

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EVANDRO SANTOS BILEK

**EXPRESSÃO DE GTPASES RECOMBINANTES:
PURIFICAÇÃO E USO EM ENSAIOS DE PULL-DOWN**

CURITIBA

2014

EVANDRO SANTOS BILEK

**EXPRESSÃO DE GTPASES RECOMBINANTES:
PURIFICAÇÃO E USO EM ENSAIOS DE PULL-DOWN**

Monografia apresentada à disciplina de Estágio Supervisionado em Biologia, como requisito parcial à conclusão do Bacharelado em Ciências Biológicas, setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná

Orientador: Dr. Luiz Eduardo Rizzo de Souza

Co-orientador: Prof. Dr. Silvio Marques Zanata

CURITIBA

2014

RESUMO

A GTPase Rnd1 é um membro da família Rho de GTPases que apresenta a peculiaridade de estar constitutivamente em seu estado ativo (ligado a GTP). Seu papel na célula está ligado à plasticidade do citoesqueleto, com especial importância no desenvolvimento do sistema nervoso. A proteína STI-1, assim como a Rnd1, é expressa em neurônios e células da glia. Dentre suas funções estão neuroproteção, neuritogênese, dobramento de proteínas (é uma co-chaperona), e, mais recentemente, regulação do citoesqueleto. Considerando o papel desempenhado pelas duas proteínas no desenvolvimento do sistema nervoso, e a literatura científica atual, levantou-se a hipótese de que as duas pudessem atuar em conjunto, e que STI1 possivelmente seria responsável por regular a atividade da Rnd1. Assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar uma possível interação *in vitro* entre Rnd1 e STI1. Para tanto, foram expressas em sistema heterólogo de *E. coli* as GTPases recombinantes Rnd1, Rnd2, e RhoD, previamente clonadas em vetores pGEX 4T2, que confere um tag de GST. Tais proteínas foram imobilizadas em matriz sólida de Glutathione-Sepharose e incubadas com extratos totais de encéfalo de camundongos para ensaios de pull-down. As proteínas foram eluídas das matrizes com tampão de amostra. Os eluatos foram então analisados em SDS-PAGE e western blotting com os anticorpos específicos anti-GST e anti-STI1. Os resultados evidenciaram interação específica entre GST-Rnd1 e STI1. As três proteínas citadas foram também expressas em larga escala e purificadas, para ensaios bioquímicos futuros.

ABSTRACT

The GTPase Rnd1 is a member of the Rho family of GTPases. It has the peculiarity of being constitutively active (bound to GTP). Its role in the cell is linked to the plasticity of the cytoskeleton, with special importance on the development of the nervous system. The protein STI1, as well as Rnd1, is expressed in neurons and glia. Among its functions are neuroprotection, neuritogenesis, folding of other proteins and, more recently, the regulation of cytoskeleton dynamics. Considering the role of both proteins on the development of the nervous system, and the current literature on the issue, we hypothesized that they could interact, and that STI1 would possibly regulate the activity of Rnd1. Therefore, the aim of this work was to characterize an *in vitro* interaction between Rnd1 and STI1. In order to do so, three GTPases (Rnd1, Rnd2 and RhoD) were expressed in *E. coli* heterologous system, using the pGRX 4T2 vector, which express a GST tag. These proteins were immobilized in Glutathione-Sepharose solid matrix, and incubated with whole mice brain extract, in the pull-down assay. The proteins were eluted from the matrix with sample buffer. They were solved in SDS-PAGE followed by western blot. The results show a specific interaction between Rnd1 and STI1. The three mentioned GTPases were also expressed in large scale, and purified, for future biochemical assays.

SUMÁRIO

1 OBJETIVOS	6
1.1 OBJETIVOS GERAIS.....	6
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	6
2 INTRODUÇÃO	7
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
3.1 DESCRIÇÃO DAS PROTEÍNAS DO ESTUDO.....	10
3.2 FUNÇÕES BIOLÓGICAS DA INTERAÇÃO.....	11
4 MATERIAIS E MÉTODOS	14
4.1 MINIEXPRESSÃO DAS GTPASES.....	14
4.2 EXPRESSÃO EM LARGA ESCALA DAS GTPASES.....	15
4.3 EXPRESSÃO DAS GTPASES PARA ENSAIO DE PULL-DOWN.....	15
4.4 ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO DAS GTPASES NO EXTRATO BACTERIANO.....	16
4.5 OBTENÇÃO DE EXTRATO DE CÉREBRO DE CAMUNDONGO.....	16
4.6 O ENSAIO DE PULL-DOWN.....	16
4.7 ANTICORPOS.....	17
5. RESULTADOS	18
5.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS GTPASES.....	18
5.1.1 GST-RhoD.....	18
5.1.2 GST-Rnd1.....	21
5.1.3 GST-Rnd2.....	22
5.1.4 GST.....	23
5.2 ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE NOS EXTRATOS BACTERIANOS PARA ENSAIOS DE PULL-DOWN.....	24
5.3 PULL-DOWN.....	26
6. DISCUSSÃO	28
6.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS GTPASES.....	28
6.1.1 RhoD.....	28
6.1.2 Rnd1.....	29
6.1.3 Rnd2.....	30
6.1.4 GST.....	31
6.2 PULL-DOWN.....	31
6.2.1 O PRIMEIRO ENSAIO DE PULL-DOWN.....	32
6.2.2 O SEGUNDO ENSAIO DE PULL-DOWN.....	33
7. CONCLUSÃO	34
7.1 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	34
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

1 – Objetivos

1.1 – Objetivos Gerais

Caracterizar a interação in vitro entre a GTPase de baixa massa molecular Rnd1 e a proteína STI1, além de testar a especificidade da interação.

1.2 – Objetivos específicos

- Expressar e purificar diferentes GTPases recombinantes.
- Realizar ensaios de pull-down para caracterizar a especificidade de interação entre STI1 e Rnd1.

2 – Introdução

A GTPase Rnd1 (Round protein 1) faz parte da família Rho de GTPases. Esta família é constituída por proteínas com função GTPásica, cujas funções estão basicamente relacionadas com a plasticidade do citoesqueleto – as Rho GTPases estão envolvidas em eventos intracelulares que ocorrem desde a formação do tubo polínico em angiospermas, até a formação de brotos em leveduras e de estereocílios cocleares em mamíferos. Em humanos, a espécie com mais GTPases descritas, apenas três foram estudadas extensivamente: RhoA, Rac1 e Cdc42. (WHERLOCK e MELLOR, 2002), figura 1.

