR), um feixe de nervos do diencefalo associado a funções do sistema límbico. Nesse mesmo trabalho, os autores verificaram que domínio de repetições TSP da Sema5A interage fisicamente com a porção glicosaminoglicana de dois tipos de proteoglicanos: os condroitin sulfato (CSPGs) e os heparan sulfato (HSPGs). A ligação da Sema5A com CSPG inibe a extensão de axônios FR, enquanto que a interação dessa semaforina com HSPG é necessária para atração axonal. Portanto, a natureza da resposta do cone de crescimento à Sema5A é dependente do domínio TSP e modulado de acordo com o tipo de proteoglicano presente no ambiente, durante o desenvolvimento (KANTOR *et al.*, 2004).

Ainda quanto à Sema5A, resultados evidenciaram que essa proteína age de forma inibitória nos axônios do disco óptico e do nervo óptico, mesmo na presença de moléculas atrativas e neuritogênicas, como laminina, L1 e netrina (OSTER *et al.*, 2003). Nesse mesmo trabalho, os autores não foram capazes de identificar Sema 5B nesses locais do sistema visual.

Mais recentemente, FIORE *et al.*, (2005) desenvolveram uma linhagem de animais nocautes para semaforina 5A e mostraram que esses camundongos são inviáveis, já que os embriões que não possuem o gene para Sema5A não sobrevivem após o dia do desenvolvimento embrionário 12.5 (E12.5). A análise dos embriões nocautes revelou que a estrutura geral do sistema vascular, o desenvolvimento dos tecidos extra-embrionários, e o sistema nervoso apresentam-se normais. Contudo observou-se a diminuição no número de vasos de grande diâmetro na região cranial de embriões E10.5. Esses vasos não formam as ramificações adicionais e não estabelecem a sua organização e estruturação normal. Este fenótipo implica que Sema5A não está envolvida na diferenciação de vasos sanguíneos em geral, mas atua na padronização regional da vasculatura. Especificamente as ramificações dos vasos cardinais craniais possuem anormalidades e provavelmente Sema5A está envolvida na estabilização destes vasos sanguíneos (FIORE *et al.*, 2005).

É importante destacar que a classe 5 das semaforinas é a única que possui representantes tanto em vertebrados (Sema 5A e Sema 5B), como em invertebrados. Nesses últimos, Sema-5c, por exemplo, foi identificada em *Drosophila* e

parece estar envolvida no comportamento olfativo desses insetos (ROLLMANN *et al.*, 2007). WOODHOUSE e colaboradores (2003) demonstraram, usando *Drosophila* como modelo, que Sema-5c está envolvida no processo de tumorigênese e metástase. Resultados deste mesmo trabalho detectaram a expressão de semaforinas humanas, Sema 5A e Sema 5D, homólogas à Sema-5c, na membrana de células A2058, uma linhagem de melanoma humano.

De fato, as semaforinas transmembrânicas, como as da classe 5, apresentam um aspecto interessante: elas podem funcionar como ligantes e deflagrar um sinal através da ligação de seu domínio extracelular a um receptor de superfície e, ao mesmo tempo, podem agir como receptores e passar um sinal para o interior da célula através de sua cauda citoplasmática, após interação com ligantes específicos (TAMAGNONE & COMOGLIO, 2004).

Um único artigo, bem recente, demonstrou pela primeira vez o papel de Sema5B como uma semaforina inibitória (KENNETH *et al.*, 2007). Nesse trabalho, os autores foram capazes de mostrar que Sema5B induz o colapso do cone de crescimento em gânglios da raiz dorsal de galinha (DRG) através do influxo de  $Ca^{+2}$  extracelular. Os resultados indicam que essa resposta é dependente das cascatas de sinalização da fosfatase calcineurina e da protease capaína. Assim, esses resultados evidenciam um provável papel de Sema5B como ligante.

De acordo com o que foi mencionado acima, fica claro que há ainda pouco conhecimento a respeito das semaforinas de classe 5, sobretudo quanto à Sema 5B. Como foi visto, os artigos que foram publicados sobre as semaforinas de classe 5 elucidaram alguns aspectos importantes de Sema 5A, mas com relação a Sema 5B poucos resultados foram obtidos.

Atualmente, com os genomas de vários organismos já decifrados e disponíveis em bancos de dados públicos, o foco principal de estudo passou a ser o Proteoma. Dentro deste cenário, a elucidação de redes de interações entre proteínas (Interactomas) vem sendo empregada para a obtenção de pistas valiosas sobre os papéis funcionais das moléculas em diferentes contextos biológicos.

Nesse sentido, o projeto em questão pretende identificar, através do sistema de duplo-híbrido em leveduras, os parceiros moleculares de Sema\_5A e Sema\_5B. A procura por ligantes protéicos destas moléculas poderá levar a um entendimento orquestrado das suas funções em diversos contextos biológicos. Além de poder trazer resultados inéditos e de alto impacto na área de desenvolvimento e

regeneração do sistema nervoso. A implementação do sistema de duplo-híbrido no laboratório em questão, será de extrema importância para não só a identificação e caracterização de ligantes de Sema\_5A e \_5B como também uma metodologia de vanguarda biotecnológica a ser aplicada por diversos parceiros produzindo conhecimento.

### 1.3 Sistema Duplo - híbrido em Levedura

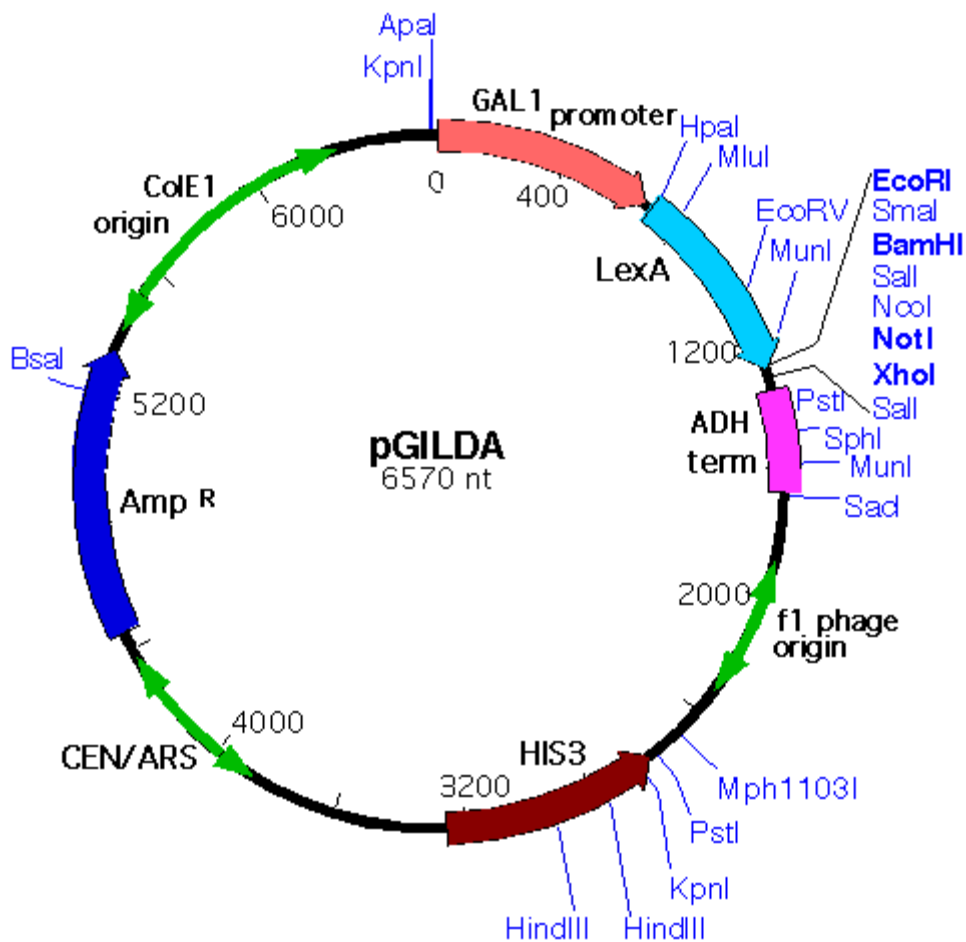
O sistema de duplo-híbrido em leveduras é uma ferramenta que foi desenvolvida na última década e hoje em dia é uma tecnologia bastante usada para detectar interações protéicas *in vivo*.

A técnica baseia-se na separação artificial de domínios de reguladores de transcrição procariontes, que naturalmente são íntegros. Esses reguladores contêm um domínio de ligação para DNA na região promotora e um domínio de ativação, que direciona o complexo da RNA polimerase II a transcrever o gene em questão. Normalmente, esses dois domínios fazem parte de uma mesma proteína. Através da tecnologia do DNA recombinante é possível separar fisicamente esses dois domínios peptídicos, que, se expressos em uma mesma célula, não poderão ativar a transcrição, a menos que sejam aproximados fisicamente na região do promotor (BRENT E PTASHNE, 1985).