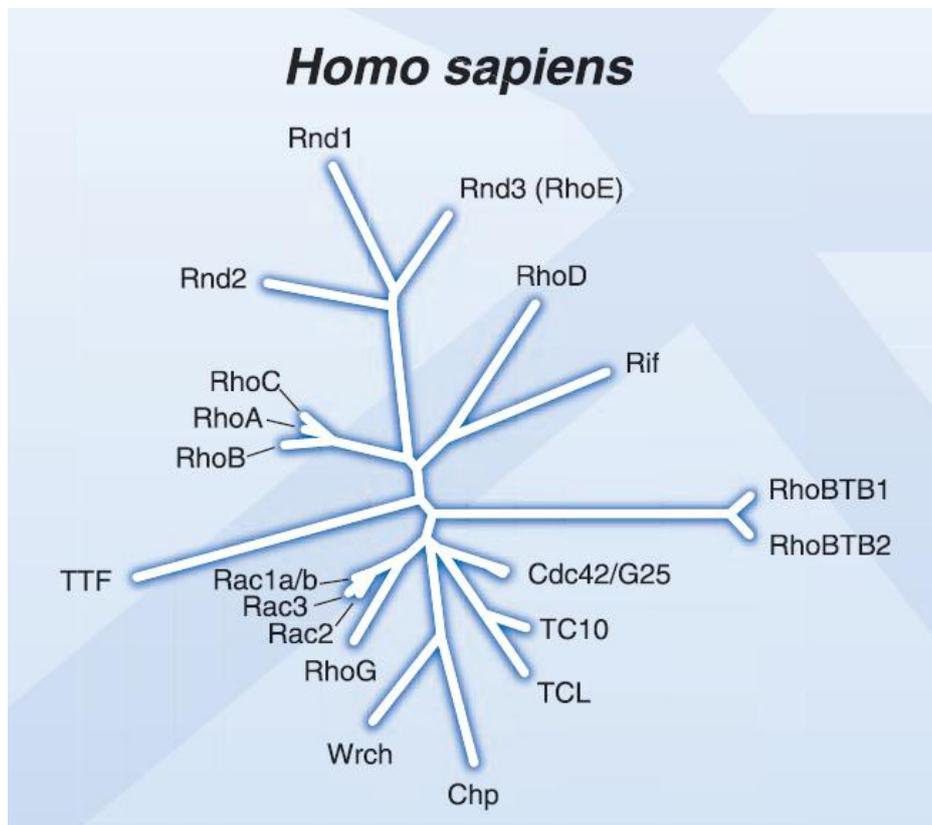


FIGURA 1 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DAS Rho GTPases DE HOMO SAPIENS
FONTE: WHERLOCK e MELLOR, 2002

A hidrólise do GTP nesta família é regulada pela ação de outros dois grupos de proteínas, as GEFs (guanine nucleotide exchange factors) e GAPs (GTPase activating protein), que são responsáveis por induzir a GTPase a, respectivamente, trocar GDP por uma molécula de GTP citoplasmático e hidrolisar GTP a GDP, como mostrado na figura 2. As Rho GTPases estarão

ativas no seu estado ligado a GTP, e só assim serão capazes de transmitir os sinais “downstream” na via metabólica. Em outras palavras, as Rho GTPases são sinalizadoras químicas intracelulares com função relacionada a modificações no citoesqueleto. Seu funcionamento é idêntico aos das proteínas-G (LUO, 2000).

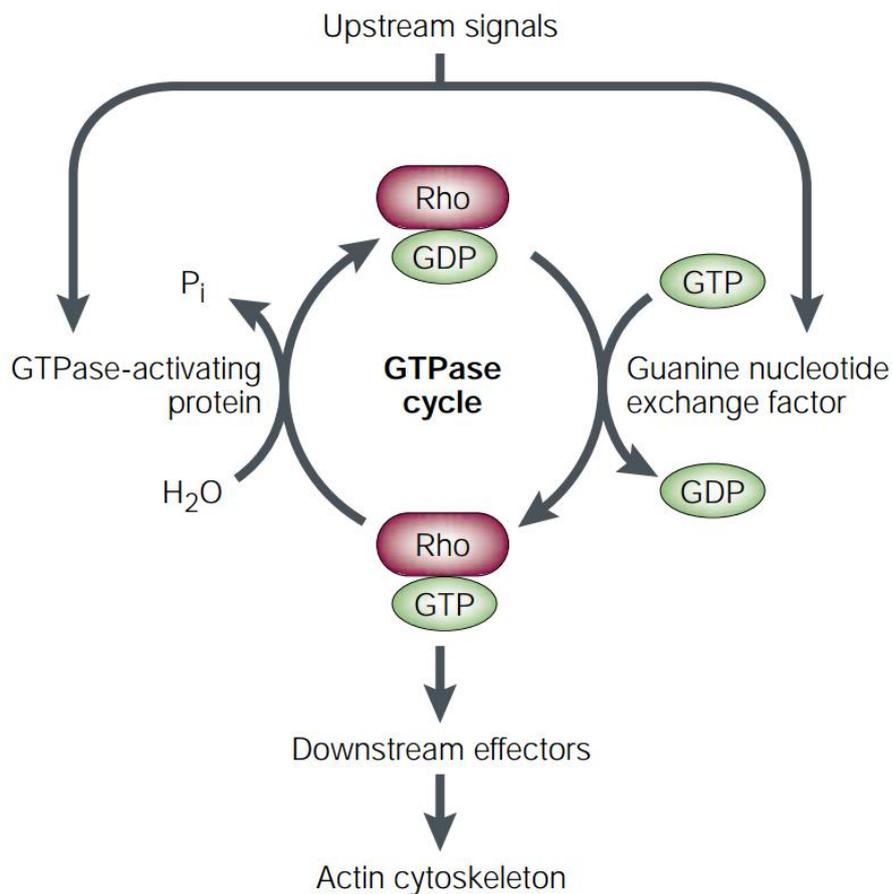


FIGURA 2 – ESQUEMA DE FUNCIONAMENTO DE UMA GTPase Rho
FONTE: LUO, 2000.

Os membros da subfamília Rnd (Rnd1, Rnd2 e Rnd3) apresentam a peculiaridade de estarem permanentemente ligados a GTP, ou seja, estão constitutivamente ativos. Isso ocorre devido a uma mutação no gene que codifica aminoácidos-chave responsáveis pela atividade de hidrólise do GTP. Assim, a função GTPásica das Rnd é reduzida drasticamente. Sua expressão é vista principalmente no cérebro e fígado para Rnd1, testículos para Rnd2 e Rnd3 apresenta baixa expressão em quase todos os tecidos do corpo (NOBES *et al.*, 1998)

A proteína STI1 (Stress-Inducible protein 1) foi descrita pela primeira vez em 1989 como uma ligante da chaperona Hsp70 sob situações de estresse térmico de células de *Saccharomyces cerevisiae* (NICOLET e CRAIG, 1989). Mais tarde observou-se que STI1 é na realidade uma co-chaperona, atuando como transportadora de proteínas-cliente de Hsp70 a Hsp90. Sozinha, no entanto, STI1 não apresenta atividade no dobramento de proteínas. Além disso, apresenta afinidade de ligação com PrPc, uma proteína não envolvida no âmbito do dobramento de outras proteínas (OUDUNUGA *et al.*, 2004). STI1 tem descrito, ainda, seu papel no desenvolvimento de neuritos (prolongamentos semelhantes a axônios observados em culturas de células eucarióticas) (LOPES *et al.*, 2005).