O sistema duplo-híbrido "DupLex-A<sup>TM</sup>" (OriGene Technologies, Inc.), que está sendo utilizado nesse trabalho, fornece alguns vetores que permitem a clonagem de genes que codificam para proteínas capazes de interagir entre si e a co-expressão destas nas células de levedura em fusão com os domínios de ligação ao DNA (DNA-BD) e de ativação da transcrição (AD) separadamente. Nesse sistema, o DNA-BD vem como parte da proteína LexA de procariontes e o AD é o peptídeo de 88 resíduos (B42) que ativa a transcrição em levedura. A interação entre uma proteína isca (que é expressa em fusão com o DNA-BD) e uma outra proteína codificada por um gene presente em uma biblioteca de cDNA (expressa em fusão com o AD) cria um novo ativador transcricional capaz de ativar genes-repórteres regulados por operadores LexA (**Fig. 4**). O produto gerado pela expressão destes genes-repórteres torna possível que a interação entre duas proteínas seja detectada fenotipicamente (AUSUBEL *et al.*, 1999).

O “kit” "DupLex-A™" disponibiliza os seguintes vetores:

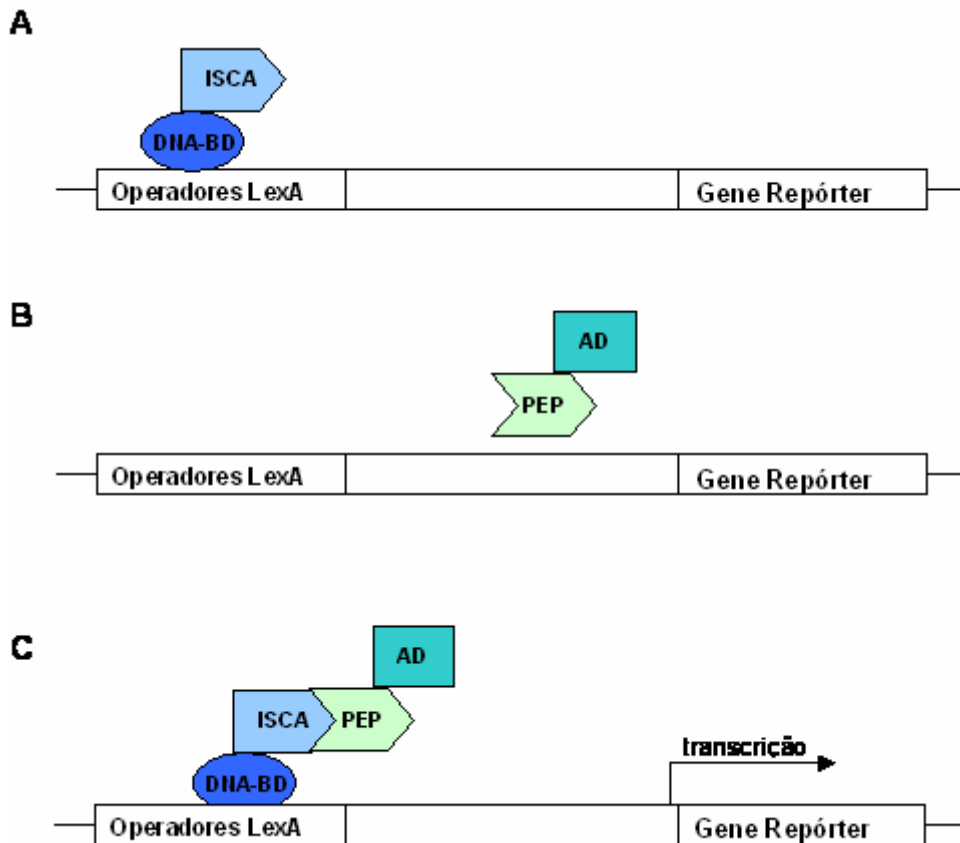
- pGilda (OriGene) (**Fig. 3**): Vetor onde foram inseridos os fragmentos de DNA que codificam para domínios específicos de Sema\_5B e Sema\_5A fusionados com o domínio DNA-BD (proteína LexA). Essas construções são usadas como "iscas". A grande vantagem desse plasmídeo é que ele possui o promotor GAL1 induzível por galactose, o que permite a expressão da isca por tempos limitados durante a varredura da biblioteca, reduzindo a exposição das leveduras às iscas tóxicas;



**Figura 3: Desenho do plasmídeo pGILDA** mostrando a região promotora GAL1 para expressão regulada por galactose; Região CEN/ARS para replicação em leveduras com manutenção de uma cópia por célula; Região LexA-MCS com múltiplos sítios de restrição para inserção de fragmentos da proteína de interesse a serem transcritas em fusão com a proteína LexA; Marcador HIS3 para seleção em leveduras; Gene Amp<sup>r</sup> que confere resistência ao antibiótico Ampicilina; ori E1 para replicação em *E. coli*.

- pJG4-5 (OriGene): esse vetor é usado para a construção da biblioteca de cDNA de cérebro murino. Esse plasmídeo possui, logo após a sequência codificadora do domínio de ativação (o peptídeo B42), o sítio múltiplo de clonagem, onde é inserido a biblioteca de cDNA do tecido em questão. Esse vetor também possui o promotor GAL1, induzível por galactose.

- Plasmídeos contendo genes repórteres: Estes vetores possuem regiões de ligação para DNA-BD e AD. Quando ambos os ligantes se encontrarem próximos, a enzima  $\beta$ -galactosidase é expressa (neste sistema, a proximidade necessária destes domínios só é obtida quando a isca produzida pelo pGilda interage com a proteína expressa pelo pJG4-5) modificando a cor da colônia cultivada com x-gal reportando uma interação.



**Figura 4: Diagrama esquemático do sistema de duplo-híbrido em leveduras.**

**A)** A proteína usada como isca em fusão com o domínio de ligação ao DNA (DNA-BD), liga-se aos operadores LexA, mas não é capaz de ativar a transcrição sem o domínio de ativação (AD).

**B)** Na ausência da proteína, o peptídeo (PEP) proveniente de uma biblioteca, em fusão com AD não se liga aos operadores e, portanto, não ativa a transcrição.

**C)** A transcrição dos genes repórteres é ativada somente se houver interação entre isca e o peptídeo da biblioteca, pois assim os domínios DNA-BD e AD serão aproximados.

## 1.4 Resultados Anteriores

Durante seu mestrado, a aluna Jaqueline A. M. Trentin, sob a orientação da Profa. Dra. Adriana Frohlich Mercadante, iniciou no laboratório a produção de ferramentas para o estudo da Semaforina 5B. Assim, o domínio citoplasmático desta proteína ( $_6$ His-CITO) foi clonado e expresso de forma heteróloga em bactérias e

purificado. Este domínio recombinante ligado à Ni-NTA-Agarose foi então usado em ensaios de “pull-down” (ensaios de ligação *in vitro*) e ligantes provenientes de extratos de cérebros de camundongos puderam ser identificados, após separação em eletroforese bidimensional e análise em espectrometria de massa por PMF (“Peptide Mass Fingerprint”). Os ligantes obtidos mais interessantes e que apresentaram um significado biológico foram tubulina e a actina. Especula-se que Sema5B se ligue a essas proteínas através do seu domínio citoplasmático e altere o citoesqueleto da célula onde ela se encontra. Como já mencionado, o fato de Sema5B ser uma proteína integral de membrana sugere que ela pode funcionar tanto como um ligante (através de ligação de seu domínio extracelular com um receptor), como um receptor (através da sinalização intracelular mediada por seu domínio citoplasmático). Nesse sentido, os resultados obtidos indicam um possível papel para Sema5B como receptor, o qual poderá ser melhor investigado. Recentemente, o sinal de Sema5B como ligante foi abordado. Kenneth e colaboradores (2007) mostraram que o domínio Sema de Sema5B (região extracelular) induz o colapso do cone de crescimento através da indução de um influxo de  $Ca^{+2}$ , causando um aumento deste cátion no interior da célula. Os sinais posteriores que são deflagrados envolvem a atividade de calpaína e calcineurina, que em conjunto modulam o citoesqueleto promovendo o colapso do cone de crescimento.

Dessa forma, através de ensaios de “pull-down” e identificação dos ligantes por espectrometria de massa, alguns parceiros moleculares de Sema5B, que se ligam ao seu domínio citoplasmático (intracelular), puderam ser encontrados. Para complementar esses resultados, o presente projeto pretendeu iniciar a montagem do sistema de duplo-híbrido em leveduras para identificar e/ou confirmar interações com o domínio citoplasmático de Sema5B. Além disso, o domínio citoplasmático de Sema5A também será usado nesse mesmo sistema para comparar as interações obtidas entre essas duas semaforinas. Deve-se lembrar que a identidade das seqüências de aminoácidos de Sema 5A e 5B é de 58%, enquanto que a similaridade entre elas é de 72%. E o domínio citoplasmático é o que apresenta o menor grau de similaridade entre Sema5A e 5B em comparação a outras regiões destas proteínas (ADAMS et al, 1996).

## **2. OBJETIVOS**

### **Objetivo geral**

Construção de vetores para produção de iscas correspondentes aos domínios citoplasmáticos da Sema5A e Sema5B (Sema\_5A e Sema\_5B). Deve-se ressaltar que o presente trabalho faz parte do início da implementação do sistema de duplo-híbrido em leveduras no Departamento de Patologia Básica – UFPR.