Um fato interessante para este estudo é que alguns trabalhos indicam Rnd1 e STI1 presentes na porção citoplasmática da membrana celular (SOUZA, 2012). Esta possível co-localização, somada à análise das funções exercidas por ambas as proteínas no sistema nervoso, justifica a tentativa de caracterizar um modelo de interação *in vitro* entre elas.

3 – Revisão Bibliográfica

3.1 – Descrição das proteínas do estudo

Nobes *et al.* (2008) foram os primeiros a descrever as GTPases da subfamília Rnd. Segundo esse trabalho, Rnd1 está localizada, em nível intracelular, em junções aderentes de fibroblastos e células epiteliais; ela apresenta baixa afinidade por GDP e rapidamente efetua a troca espontânea de GDP por GTP em tampão fisiológico. O estudo mostrou ainda que a função de Rnd1 está fortemente ligada às fibras de actina do citoesqueleto. Sob o efeito de LPA (ácido lisofosfatídico), fibroblastos rapidamente sintetizam fibrilas contráteis formadas por actina e miosina (fibras de estresse). Em situações de superexpressão de Rnd1, a formação dessas fibras é inibida, e também há a perda de sítios de ancoragem que serviriam para a ligação de proteínas da matriz extracelular com as fibras de estresse. O trabalho de Harada *et al.* (2005) mostrou que Rnd1 interage com a porção citoplasmática do receptor para FGF (fibroblast growth factor) e promove a reorganização do citoesqueleto para a extensão de neuritos.

O trabalho de Nicolet e Craig (1989) descreveu a proteína STI1 pela primeira vez. Sua primeira função elucidada foi a de co-chaperona, ou seja, é uma proteína que auxilia as chaperonas no processo de dobramento de proteínas-cliente. A STI1 apresenta um domínio conservado entre as proteínas “stress-inducible” das diversas espécies de mamíferos, o domínio TPR (tetratricopeptídeo). Essa região foi sugerida por Smith *et al.* (1993) e Blatch e Lässle (1999), como a responsável pela formação dos macrocomplexos proteicos com atividade chaperonina. Zanata *et al.* (2002a) sugeriu STI1 como ligante da proteína prion celular (PrPc) através de análise de hidropaticidade complementar de PrPc e comprovou o fato através de ensaios bioquímicos. Mais recentemente, Willmer *et al.* (2012) descreveram pela primeira vez a interação entre STI1 e actina na formação de pseudópodos de células cancerígenas. Segundo esse artigo, durante o silenciamento de STI1 com RNAi, observa-se uma queda na expressão da GTPase RhoC. Este fato é extremamente relevante para o presente estudo, por ser o primeiro que relaciona STI1 com uma GTPase da mesma família de Rnd1.

3.2 Funções biológicas da interação

A consequência biológica da interação entre as proteínas deste estudo está relacionada ao desenvolvimento do sistema nervoso. Mais especificamente, na formação e extensão de neuritos.

Os neuritos são estruturas celulares em forma de filamentos, que começam a surgir imediatamente após a diferenciação de células tronco em neurônios. São eles os precursores das extensões celulares do neurônio – axônio e dendritos (da SILVA e DOTTI, 2002). Ainda segundo esses autores, os neuritos passam por três estágios bem definidos: protrusão inicial, formação do neurito, e polarização (tradução livre de da SILVA e DOTTI, 2002, p695). Os modelos de neuritogênese mais estudados são cultivo primário de neurônios do hipocampo, e células PC12, uma linhagem celular caracterizada por Greene e Tyschler (1976) (MELDOLESI, 2010).

Em cultivo de células PC-12, a proteína Rnd1 causa formação de processos neuríticos (AOKI *et al.* 2000; de SOUZA *et al.* 2014). Já em cultivo primário de células do hipocampo, Lopes *et al.* (2005) mostraram que STI1 induz a neuritogênese quando acompanhada de sua ligante PrPc. Unindo essas informações, mostramos (de SOUZA, 2014) que, quando co-expressas em células PC12, Rnd1 e STI1 passam do estágio de protrusão inicial e formação de neuritos e promovem na célula o estágio de polarização. Isto é, alguns neuritos passam a estender-se significativamente além dos demais. *In vivo*, esse processo culminará na formação dos dendritos e axônio.

A dinâmica intracelular responsável pela neuritogênese é uma malha intrincada de interações moleculares. Segundos-mensageiros, dentre os quais muitas GTPases da família Rho, transmitem os sinais extracelulares que indicam a necessidade do prolongamento neurítico em continuar sua extensão, ou retrair-se (NEGISHI e KATOH, 2005). Dessa maneira, pode-se interpretar a neuritogênese como uma competição entre regiões celulares (os diferentes neuritos e o corpo celular) por proteínas sinalizadoras que permitirão efetuar a resposta aos estímulos extracelulares. Nesse contexto, quando um neurito inicia sua extensão, ele acumula grande parte das proteínas sinalizadoras

responsáveis por tal extensão, prejudicando assim o crescimento dos demais neuritos (van PELT e UYLINGS, 2002).

A extremidade do neurito, onde ocorre a concentração de proteínas sinalizadoras, e há intensa atividade remodeladora do citoesqueleto, é chamada de cone de crescimento. Zanata *et al.* (2002) estudaram a plasticidade do cone de crescimento, em cultivo de células COS-7 e cultivo primário de gânglios simpáticos de embriões de galinha. Esses modelos foram submetidos à ação de semaphorina-3A (sema-3A), um conhecido agente repulsor do neurito (em outras palavras, um agente de colapso do cone de crescimento). A dinâmica molecular dessa microrregião celular descreve Rnd1 e RhoD, como ligantes da porção citoplasmática de plexina-A1 (proteína que une-se a neuropilina para formar um receptor extracelular de sema-3A), com função antagonista (figura 3). Enquanto Rnd1 liga-se a plexina-A1 e transduz o sinal para o colapso do cone de crescimento, RhoD liga-se a esta e inibe o colapso (tal antagonismo foi base para a proposição de RhoD como antagonista a Rnd1 também na interação com STI1). É conhecido na literatura que a ação de RhoD é regulada pelo mecanismo típico das GTPases (GEFs e GAPs, figura 2), enquanto Rnd1 é tida como constitutivamente ativa (NOBES *et al.*, 1998). Nesse contexto, surgiu a proposta de que STI1 poderia atuar como reguladora da atividade de Rnd1, através da interação direta entre ambas, de maneira que Rnd1 estaria impossibilitada de ligar-se a plexina-A1 enquanto ligada a STI1 (de SOUZA *et al.*, 2014). O presente trabalho garante sustentação bioquímica para tal hipótese.