### **Objetivos específicos**

- a) Desenho dos iniciadores para amplificação por PCR das porções citoplasmáticas das semaforinas 5A e 5B (insertos);
- b) Amplificação e digestão dos insertos para construção dos vetores;
- c) Replicação e digestão do vetor (plasmídeo) pGilda;
- d) Ligação dos insertos no pGilda para expressão dos domínios citoplasmáticos de Sema5A e Sema5B;
- e) Verificação das construções;
- f) Implementação do Duplo-híbrido no Laboratório de Neurobiologia.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Desenho de Iniciadores

Os iniciadores foram desenhados a partir do reconhecimento das sequências utilizando-se a base de dados on-line da NCBI (National Center for Biothechnologies Information), onde as sequências nucleotídicas complementares (cDNA) das proteínas Sema5A e Sema5B foram obtidas. Ambas foram submetidas ao aplicativo on-line ORF Finder no mesmo sitio da NCBI, paralelamente, as sequências aminoacídicas das proteínas foram obtidas a partir da base de dados on-line Swiss-Prot a partir do sitio eletrônico da ExPASy (Expert Protein Analisis System).

Enquanto a informação fornecida pelo Orf-Finder relaciona a sequência complementar com a aminoacídica, a informação fornecida pela base de dados Swiss-Prot apresenta separadamente cada região funcional da proteína pesquisada, fornecendo a identificação dos domínios e sequência de aminoácidos separadamente. A partir da combinação das informações, é possível delimitar a região codificante de cada domínio da proteína no seu respectivo cDNA (DNA complementar).

Cada iniciador foi desenhado manualmente, flanqueando as regiões codificantes de interesse, e inclui uma região complementar de alguns pares de base e uma região não complementar ao cDNA com sítios de restrição para as enzimas *Bam*HI, *Eco*RI e *Xho*I. Os sítios de restrição são usados para a digestão dos insertos para a sua futura inserção em sítio dirigido nos plasmídeos.

A ferramenta Oligo Analyzer no sitio eletrônico da IDT (Integrated DNA Technologies) foi utilizada para determinar características como  $T_m$ ,  $\Delta T_m$  (diferença entre as  $T_m$ 's dos iniciadores *F* e *R*) e *hairpins*, entre outras.

#### Iniciadores:

- Sema-Cito\_5A\_pG\_F

5' CGG AAT TCT ACA CCT ACT GCC AGA GGT AC 3'

Iniciador *Forward* para a porção citoplasmática da Sema5A, possui um sítio de restrição para a enzima de corte *Eco*RI na região 5' (sublinhado) usado para a digestão do inserto. 29 mer;  $T_m$ : 61,2°C; CG= 51,7%.

- Sema-Cito\_5A\_pG\_R

5' CGG GAT CCC TAG TAT TCA TCA TAA TTG TTG AG 3'

Iniciador *Reverse* para a porção citoplasmática da Sema5A, possui um sítio de restrição para a enzima de corte *Bam*HI na região 5' (sublinhado) usado para a digestão do inserto. 32 mer; Tm: 58,2°C; CG= 40,6%.

- Sema-Cito\_5B\_pG\_F

5' CGG GAT CCA ATC TTG CCA GCA CTG CCA G 3'

Iniciador *Forward* para a porção citoplasmática da Sema5B, possui um sítio de restrição para a enzima de corte *Bam*HI na região 5' (sublinhado) usado para a digestão do inserto. 28 bp. Neste iniciador foram colocadas 2 pares de base a mais (em cinza) depois da sequência de reconhecimento da enzima de restrição para manutenção da fase aberta de leitura do domínio de interesse com o domínio LexA (presente no pGilda) após a inserção do fragmento no plasmídeo.

28 mer; Tm: 66,5°C; CG= 60,7%.

- Sema-Cito\_5B\_pG\_R

5' CCG CTC GAG TCA GCT GTT GGG GAA ACA GC 3'

Iniciador *Reverse* para a porção citoplasmática da Sema5B, possui um sítio de restrição para a enzima de corte *Xho*I na região 5' (sublinhado) usado para a digestão do inserto.

29 mer; Tm: 67,5°C; CG= 62%.

### 3.2 Reação de Transcriptase Reversa

Em um tubo para PCR foi adicionado 1µl do iniciador Oligo dT (0,5 µg/µl) e RNA cerebral (1 µg/µl), proveniente do estoque do laboratório armazenado à -80°C e água tratada com DEPC (dimetil pirocarbonato) para um volume final de 5µl; a mistura foi incubada a 70°C por 5 min. para desnaturação do RNA, em seguida foi colocada no gelo por 5 min. Paralelamente, uma segunda mistura foi preparada, composta por tampão ótimo para a enzima, 2,4µl de MgCl<sub>2</sub> (3 mM), 1µl dNTPs (0,5 mM: Promega<sup>®</sup>) e inibidor de RNase (2U/µl - *RNaseOUT*: Invitrogen<sup>®</sup>) e água tratada

com DEPC para um volume final de. 15 µl. À primeira mistura foram incorporadas a segunda mistura e a enzima transcriptase reversa *Improm II Reverse transcriptase*. A solução final foi incubada em um termociclador por: 25°C/ 5min., 42°C/ 60min., 70°C/ 5min. O cDNA resultante foi acondicionado em um freezer a -20°C até seu uso futuro para obtenção de insertos.

### 3.3 Obtenção dos Insertos por PCR

Foi realizada uma PCR piloto para testar as condições da PCR e dos iniciadores encomendados, após o teste foram realizadas PCRs em larga escala para ambos os insertos.

As reações foram realizadas com: Enzima e tampão da Pfu Polimerase da marca Fermentas<sup>®</sup> (2,5 U/µl), dNTPs (0,5 mM Promega<sup>®</sup>), iniciadores encomendados da IDT<sup>®</sup> a partir do desenho desenvolvido, termociclador da sala multi usuários da FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos) modelo Mastercycler<sup>®</sup> da Eppendorf<sup>®</sup>, tubos de polipropileno de 200 µl. Como moldes, foram utilizados o cDNA de cérebro de camundongos e o plasmídeo pET 28a portador da sequência para Sema5B porção citoplasmática já seqüenciado, disponível no laboratório. Após a corrida em gel de agarose 1,5% contendo brometo de etídio (5µg/mL) juntamente com 0,5µg do marcador de pares de base O'GeneRuller 50bp da Fermentas<sup>®</sup>, as bandas foram extraídas e purificadas segundo o kit de gel extração Perfectprep Gel Cleanup da Eppendorf<sup>®</sup>.

#### 3.3.1 Inseto Sema5A domínio citoplasmático

Foi utilizado para cada reação: 2,5µl de tampão para Pfu -MgSO<sub>4</sub>; 3µl de MgSO<sub>4</sub> (1mM); 0,3µl da enzima Pfu Polimerase (2,5 U/µl); 1,5µl de dNTP (0,6 mM); 1,25µl de iniciador F para sema5A (0,3 mM); 1,25µl de iniciador R (0,3 mM); 2 µl de cDNA de cérebro de camundongo (~1 µg DNA); H<sub>2</sub>O para um volume final de 25µl. Utilizando-se o termociclador, as reações foram submetidas inicialmente à 95°C por 2 min, então a 35 ciclos a 95°C/40s, 53,2°C/ 45s e 72°C/ 2:30 min, finalmente a reação foi finalizada a 72°C/ 5min. Após a reação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo brometo de etídio. Ao final da corrida, as bandas foram extraídas do gel e

purificadas com o kit de gel extração, de acordo com as recomendações do fabricante. Foram feitas 5 reações de 25µl cada e um tubo de controle negativo (reação na qual foram adicionados todos os reagentes, exceto o DNA molde).

### **3.3.2 Inseto Sema5B domínio citoplasmático**

Foi realizada em condições similares às usadas na reação acima. O molde de DNA para a reação foi 1µl do plasmídeo pET 28a (~1µg/ µl) e a temperatura de anelamento usada foi 61,5°C. Da mesma forma, foram realizadas 5 reações de 25µl cada e um controle negativo (reação na qual foram adicionados todos os reagentes, exceto o DNA molde).

## **3.4 Replicação do pGILDA**

Uma alíquota do plasmídeo pGILDA foi gentilmente doada pela Profa. Dra. Bettina Malnic (IQ-USP). Linhagens DH5α eletrocompetentes de *Escherichia coli* foram utilizadas para replicação em larga escala do plasmídeo para seu uso futuro pelo laboratório. Para isto, 40 µl da bactéria foram transformados por eletroporação (Eletroporador modelo Gene Pulser X Cell – BioRad®) com 10 ng do plasmídeo submetendo-se a uma diferença de potencial de 1,40 kV; após a recuperação por 1 hora em 1ml de meio LB (10g/l de triptona; 5g/l de extrato de levedura; 10 g/l de NaCl), no agitador orbital (Certomat BS-1 P. Braun®) a 37°C foram estricadas em placas de LB + agar com 17g/l de agar (LA) adicionado de ampicilina a 100 µg/ml, a placa foi incubada a 37°C durante a noite. Após esse período, uma colônia foi inoculada em 5ml de meio acrescido do antibiótico durante 8 horas no shaker a 37°C e então foi transferida para um Erlenmeyer de 2l contendo 500ml de LB + Amp e colocada no shaker a 37°C por até 16 horas. Após esse período o plasmídeo foi purificado utilizando-se o kit Quiagen® Plasmid Maxi. O plasmídeo purificado foi quantificado por espectrofotometria segundo SAMBROOK e RUSSEL (2001).