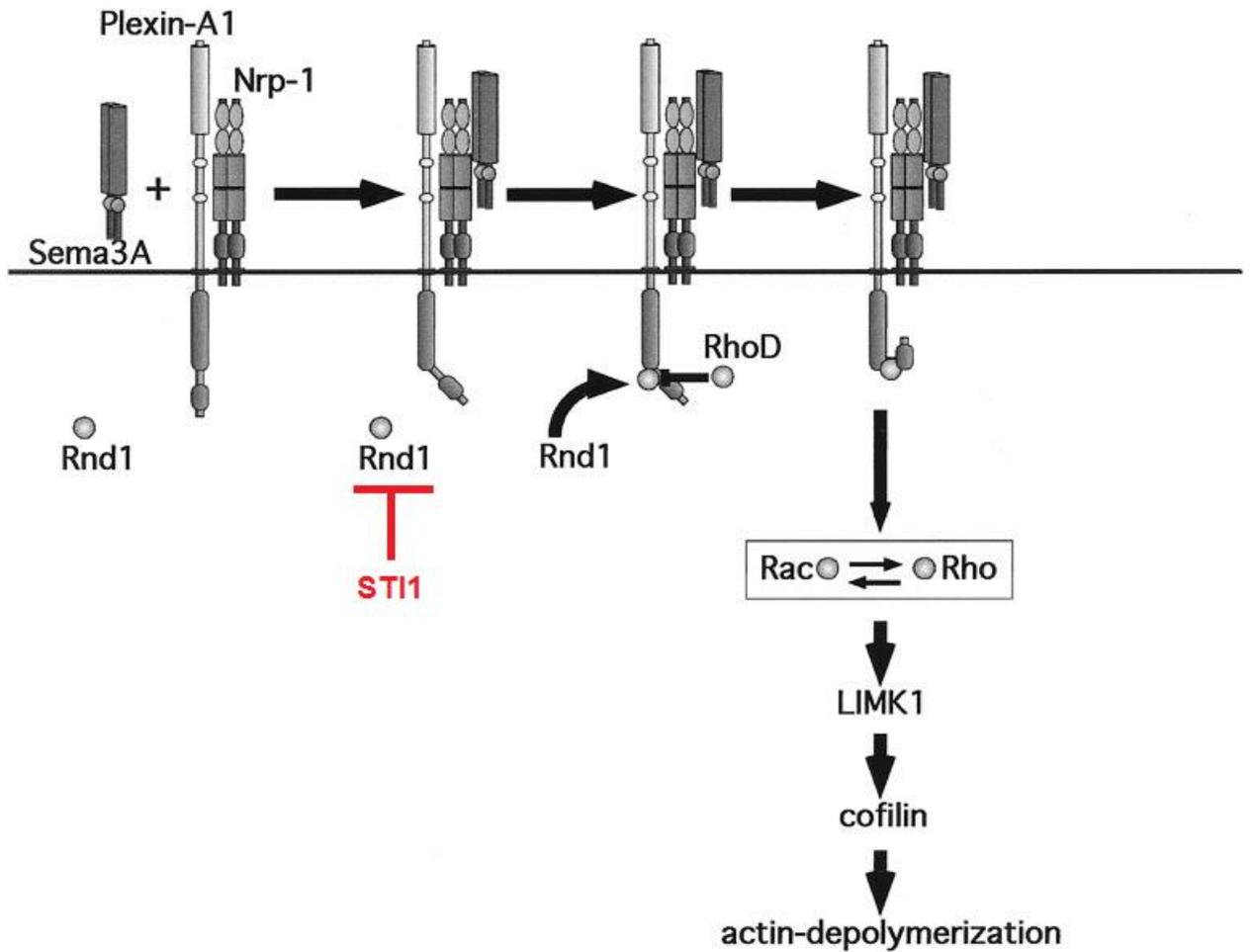


FIGURA 3 – ESQUEMA DE ATUAÇÃO DE Rnd1 E RhoD NO CONE DE CRESCIMENTO
LEGENDA - Sema3A: semaphorina-3A; Plexin-A1: plexina-A1; Nrp-1: neuropilina-1; Rnd1, RhoD, Rac e Rho: GTPases; LIMK e cofilin: mensageiros na cascata de sinalização; actin-depolymerization: despolimerização do citoesqueleto de actina.

FONTE: em escala de cinza: ZANATA *et al.* (2002b); em vermelho: adição do autor

4 – Materiais e Métodos

4.1 – Miniexpressão das GTPases

Será descrita a miniexpressão da GTPase Rnd1. As demais GTPases foram expressas e purificadas nas mesmas condições, ou com poucas modificações que serão devidamente citadas.

Bactérias *E. coli* da estirpe DH5 α foram transformadas com o vetor pGEX-4t-2 contendo o inserto para expressão do gene Rnd1. Esse vetor é responsável pela expressão da quimera proteica GST-Rnd1 e confere resistência ao antibiótico ampicilina. O “tag” GST da quimera é constituído pela enzima glutationa-S-transferase (*Schistosoma japonicum*), que, na natureza, catalisa o ataque nucleofílico da forma reduzida da glutationa (GSH) a compostos eletrofílicos variados. Neste estudo, o “tag” GST permite que a quimera seja purificada a partir da ligação com moléculas de glutationa imobilizadas em matriz de agarose. O vetor também tem a sequência promotora do operon *lac*, para que a expressão da proteína possa ser controlada e induzida por IPTG (análogo à lactose).

As bactérias transformadas foram cultivadas em meio 2xYTA (16 g/L Triptona, 10 g/L extrato de levedura, 5.0 g/L NaCl, 100mg/L ampicilina) fixado com ágar. Oito colônias foram então selecionadas para miniexpressão da proteína GST-Rnd1. Bactérias foram cultivadas em meio líquido 2XYTA até atingir a densidade óptica 0,5 lida a 600 nm. Nesse ponto foi adicionado IPTG na concentração 0,1mM, e deixou-se incubar por uma hora, a 37°C e 220 rpm para que a proteína fosse expressa. Antes da adição do IPTG, foi retirado (e incubado também a 1h, 37°C e 220 rpm) 1 mL da cultura de cada um dos oito clones a fim de ter o controle de células bacterianas sem a indução da expressão proteína. Após a indução, as bactérias foram centrifugadas por 5 minutos a 9000g, o meio de cultura foi descartado e as células foram lisadas com adição de tampão Laemmli (60 mM Tris-Cl pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 5% β -mercaptoetanol, 0.01% azul de bromofenol) e fervura por 20 min a 90°C. As amostras foram resolvidas em SDS-PAGE 10% e coradas com azul de Coomasie.

4.2 – Expressão em larga escala das GTPases

O clone que, na miniexpressão, melhor expressou a quimera proteica foi selecionado para a expressão em larga escala. Para tanto, 400 mL de meio 2XYTA líquido foram inoculados com o clone escolhido e a expressão se deu como descrita no item 4.1. Após a centrifugação final, o precipitado foi ressuspenso em tampão de lise nativa (PBS gelado, 1mM inibidor de protease – PMSF) e a lise mecânica foi feita em prensa de French (1000 psi). O lisado foi centrifugado por 15 min a 9000g para sedimentar restos celulares, depois filtrado em membrana 0,45 µm e finalmente incubado com Triton X-100 1% por 1h a 4°C para ressolubilizar aglomerados proteicos. O lisado foi então incubado com 300 µL de resina de Glutathiona-Sepharose 4B (Pharmacia) por 30 min a temperatura ambiente para a ligação proteína-matriz. A resina foi lavada três vezes com 1mL de PBS a 0°C, e foram adicionados 300 µL de tampão de eluição (20mM glutathiona reduzida, 100mM Tris-HCl, 120 mM NaCl). O tampão de eluição foi incubado com a matriz por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida foi retirado o primeiro eluato, e mais 300 µL de tampão de eluição foram adicionados, e o procedimento repetido. Os eluatos com proteína purificada foram armazenados e 10 µL foram retirados para análise em SDS-PAGE.

A segunda GTPase expressa foi GST-RhoD. A princípio, foram feitas expressões seguindo protocolo idêntico ao utilizado para GST-Rnd1. Em seguida, testamos outros protocolos que alteraram a concentração de IPTG utilizada para indução e/ou o tempo que os clones ficaram sob indução.

4.3 – Expressão das GTPases para ensaio de “pull-down”

A miniexpressão da GTPase seguiu-se como descrito no item 4.1. Os clones que melhor expressaram a proteína foram selecionados e inoculados

em 400mL de meio 2xYTA líquido até atingir a densidade óptica de 0,5 lida a 600 nm, quando foi feita a indução por IPTG. Após o tempo da indução, as culturas foram centrifugadas a 9000g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 20 mL de tampão de lise próprio para pull-down (2mM MgCl₂, 2mM DTT, 0,1mM PMSF, 10% glicerol, 1% Triton X-100 diluídos em PBS gelado). A lise foi feita em prensa de French (1000 psi). O lisado foi centrifugado e filtrado como descrito no item 5.1. O filtrado foi separado em alíquotas de 1 mL, as quais foram armazenadas em freezer -80°C para posterior utilização nos ensaios de pull-down.

4.4 – Estimativa da concentração das GTPases no extrato bacteriano

Após expressão das GTPases para o ensaio de pull-down, foi feita uma estimativa das concentrações. Em um mesmo gel de poliacrilamida foram aplicadas cinco quantidades de albumina sérica bovina (20, 30, 40, 50 e 60 µg) e uma quantidade estimada de cada uma das quatro proteínas recombinantes expressas (GST-Rnd1, GST-Rnd2, GST-RhoD e GST), de maneira que a quantidade de recombinante ficasse dentro dos limites da curva de BSA (ver tabela 3). As quantidades aplicadas foram determinadas com base em experiência pessoal. O gel foi corado com corante de Coomassie, e analisado visualmente.

4.5 – Obtenção de extrato de cérebro de camundongo

O cérebro de um camundongo adulto ou embrião (especificado nas figuras) foi homogeneizado mecanicamente em tampão TLB (50mM Tris-HCl pH 7,4; 150mM NaCl; 1mM DTT; 1,5mM MgCl₂; 4mM EDTA; 10% glicerol; 1% Triton X-100; 1mM PMSF; 1mM NaF; 1mM ortovanadato de sódio (Na₃VO₄)) por 30 minutos a 0°C e imediatamente utilizado no ensaio de pull-down. Os animais foram utilizados em acordo com as determinações do comitê de ética da UFPR.

4.6 – O ensaio de pull-down

O ensaio de pull-down foi realizado como descrito em Zanata (2002b).

Basicamente, as alíquotas de GTPases expressas, que estavam estocadas em freezer -80°C, foram incubadas cada uma com 30 µL de matriz Glutathiona-Sepharose 4B e incubadas por 1h a 4°C para a ligação das GST-GTPases com a matriz. A resina de Glutathiona-Sepharose foi precipitada por centrifugação 1 min 8000 rpm e lavada cinco vezes com tampão de ligação (250 mM NaCl; 200 mM Tris-HCl pH 7,4). A resina então foi incubada com o extrato de encéfalo de camundongo durante 2h a 4°C. Após incubação a matriz foi lavada cinco vezes com tampão de lavagem específico (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 1mM DTT; 1,5 mM MgCl₂; 5mM EDTA; 10% Glicerol; 0,1% Triton X-100; diluição em água Mili-Q). As proteínas foram desligadas da matriz por adição de tampão de amostra e fervura por 20 minutos a 90°C. A resina foi sedimentada por centrifugação a 500g 5 min e o sobrenadante analisado em SDS-PAGE 10%. As proteínas do gel foram então transferidas a uma membrana de nitrocelulose para análise em western blotting (os anticorpos utilizados estão especificados nas figuras).

4.7 – Anticorpos

Os anticorpos utilizados foram obtidos por Souza (2012) e estão discriminados em cada figura.

5 – Resultados

5.1 Expressão e purificação das GTPases

Foram realizados testes de condições de expressão para a GTPase RhoD. Os resultados obtidos foram estendidos a Rnd2, e as condições para Rnd1 e GST foram obtidas de Souza (2012) (Tabela 1).

	[] IPTG (mM)	tempo de expressão (h)
Rnd1	0,1	2
Rnd2	0,4	4
RhoD	0,4	4
GST	0,1	2

TABELA 1 – CONDIÇÕES DE EXPRESSÃO DAS GTPases
FONTE: Rnd1E GST (SOUZA, 2012); Rnd2 E RhoD, O AUTOR.

Para analisar a expressão das GST-GTPases deve-se resolver em SDS-PAGE os extratos bacterianos. A cultura que sofreu indução por IPTG deve apresentar, em seu padrão de bandas, uma banda correspondente à proteína codificada pelo inserto no vetor, ao passo que a cultura que não sofreu indução não apresentará essa banda. Nas figuras, a massa molecular correspondente à altura dessa banda estará destacada por um retângulo vermelho.