## 3.5 Digestões

### 3.5.1 Digestão dos Insertos

Os domínios citoplasmáticos purificados dos géis foram então duplamente digeridos. Para o domínio 5A foi utilizado as enzimas *Bam*HI e *Eco*RI e para a 5B, *Bam*HI e *Xho*I da marca Fermentas<sup>®</sup>. Para cada reação foram usados 50µl dos fragmentos de PCR; 1,5 µl de cada enzima (15 unidades); tampão (14 µl Tango 2x para 5A e 7 µl Bam 1x para 5B, concentrações ótimas para dupla digestão de acordo com o fabricante Fermentas<sup>®</sup>) e água para um volume final de 70 µl. A reação foi mantida a 37° durante a noite. Após a digestão as amostras foram submetidas a uma eletroforese em gel de agarose a 1% juntamente com 0,5µg do marcador de pares de base O'GeneRuller 50bp da Fermentas<sup>®</sup>, seguindo para gel extração. As amostras foram armazenadas no freezer a -20°C até o uso.

### 3.5.2 Digestão dos Plasmídeos

As digestões duplas dos plasmídeos foram feitas em duas etapas devido à proximidade dos sítios de restrição presentes na região policlonal do pGilda. Na primeira reação foi usado: 5 µl do plasmídeo vazio (~ 8µg); tampão (10 µl Tango 2x para 5A e 5 µl Bam 1x para 5B); 2 µl da enzima *Bam*HI (20 unidades) em ambos e água para volume final de 50 µl. Após 16 horas a 37°C, a amostra foi submetida à 80°C por 20 min para desativar a enzima, então foram adicionados 2 µl de *Eco*RI (20 unidades) para 5A (pGilda\_5A) e 2 µl de *Xho*I (20 unidades) para 5B (pGilda\_5B). As temperaturas e tempo de incubação se repetiram e após as digestões as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 1% juntamente com 0,5µg do marcador de pares de base Lambda DNA/HindIII Marker 2 da Fermentas<sup>®</sup> seguindo para gel extração. As amostras foram armazenadas no freezer a -20°C até o uso.

### 3.6 Ligação

Para a ligação, é necessário haver uma relação entre 1:3 a 1:5 entre a quantidade de moléculas de plasmídeos e de insertos, partindo-se de 50ng de plasmídeo. Duzentas unidades da enzima T<sub>4</sub> DNA ligase (New England BioLabs<sup>®</sup>) foram utilizadas para a reação de ligação (volume final de 10µl), a qual ocorreu durante 16 horas, a 16°C e por 15 min a 65°C (para desativação da enzima) ao termociclador.

Para determinar esta concentração, amostras de plasmídeos e de insertos digeridos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% contendo 5µg/mL de brometo de etídio, usando-se indicadores de pesos moleculares com concentrações conhecidas, então as intensidades de banda foram comparadas obtendo-se valores relativos de ng/µl de cada amostra, conhecendo-se o volume aplicado e a diferença entre o tamanho do vetor e dos insertos, é possível determinar o volume de cada solução que obedeça os parâmetros para a reação de ligação.

O volume final da reação de ligação é 10µl, as soluções contendo os vetores foram concentradas em SpeedVac por 40min a 30°C. Foram realizadas 4 ligações distintas:

**1 e 2) Vetor – inserto:** 5µl do vetor digerido concentrado (pG\_5A 10,14 ng/µl ou pG\_5B 10,8 ng/µl); 3,5µl do inserto (Sema\_5A 15ng/µl ou Sema\_5B 10ng/µl) digerido; 1µl Tampão contendo 10mM de ATP e 0,5µl da enzima T4 ligase (New England BioLabs<sup>®</sup>).

**3 e 4) Vetor – Vetor:** 5µl do vetor digerido (pG\_5A 3,38 ng/µl ou pG\_5B 6,76 ng/µl); 3,5µl água; 1µl de tampão para ligase e 0,5µl da T4 Ligase.

Todas as reações de ligação foram submetidas à 16°C por 16 horas e por 15 min a 65°C para desativar a enzima.

Após a reação as amostras foram precipitadas: 1µl da reação foi armazenado, aos 9µl restantes foram adicionados 11µl de água deionizada autoclavada e 2µl de acetato de sódio 3M pH 6,0 e homogeneizado por turbilhonamento ao vortex. Em seguida, foram adicionados 60µl de etanol absoluto., homogeneizado por inversão e transferido para um tubo de 1,5 ml. A solução foi precipitada por 3 dias ao freezer - 20°C. Então, os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm (~20.200 Gs) por 30min a

4°C, o sobrenadante foi coletado e guardado por segurança. Ao tubo original, foram adicionados 600µl de etanol 70% gelado e centrifugado a 13.000 rpm (~20.200 Gs) a 4°C por 20 min. Logo em seguida o sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o DNA precipitado foi seco em uma estufa a 37°C e após a evaporação o precipitado foi ressuspenso em 5µl de água deionizada autoclavada.

Foi também utilizado o método de diálise por membrana para dessalinizar a solução: foi utilizada uma membrana de nitrocelulose (45µm) para cada construção, foram feitas marca de identificação em cada membrana. Em um Becker adicionou-se cerca de 150ml de água destilada deionizada, na superfície da água posicionou-se as membranas com a face brilhosa para cima, no centro de cada membrana adicionou-se 8µl do produto de ligação de acordo com as marcações, os 2µl restantes são guardados por medida de segurança. Após 30min, as gotículas sobre as membranas são retiradas com o auxílio de uma micropipeta, aproximadamente 5,5µl de cada reação foram recuperados.

### **3.7 Replicação dos Vetores em Bactérias**

Após a ligação, os plasmídeos contendo os insertos foram eletroporados em linhagens de bactérias eletrocompetentes DH5α., 1 µl do vetor em ~40 µl de bactérias congeladas. Após a recuperação no shaker por 1 hora a 37°C em LB, foram plaqueadas em meio sólido contendo ampicilina (100 µg/ml); inicialmente 100 µl foram esgotados com o auxílio da alça de Drigalsky, então o restante foi transferido para um Eppendorf® de 1,5 ml e centrifugado a 3.500 rpm por 2 min em uma centrífuga mini-spin da Eppendorf®. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso, aproximadamente 100 µl foram esgotados em outra placa. As placas ficaram por não mais que 16 horas em estufa a 37°C, após este período, algumas colônias foram escolhidas para verificação da presença dos insertos. Cada colônia foi inoculada em 1ml de LB + Amp e usadas como molde para a reação de PCR.

### 3.8 PCR de Colônia

Para confirmar a presença do inserto, várias das colônias obtidas foram, cada uma delas, inoculadas em 50 $\mu$ l de caldo LB com ampicilina e 1 $\mu$ l destas suspensões de células foi utilizado como molde em uma reação de PCR (volume final de 10  $\mu$ l) com iniciadores específicos para o fragmento codificador do domínio citoplasmático de Semaforina 5B. Foi usado para controle positivo, para Sema\_5A cDNA e para Sema\_5B, além do cDNA, o plasmídeo pET 28a-CITO como DNA moldes para a reação. Para controle negativo, colônias transformadas apenas com o pGILDA duplamente digerido e religado foi usado como molde.

Para cada reação foi usado: 1 $\mu$ l de tampão; 0,3 $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub>; 0,4 $\mu$ l de dNTP; 0,4 $\mu$ l de cada iniciador específico; 0,1 $\mu$ l da enzima Taq polimerase; 1 $\mu$ l de LB com cada colônia. As condições de reação foram as mesmas usadas anteriormente.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Desenho de Iniciadores

Os iniciadores foram desenhados de acordo com a sequência de DNA complementar de cada proteína encontrado na base de dados da NCBI:

Sema5A: ACCESSION [NM\\_009154](#) REGION: 659..3883  
VERSION NM\_009154.2 GI:119226252 (*Mus musculus*)

Sema 5B: ACCESSION [NM\\_013661](#) REGION: 292..3573  
VERSION NM\_013661.2 GI:164698461 (*Mus musculus*)

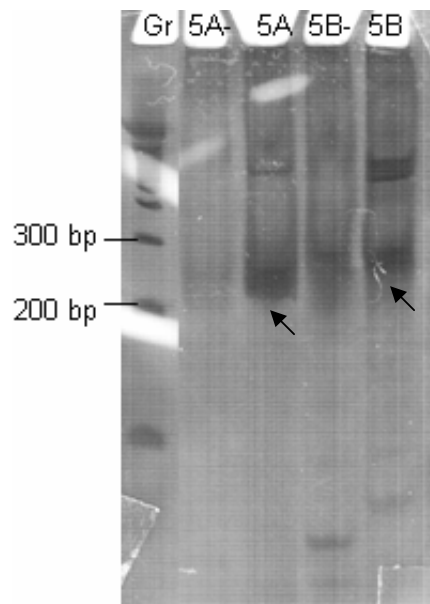
Durante o desenho dos iniciadores, foi levada em consideração a necessidade de colocação de sequências reconhecidas por enzimas de corte (sítios de restrição) diferentes para cada iniciador *forward* (F) e *reverse* (R) para que houvesse uma inserção direcionada no plasmídeo. Tanto o plasmídeo como as sequências codificadoras de ambos os domínios foram analisadas quanto a ocorrência dos sítios de restrição e após a consulta ao mapa do plasmídeo e verificação dos sítios existentes nos insertos através da ferramenta eletrônica NebCutter, foram escolhidas as enzimas *EcoRI* e *BamHI* para os iniciadores Sema-Cito\_5A\_pG\_F e R e *BamHI* e *XhoI* para Sema-Cito\_5B\_pG\_F e R.

Felizmente, foi possível desenhar os iniciadores tanto F quanto R para ambos os insertos abrangendo as extremidades das sequências. Ou seja, a porção citoplasmática está totalmente flanqueada pelos iniciadores, foram feitos ajustes mudando o número de pares de base de cada iniciador, para manter o  $\Delta T_m$  próximo a 0 e a quantidade adequada de C e G (50%).

Para o desenho dos iniciadores também foi levada em conta à manutenção da fase aberta de leitura dos insertos, já que eles são clonados após uma sequência do vetor pGILDA que codifica para o domínio de ligação ao DNA, LexA. Assim, quando essa construção for expressa na levedura, durante o ensaio de duplo-híbrido, ela irá produzir os domínios de interesse em fusão com o LexA na região N-terminal.

## 4.2 Obtenção de Insertos

Assim que os iniciadores encomendados chegaram, foi realizada uma PCR piloto para determinar as condições de reação a serem usadas. Elas foram estabelecidas de acordo com os protocolos já usados com sucesso no laboratório, modificando-se apenas a temperatura de anelamento de acordo com a particularidade de cada par de iniciadores. Após a reação, os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida juntamente com o marcador de pares de base O'GeneRuller 100bp da Fermentas<sup>®</sup>. Os géis a 8% foram feitos utilizando-se uma solução de acrilamida e bis-acrilamida na proporção 29:1, TEMED a 0,1% e persulfato de amônio 0,1%. A eletroforese foi conduzida em aparato de gel médio a 100V por 1 hora. A revelação foi feita pela impregnação por nitrato de prata de acordo com SAMBROOK e RUSSEL (2001). As bandas nas alturas esperadas foram identificadas: Sema\_5A: 257 pares de base; Sema\_5B: 293 pares de base. Os negativos foram obtidos omitindo os moldes de DNA dos tubos de reação para PCR.

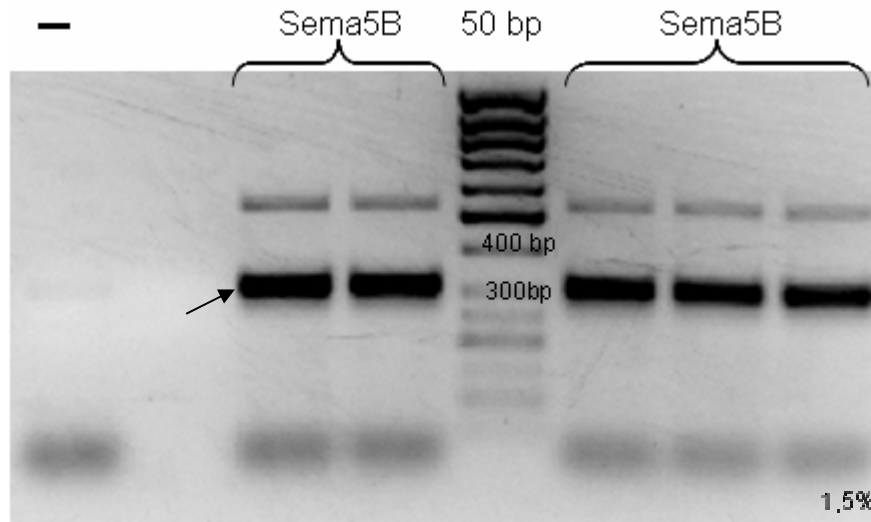


**Figura 5: PCR piloto para estabelecer condições de corrida utilizando-se os novos iniciadores.**

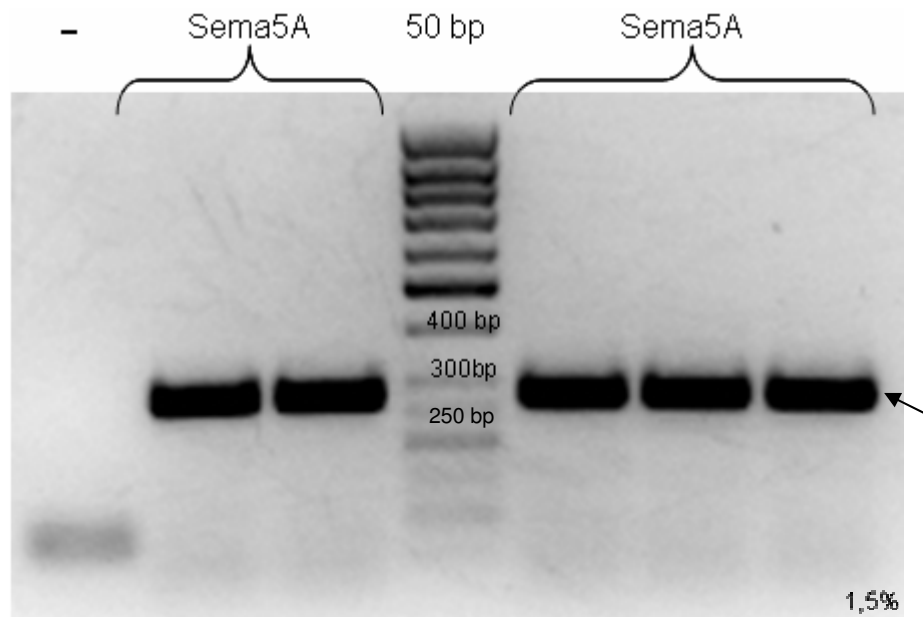
Lanes: **GR**: Gene Ruller 50 bp; **5A-**: Controle negativo para 5A, reação sem DNA; **5A**: Reação com os iniciadores para Sema\_5A e cDNA; **5B-**: Controle negativo para 5B, reação sem DNA; **5B**: Reação com os iniciadores para Sema\_5B e o plasmídeo pET28a-CITO. Setas indicam as bandas esperadas.

Com a verificação do sucesso da PCR piloto em obter produtos de reação na altura de banda esperada (**Fig. 5**), seguiu-se para as PCRs de larga escala

utilizando o protocolo estabelecido para a obtenção de grandes quantidades de insertos, necessárias para as construções desejadas (Figs. 6 e 7).



**Figura 6: PCR em larga escala para produção de insertos para Sema\_5B contendo sítios de restrição para *Bam*HI e *Xho*I.** Lanes: -: Controle negativo; **Sema5B**: Fragmentos da PCR de larga escala para obtenção de insertos de Sema\_5B a serem gel-extraídos; **50 bp**: Marcador de massa de 50bp. Seta indica as bandas extraídas.



**Figura 7: PCR em larga escala para produção de insertos para Sema\_5A contendo sítios de restrição para *Bam*HI e *Eco*RI.** Lanes: -: Controle negativo; **Sema5A**: Fragmentos da PCR de larga escala para obtenção de insertos de Sema\_5A a serem gel extraídos; **50 bp**: Marcador de massa de 50bp. Seta indica as bandas extraídas.

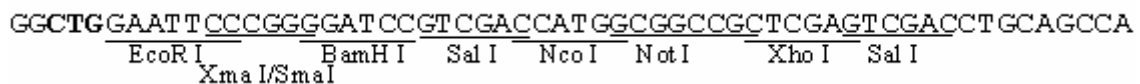
Na figura 6 observa-se a presença de uma banda extra, de aproximadamente 550 pares de base, de origem desconhecida, tal fragmento foi excluído da Gel-extração.

As bandas de interesse foram extraídas do gel e purificadas com o kit PerfectPrep Gel CleanUp da Eppendorf® obtendo-se um volume final de 60µl para cada inserto.