5.1.1 GST-RhoD

RhoD, assim como as demais GTPases, foi expressa como uma quimera proteica, em fusão com a proteína GST. A princípio, foi feito um teste da expressão de RhoD em oito clones, como visto na figura 4. Depois disso, foi feita uma tentativa de aperfeiçoar as condições da expressão alterando a concentração de IPTG e o tempo de indução. Para tanto, o clone 2 foi escolhido.

A concentração de IPTG que forneceu melhores resultados foi 0,4mM (ver figura 5). Essa concentração foi então utilizada para o teste de tempos de expressão.

Percebe-se que a expressão da GST-RhoD foi melhor nas condições de 0,4 mM de IPTG para indução, e tempo de indução igual a 4 horas (figura 6).

Essas condições foram utilizadas na expressão em larga escala (figura 7). Os eluatos foram combinados e congelados em freezer -20°C.

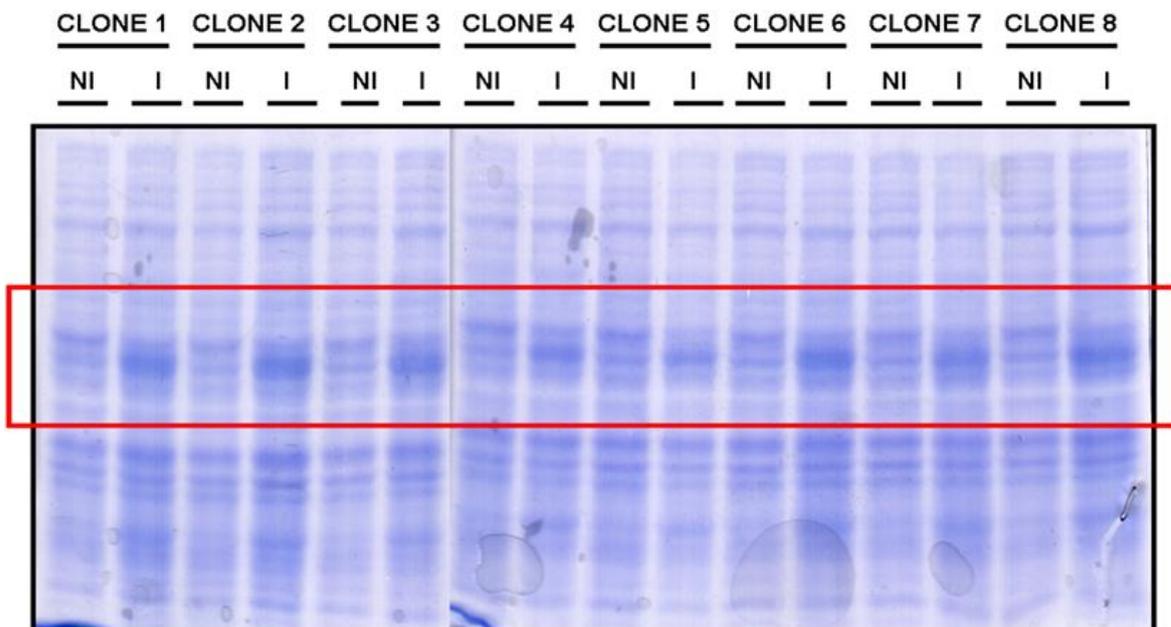


FIGURA 4 – MINIEXPRESSION INICIAL DE GST-RhoD
LEGENDA: NI, não induzido com IPTG; I, induzido com IPTG
FONTE: O AUTOR

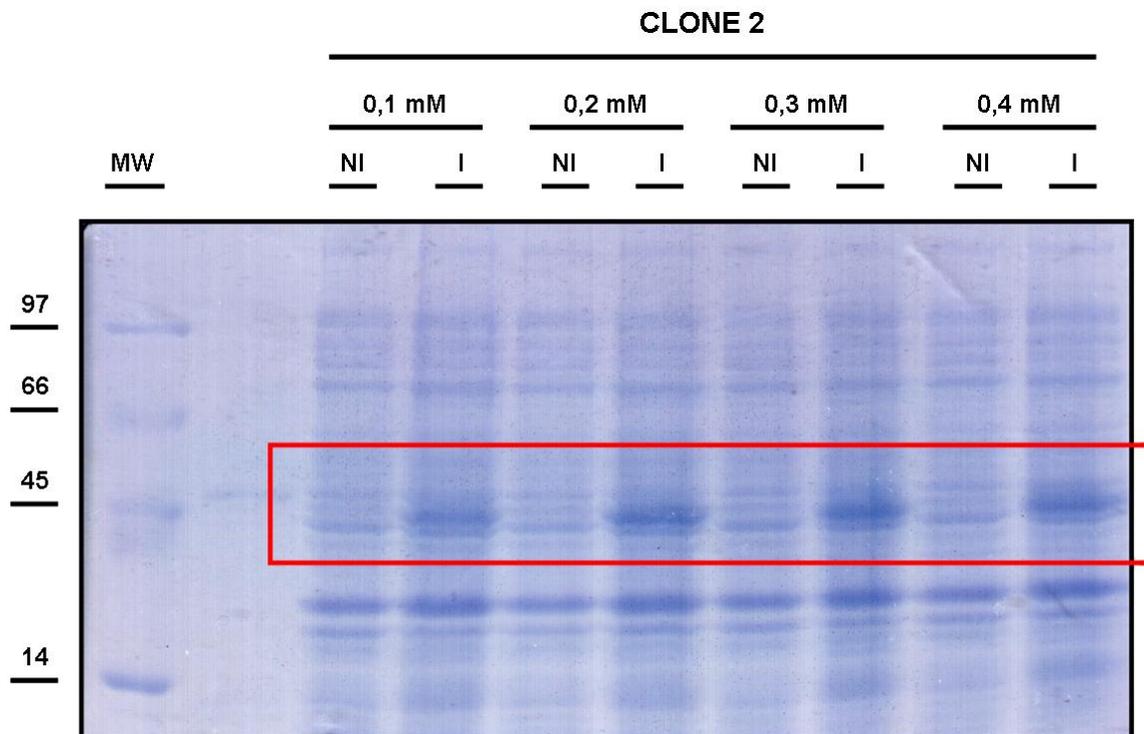


FIGURA 5 – MINIEXPRESSION DE GST-RhoD SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE IPTG
LEGENDA: NI, não induzido com IPTG; I, induzido com IPTG; 0,1 a 0,4mM, concentrações de IPTG; MW, massa molecular em kDa.
FONTE: O AUTOR