### 4.3 Digestões

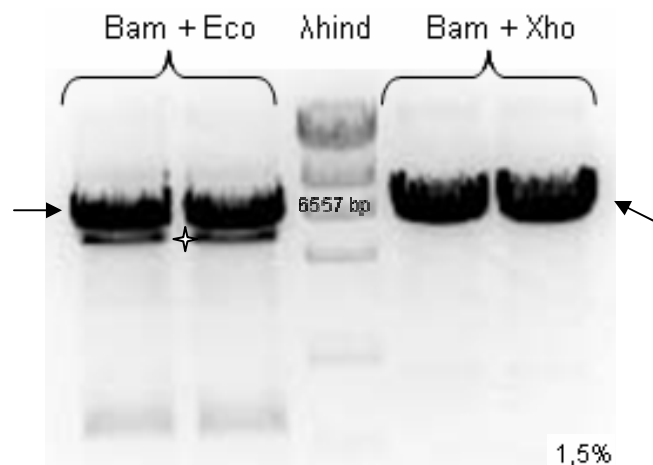
Como já foi comentado, a escolha de se usar duas enzimas diferentes para cortar tanto as extremidades dos insertos, quanto a região de policlonagem do vetor foi feita para que houvesse uma inserção de forma direcionada, isto é, a orientação 5'-3' correta para a síntese protéica dos domínios das Semas fosse mantida no momento em que houvesse a ligação dos insertos ao vetor.

Para digerir o vetor foi necessário fazer a digestão de cada enzima separadamente devido à proximidade dos sítios de restrição usados (ver figura 8).



**Figura 8: Região de policlonagem do plasmídeo pGILDA representando os sítios de restrição únicos existentes.**

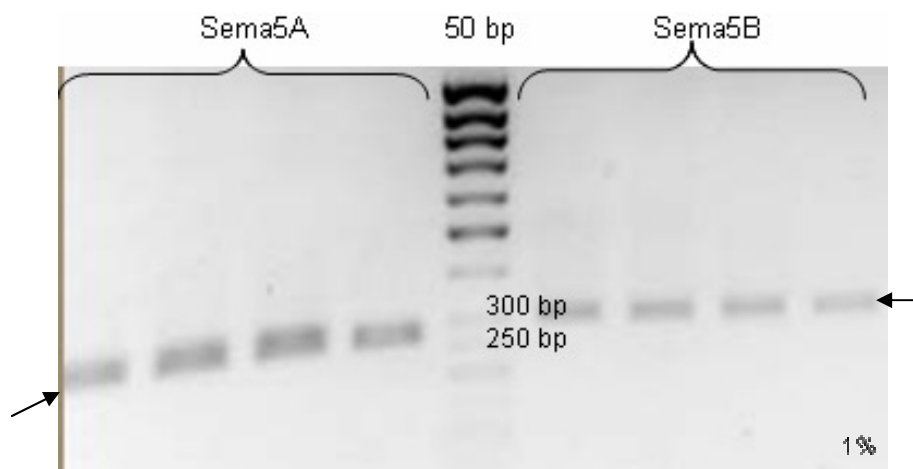
Após a digestão, as amostras foram aplicadas em gel de agarose contendo brometo de etídio e submetidas à eletroforese.



**Figura 9: Digestão dupla dos plasmídeos.** Lanes: **Bam + Eco**: Dupla digestão do pGILDA com enzimas para prepará-lo para o inserto 5A: “pG\_5A”; **λ Hind**: Marcador de pares de base; **Bam + Xho**: Dupla digestão do pGILDA com enzimas para prepará-lo para o inserto 5B: “pG\_5B”. Setas indicam as bandas extraídas, estrela indica a banda da forma *super-coiled* do plasmídeo não digerido.

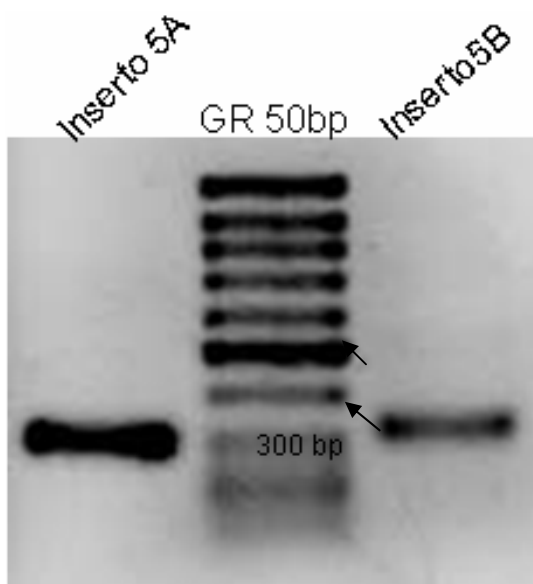
No plasmídeo preparado para receber a Sema\_5A foi observado a presença de uma pequena banda extra com um peso um pouco menor após a digestão. Provavelmente esta última corresponde à forma *super-coiled* do plasmídeo, que não foi totalmente digerido. Apenas a banda superior seguiu para a gel-extração. (**Fig. 9**)

A dupla digestão dos insertos foi feita com ambas as enzimas ao mesmo tempo, e resultou em bandas na altura esperada (**Fig. 10**). Os insertos foram então extraídos do gel fornecendo uma grande quantidade de fragmentos com pontas coesivas para futuras ligações.

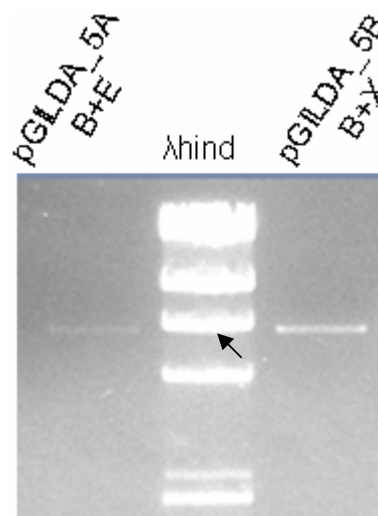


**Figura 10: Insertos duplamente digeridos.** Lanes: **Sema5A:** Insertos da Sema\_5A duplamente digeridos; **50bp:** Marcador de pares de base Gene Ruller 50bp, pesos de interesse indicados no gel; **Sema5B:** Insertos da Sema\_5B duplamente digeridos. Setas indicam as bandas extraídas.

#### 4.4 Quantificação, Ligação e Transformação



**Figura 11: Imagem usada para quantificar os inserts.** Lanes: **Inserto 5A:** 3 $\mu$ l dos inserts da Sema\_5A digeridos e gel extraídos anteriormente; **GR 50bp:** Marcador de massa 50bp; **Inserto 5B:** 3 $\mu$ l dos inserts da Sema\_5B digeridos e gel extraídos anteriormente. Seta indica a banda de 400bp usada para comparação de massa.



**Figura 12: Imagem usada para quantificar os plasmídeos.** Lanes: **pGilda\_5A:** 1 $\mu$ l do plasmídeo preparado para ligação com a Sema\_5A digerido e gel extraído anteriormente;  **$\lambda$  Hind:** Marcador de peso molecular; **pGilda\_5A:** 1 $\mu$ l do plasmídeo preparado para ligação com a Sema\_5B digerido e gel extraído anteriormente. Seta indica a banda de 6557 bp do  $\lambda$  Hind utilizada para comparação.

A ligação foi feita a partir dos dados observados em gel. Foram aplicados 3 $\mu$ l de cada inserto digerido no gel de agarose corado com brometo de etídeo. As intensidades das bandas foram comparadas com a do peso molecular de concentração conhecida obtendo-se o valor de 15ng/ $\mu$ l para Sema\_5A e 10ng/ $\mu$ l para Sema\_5B. O mesmo foi feito com os plasmídeos, sendo que 1 $\mu$ l de cada vetor digerido e purificado foi aplicado no gel. Para pGilda\_5A foi calculada uma concentração de 3,38ng/ $\mu$ l, enquanto que para pGilda\_5B foram calculados 6,76 ng/ $\mu$ l. (**Figs 11 e 12**)

É preciso obedecer uma relação entre o número de moléculas de inserto com o de moléculas de plasmídeos para obter um sucesso maior na reação de ligação (normalmente deve-se colocar cinco vezes mais inserts do que vetores). Além disso, para uma reação de ligação costuma-se usar 50 ng de plasmídeo e o volume final da reação deve ser o menor possível (5-20  $\mu$ l) para manter concentradas as moléculas que serão ligadas. Assim, para atender a esses critérios, após a quantificação, foi necessário concentrar as amostras dos vetores em centrífuga à

vácuo: 15µl do pG\_5A e 8µl do pG\_5B foram concentrados, ambos para um volume final de ~5,3µl.

Após a ligação, as reações foram precipitadas para obtenção do DNA livre de sal, pronta para eletroporação.