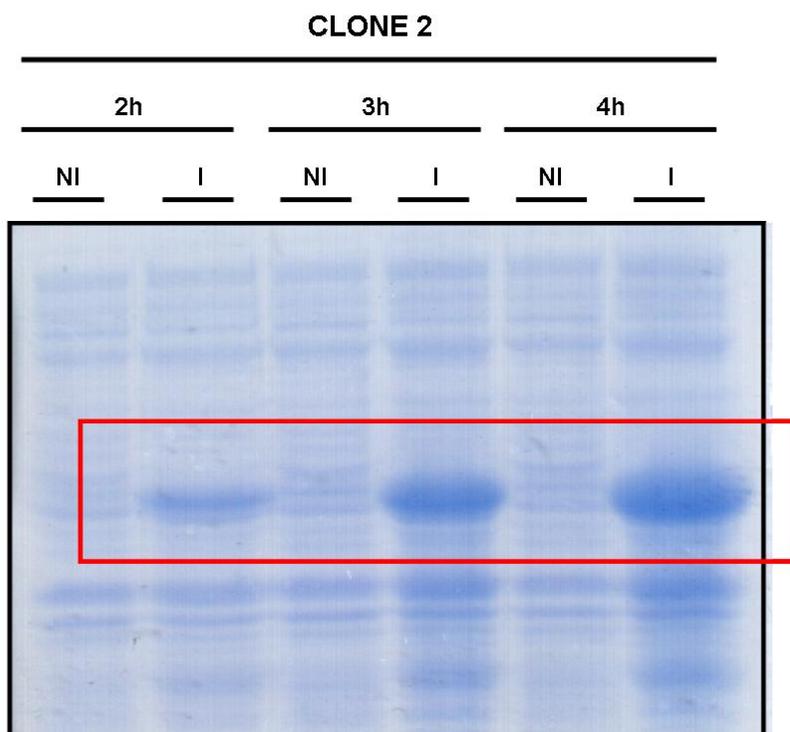


FIGURA 6 – MINIEXPRESSÃO DE RhoD SOB DIFERENTES TEMPOS DE EXPRESSÃO
LEGENDA: NI, não induzido com IPTG; I, induzido com IPTG
FONTE: O AUTOR



FIGURA 7 – EXPRESSÃO EM LARGA ESCALA E PURIFICAÇÃO DE GST-RhoD
LEGENDA: NI, não induzido com IPTG; I, induzido com IPTG; MW, massa molecular em kDa; VOID, extrato bacteriano após incubação com a matriz; RES, resina ou matriz após eluição; ELUATOS, frações líquidas eluídas da matriz.
FONTE: O AUTOR

5.1.4 GST-Rnd1

A proteína GST-Rnd1 já teve seu protocolo otimizado anteriormente por Souza, 2007. As condições utilizadas foram 0,1 mM IPTG e 2h de tempo de indução. O clone 6 da mini-expressão (figura 8) foi utilizado na expressão em larga escala (figura 9).

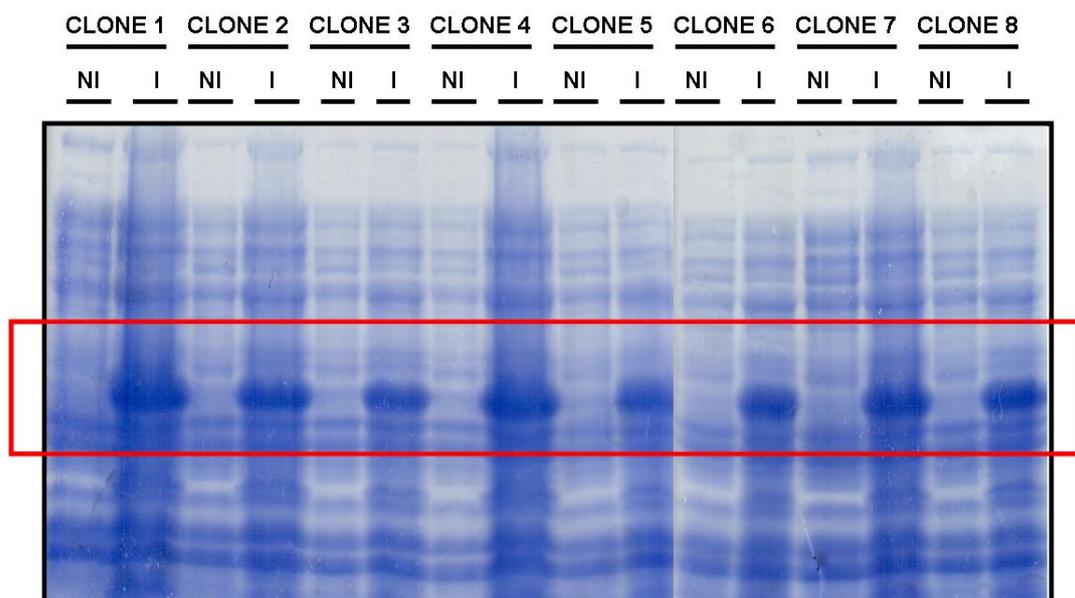


FIGURA 8 – MINIEXPRESSÃO DE GST-Rnd1

LEGENDA: NI, não induzido com IPTG; I, induzido com IPTG

FONTE: O AUTOR



FIGURA 9 – EXPRESSÃO EM LARGA ESCALA E PURIFICAÇÃO DE GST-Rnd1
LEGENDA: NI, não induzido com IPTG; I, induzido com IPTG; MW, massa molecular em kDa; VOID, extrato bacteriano após incubação com a matriz; RES, resina ou matriz após eluição; ELUATOS, frações líquidas eluídas da matriz.
 FONTE: O AUTOR

5.1.5 GST-Rnd2

A proteína GST-Rnd2 foi expressa sob 0,4mM IPTG por 4h a 30°C. A expressão e purificação foram bem sucedidas. Os eluatos foram armazenados separadamente em freezer -80°C.

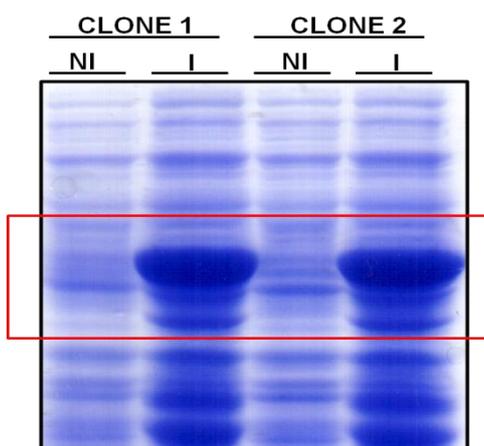


FIGURA 10 – MINIEXPRESSÃO DE GST-Rnd2
LEGENDA: NI, não induzido com IPTG; I, induzido com IPTG
 FONTE: O AUTOR