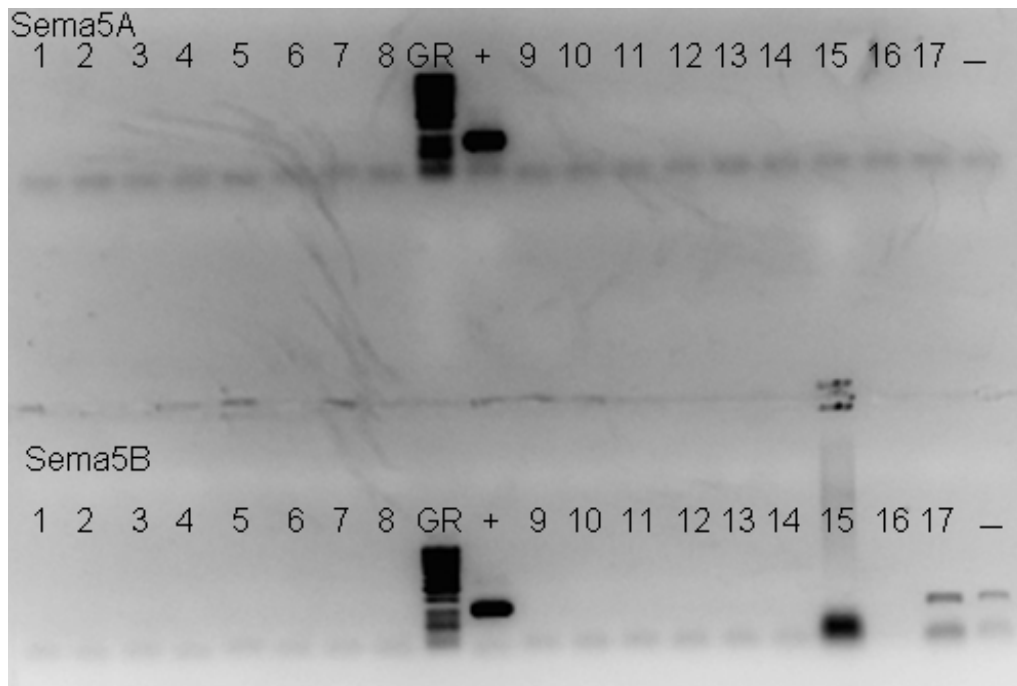
Após a eletroporação não houve sucesso no crescimento de colônias de bactérias, então foi utilizado para eletroporação 1µl da reação de ligação retirado antes da amostra passar pela etapa de precipitação. Isto foi feito, pois acreditou-se que a etapa de dessalinização por acetato resultou na perda de DNA, logo, não havia plasmídeos contendo o gene que confere resistência para a ampicilina e portanto, as bactérias não foram transformadas. Após a nova eletroporação, foi então observado o crescimento de inúmeras colônias, as quais foram averiguadas quanto à presença dos insertos de interesse através de PCR de colônia.

Nesta PCR foi observada apenas um clone possivelmente positivo (que apresentava o inserto). Essa colônia foi repicada em meio líquido com antibiótico, porém não houve crescimento.

Mesmo com resultados de clones positivos, não foi possível recuperar nenhuma colônia, então foram realizadas novas digestões, cálculos de concentração e ligações. Após a transformação, recuperação e plaqueamento das bactérias foram escolhidas novas colônias para averiguação de inserção, novamente após resultados positivos, a tentativa de recuperar as colônias falhou.

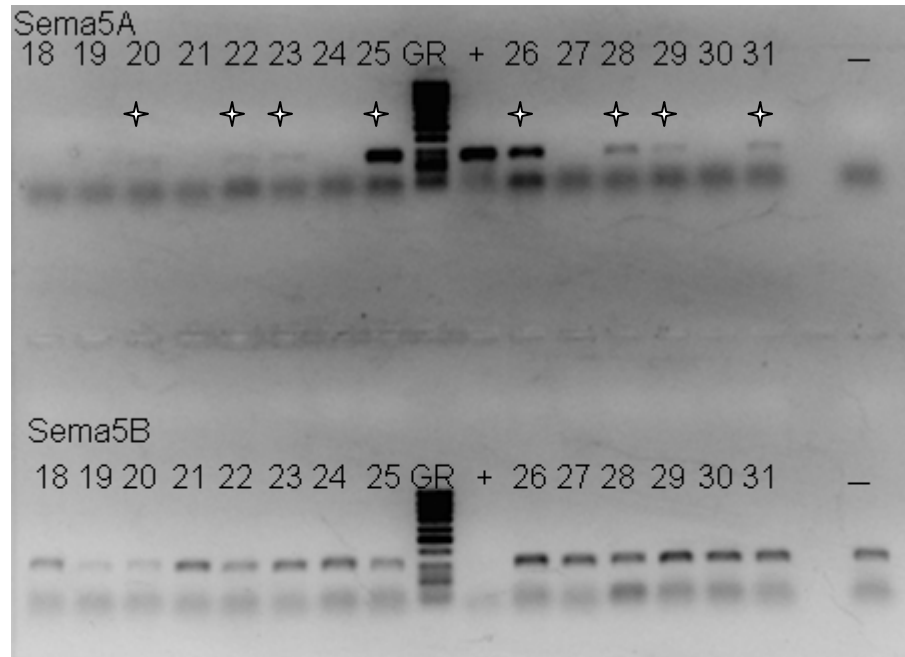
Uma nova tentativa de ligação e dessalinização por membrana foi feito, porém, mais uma vez após o aparecimento de clones positivos não foi possível recuperar nenhuma colônia de bactéria. No item a seguir, alguns exemplos dos géis obtidos após PCR de colônias serão mostrados e discutidos.

#### 4.5 PCR de Colônia.



**Figura 13: PCR de colônia.** Lanes: **Sema5A 1-17:** Colônias contendo a construção pGi\_5A; **GR:** Marcador Gene Ruller 50bp; **+**: Reação com cDNA; **-:** Controle negativo com colônias transformadas com pG\_5A. **Sema5B 1-17:** colônias contendo a construção pGi\_5B; **GR:** Marcador Gene Ruller 50bp; **+**: Reação com pET28a-CITO; **-:** Controle negativo com colônias transformadas com pG\_5B

O resultado da figura 13 indicou que apenas a colônia 17 poderia apresentar o inserto de interesse. A colônia 17 foi coletada e incubada em meio líquido com ampicilina, porém não houve crescimento. Assim, assume-se que a colônia 17 para Sema5B foi provavelmente contaminada, dando um resultado falso positivo. Nota-se também que controle negativo também apresentou a banda, reforçando ainda mais a hipótese de contaminação da reação com algum DNA contendo a seqüência codificadora para o domínio citoplasmático de Sema5B. É provável que o molde usado na reação do controle positivo, um outro plasmídeo contendo o inserto em questão, tenha contaminado outros tubos, apesar dos cuidados tomados. Com estes resultados, presumiu-se que houve falha nas reações de ligação. Assim, várias etapas foram repetidas, desde a digestão dos insertos.



**Figura 14: PCR de colônia.** Lanes: **Sema5A 18-131:** colônias contendo a construção pGi\_5A; **GR:** Marcador Gene Ruller 50bp; **+**: controle positivo; **-:** Controle negativo com colônias transformadas com pG\_5A. **Sema5B 18-31:** colônias contendo a construção pGi\_5B; **GR:** Marcador Gene Ruller 50bp; **+**: Reação com pET28a-CITO; **-:** Controle negativo com colônias transformadas com pG\_5B. Estrelas indicam as colônias positivas para Sema\_5A.

Após novas digestões e ligações, obteve-se resultados promissores para as colônias Sema\_5A e resultados duvidosos para a Sema\_5B (**Fig. 14**). As colônias usadas na reação de PCR foram passadas, em paralelo, para novas placas (“Master plates”), com a finalidade de replicação das bactérias. Entretanto, nenhuma das colônias cresceu nessas novas placas. Colônias positivas no PCR para Sema\_5A e algumas para 5B foram incubadas a partir da placa original, contudo, novamente, nenhuma colônia cresceu. Mais uma vez foi observada uma banda na altura da Sema\_5B no poço do controle negativo da 5B e nenhuma banda no controle positivo (devido a resultados anteriores foi tomado um cuidado especial evitando-se a troca dos controles em todos os passos críticos, bem como contaminações.)

Após uma nova tentativa de ligação, um novo método de dessalinização (diálise) e a transformação com o dobro da quantidade habitual de construções, uma nova PCR de colônia foi feita. Neste novo experimento (resultado não mostrado) nenhuma colônia apresentou bandas na altura esperada após a PCR, logo, os insertos não haviam sido ligados nos plasmídeos, houve crescimento positivo nas master plates, porém ao tentar uma inoculação experimental em meio líquido, não foi observado nenhum crescimento.

Como foi visto, foram utilizadas diversas técnicas para tentar se obter uma colônia viável que portasse um plasmídeo com o inserto pretendido, porém sem sucesso. Diferentes práticas de laboratório, otimização de protocolos e um controle ainda maior de qualidade serão usados para a obtenção de uma grande quantidade do plasmídeo pGILDA contendo os insertos para as porções citoplasmáticas das Semaforinas 5A e 5B para dar continuidade no projeto ao longo do Mestrado.

Contudo, foi obtido uma grande quantidade do pGILDA a partir de uma alíquota doada pela Profa. Dra. Bettina Malnic (IQ-USP), podendo este ser aplicado em futuros projetos envolvendo o sistema de duplo-híbrido dentro do laboratório de Neurobiologia ou em qualquer outro laboratório parceiro.

Os iniciadores desenhados para esse trabalho também serão amplamente utilizados na continuação e em futuros projetos relacionados.

## 5. CONCLUSÃO

- Os iniciadores desenhados demonstraram sucesso em reações de PCR produzindo fragmentos de peso molecular nos tamanhos esperados;
- Produção de grande quantidade do plasmídeo pGILDA para uso futuro em inúmeros projetos foi bem sucedida;
- Digestão dupla de fragmentos de PCR e plasmídeos e subsequente construção de vetores recombinantes foram obtidos;
- Impossibilidade de manter colônias contendo qualquer plasmídeo recombinante impediu a verificação e aplicabilidade da construção.
- Outras tentativas para as construções serão realizadas, já que estas serão utilizadas em projeto de mestrado para identificação de parceiros moleculares de Sema5A e Sema5B, através do sistema de duplo-híbrido em leveduras.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, J.C., TUCKER, R.P. The thrombospondin type 1 repeat (TSR) superfamily: diverse proteins with related roles in neuronal development. *Dev Dyn* **218**:280-99, 2000.
- ADAMS, R.H., BETZ, H., PUSCHEL, A.W. A novel class of murine semaphorins with homology to thrombospondin is differentially expressed during early embryogenesis. *Mech Dev* **57**:33-45,1996.
- ADAMS, R.H. LOHRUM, M., KLOSTERMANN, A., BETZ, H., PÜSCHEL, A.W. The chemorepulsive activity of secreted semaphorins is regulated by furin-dependent proteolytic processing. *EMBO J.* **16**:6077-6086, 1997.
- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. AND WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula.** 4 ed. – Porto Alegre. Artmed, 2004.
- ARTIGIANI S, CONROTTO P, FAZZARI P, GILESTRO GF, BARBERIS D, GIORDANO S, COMOGLIO PM, TAMAGNONE L. Plexin-B3 is a functional receptor for Sema 5A. *EMBO Rep.* **5**: 710-714, 2004.
- AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. **Current Protocols in Molecular Biology** (John Wiley & Sons, Inc.), vol.3, un. 20.1, 1999.
- BRENT, R; PTASHNE, M. A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell* **43** 729-736, 1985.
- CASTELLANI, C., ROUGON, G. Control of semaphoring signaling. *Curr Opin Neurobiol* **12**: 532-541, 2002.
- ExpASY Proteomics Server.** Disponível em <http://www.expasy.ch/> > Acesso em 1º de Agosto de 2008.
- FIORE, R.; RAHIM, B.; CHRISTOFFELS, V. M.; MOORMAN, A.F.M.; PÜSCHEL, A.W. Inactivation of the Sema5a gene results in embryonic lethality and defective remodeling of the cranial vascular system. *Mol Cell Biol*, **25**: 2310-19, 2005.
- HALLORAM, M.C.; WOLMAN, M.A. Repulsin or adhesion: receptors make the call. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**: 533-540, 2006.

HUBER, A.B. KOLODKIN, A.L., GINTY, D.D., CLOUTIER, J.F. Signaling at the growth cone: ligand-receptor complex and the control of axon growth and guidance. *Annu. Rev. Neurosci.*, **26**: 509-563, 2003.

**Integrated DNA Technologies.** Disponível em <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/> > Acesso em 1º de Agosto de 2008.

KAMIGUCHI, H., LEMMON, V. IgCAMs: bidirectional signals underlying neurite growth. *Curr Opin Cell Biol* **12**: 598-605, 2000.

KANTOR, D.B.; CHIVATAKAN, O., PEER, K., OSTER, S.F., INATANI, M., HANSEN, M.J., JOHN G.F., YAMAGUCHI, Y., SRETAVAN, D.W., GIGER, R.J., KOLODKIN, A.L. Semaphorin 5A is a Bifunctional Axon Guidance Cue Regulated by Heparan and Chondroitin Sulfate Proteoglycans. *Neuron* **44**: 961-975, 2004.

KENNEDY, T.E. Cellular mechanisms of netrin function: long-range and short-range actions. *Biochem Cell Biol* **78**: 569-75, 2000.

KENNETH, C.W. To, CHURCH, J., O'CONNOR, T.P. Combined activation of calpain and calcineurin during ligand-induced growth cone collapse. *Mol. Cell. Neurosci.* **36**: 425-434, 2007.

GIGER, R.J.; KOLODKIN, A.L. Silencing the siren: guidance cue hierarchies at the CNS midline. *Cell* **105**: 1-4, 2001.

KOLODKIN, A.L. MATTHES, D.J., O'CONNOR, T.P., PATEL, N.H., ADMON, A., BENTLEY, D., GOODMAN, C.S. Fascilin IV: sequence, expression and function during growth cone guidance in the grasshopper embryo. *Neuron*, **9**: 831-845, 1992.

MATTHES, D.J. SINK, H., KOLODKIN, A.L., GOODMAN, C.S. Semaphorin II can function as a selective inhibitor of specific synaptic arborization. *Cell*, **81**: 631-639, 1995.

MUELLER, B.K. Growth cone guidance: first steps towards a deeper understanding. *Annu. Rev. Neurosci.* **22**: 351-388, 1999.

**NCBI HomePage.** Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> > Acesso em 1º de Agosto de 2008.

**ORF Finder.** Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/> > Acesso em 1º de Agosto de 2008.

OSTER, S.F. BODEKER, M.O., HE, F., SRETAVAN, D.W. Invariant Sema 5A inhibition server as ensheathing function during optic nerve development, *Development* **130**: 775-784, 2003.

PASTERKAMP, R.J. PESCHON, J.J., SPRIGGS, M.K., KOLODKIN, A.L. Semaphorin 7A promotes axon outgrowth through integrins and MAPKs. *Nature*, **424**: 398-405, 2003.

PATEL B.N., VAN VACTOR, D.L. Axon guidance: the cytoplasmic tail. *Curr Opin Cell Biol* **14**: 221-9, 2002.

PÜSCHEL, A.W. Semaphorins: repulsive guidance molecules show their attractive side *Nature Neurosc.* **2**: 777-778, 1999a.

PÜSCHEL, A.W. Divergent properties of mouse netrins *Mech. Dev* **83**: 65-75, 1999b.

RANSCHT, B. Cadherins: molecular codes for axon guidance and synapse formation. *Int J Dev Neurosci* **18**: 643-51, 2000.

RAPER, J.A. Semaphorins and their receptors in vertebrates and invertebrates. *Cur Opin Neurobiol*, **10**: 95-104, 2000.

ROHM, B OTTEMEYER, A., LOHRUM, M., PÜSCHEL, A.W. Plexin/neuropilin complexes mediate repulsion by the axonal guidance signal semaphorin 3A. *Mech. Dev.*, **93**: 95-104, 2000a.

ROHM, B. RAHIM, B., KLEIBER, B., HOVATTA, I., PÜSCHEL, A.W. The semaphorin 3A receptor may directly regulate the activity of small GTPases. *FEBS Letters* **486**: 68-72, 2000b.

ROLLMANN, S.M., YAMAMOTO, A., GOOSSENS, T., ZWARTS, L., CALLAERTS-VÉGH, Z., CALLAERTS, P., NORGA, K., MACKAY, T.F., ANHOLT, R.R. The Early Developmental Gene Semaphorin 5c Contributes to Olfactory Behavior in Adult *Drosophila*. *Genetics* **176**: 947-956, 2007.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor, NY, 2001.

SCHLESSINGER, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **103**: 211-25, 2000.

SEMAPHORIN NOMENCLATURE COMMITTEE. Unified Nomenclature for the Semaphorins/Collapsins. *Cell* **97**: 551-552, 1999.

TAMAGNONE, L.; COMOGLIO, P.M. Signalling by semaphorin receptors: cell guidance and beyond. *Trends Cell Biol* **10**: 377-83, 2000.

TAMAGNONE, L.; COMOGLIO, P.M. To move or not to move? Semaphorin signalling in the cell migration. *EMBO Rep.*, **5**: 356-361, 2004.

TESSIER-LAVIGNE, M.; GOODMAN, C.S. The molecular biology of axon guidance. *Science* **274**: 1123-1133, 1996.

VON DANNECKER, L E ; MERCADANTE, A. F. ; MALNIC, B . Ric-8B, an olfactory putative GTP exchange factor, amplifies signal transduction through the olfactory-specific G-protein Galphao1f. *J. Neurosci.*, **25**: 3793-3800, 2005.

WINBERG M.L. NOORDERMEER, J.N., TAMAGONE, L., COMOGLIO, P.M., SPRIGGS, M.K., TESSIER-LAVIGNE, M., GOODMAN, C.S. Plexin A is a neuronal semaphorin receptor that controls axon guidance. *Cell*, **95**: 903-16, 1998.

WIT, J.; VERHAAGEN, J. Role of semaphorins in the adult nervous system. *Prog. Neurobiol.*, **71**: 249-267, 2003.

WOODHOUSE, E.C., FISHER, A., BANDLE, R.W., BRYANT-GREENWOOD, B., CHARBONEAU, L., PETRICOIN III, E.F., LIOTTA, L.A. *Drosophila* screening model for metastasis: semaphorin 5c is required for l(2)gl cancer phenotype. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **100**: 11463-11468, 2003.

ZANATA, S.M., HOVATTA, I., ROHM, B., PÜSCHEL, A.W. (2002) Antagonistic effects of Rnd1 and RhoD GTPases regulate receptor activity in Semaphorin 3A-induced cytoskeletal collapse. *J Neurosci.* **22**: 471-477, 2002.