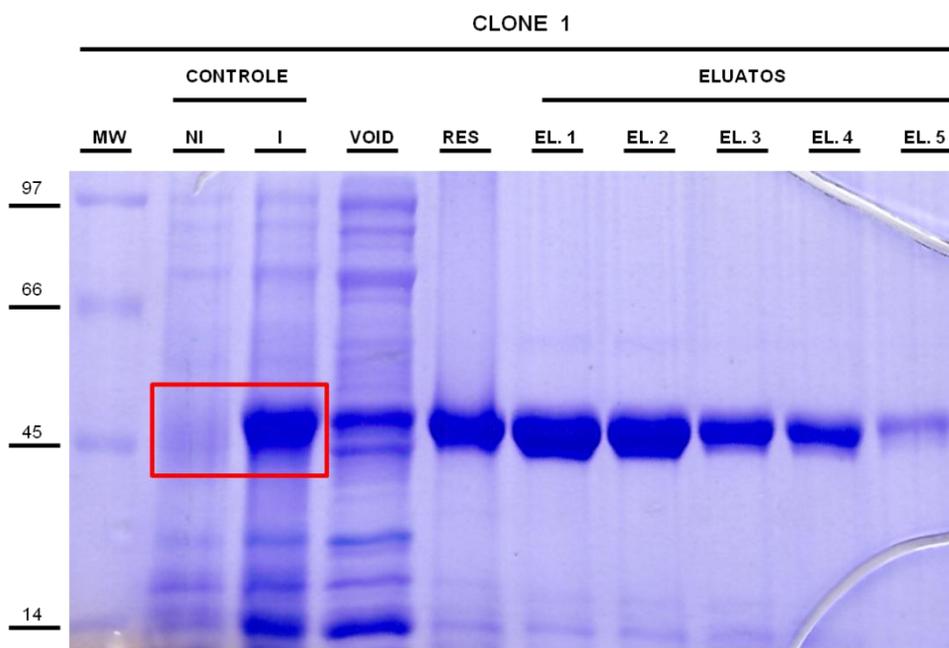


FIGURA 11 – EXPRESSÃO EM LARGA ESCALA E PURIFICAÇÃO DE GST-Rnd2
LEGENDA: NI, não induzido com IPTG; I, induzido com IPTG; MW, massa molecular em kDa; VOID, extrato bacteriano após incubação com a matriz; RES, resina ou matriz após eluição; ELUATOS, frações líquidas eluídas da matriz.
 FONTE: O AUTOR

5.1.6 GST

A proteína GST foi expressa sob 0,1 mM IPTG por 2h a 30°C. A partir do clone 1 foi realizada expressão em larga escala, mas não a purificação. O volume total do cultivo de bactérias (400mL) foi decantado por centrifugação, lisado em prensa de French (1000 psi) e ressuspenso em tampão de lise próprio para pull-down (ver materiais e métodos). O volume final (20 mL) foi aliqüotado e congelado a -80°C para os ensaios de pull-down.

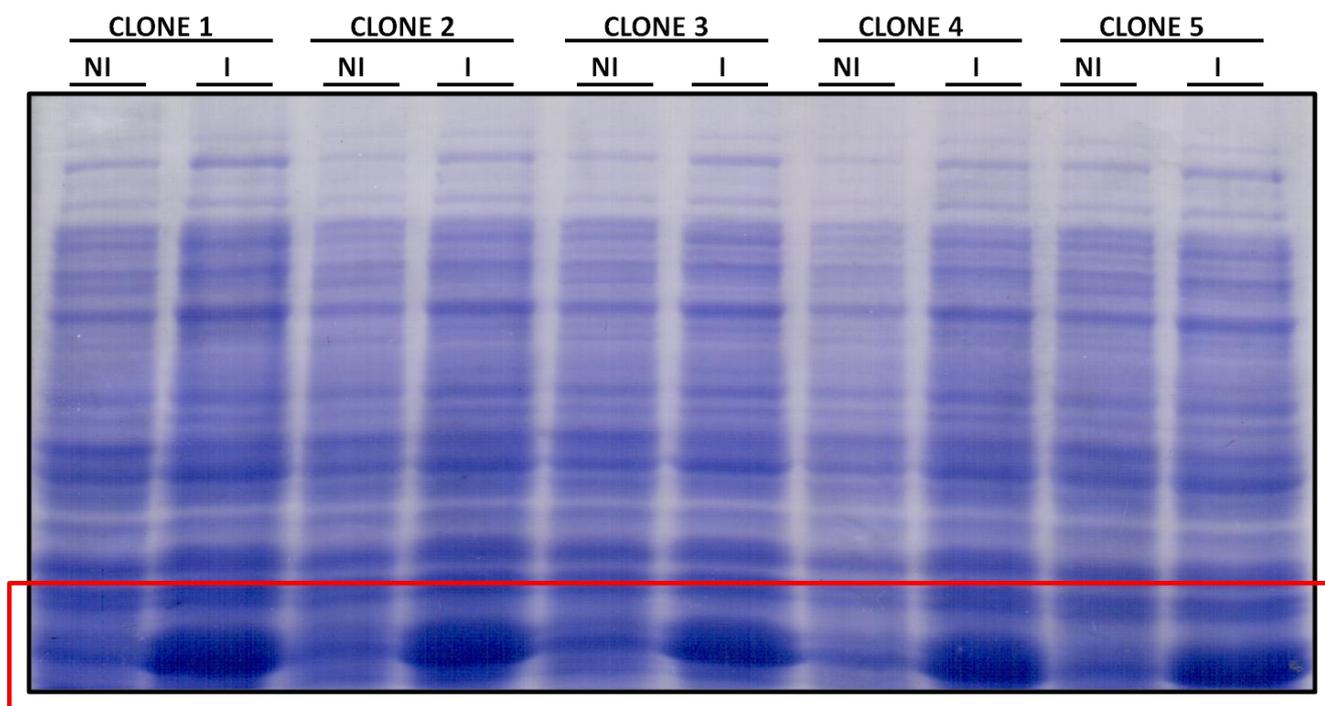


FIGURA 12 – MINIEXPRESSÃO DE GST

LEGENDA: NI, não induzido com IPTG; I, induzido com IPTG

FONTE: O AUTOR

5.2 Estimativa da concentração de proteína recombinante nos extratos bacterianos para ensaios de pull-down

Após a expressão em larga escala de todas as GTPases e de GST, as alíquotas de extrato bacteriano foram testadas quanto à concentração de proteína recombinante. A quantidade de resina Glutathione-Sepharose 4B utilizada, por volume de extrato, está descrita na tabela 2.

	volume de matriz (µL)	volume de extrato (µL)
Rnd1	30	500
Rnd2	30	1000
RhoD	30	1500
GST	30	150

TABELA 2 – VOLUME DE MATRIZ POR VOLUME DE EXTRATO

FONTE: O AUTOR

Após incubação e lavagens (ver materiais e métodos), as amostras foram aplicadas em gel para a comparação com uma curva de concentração de albumina sérica bovina (figura 13).

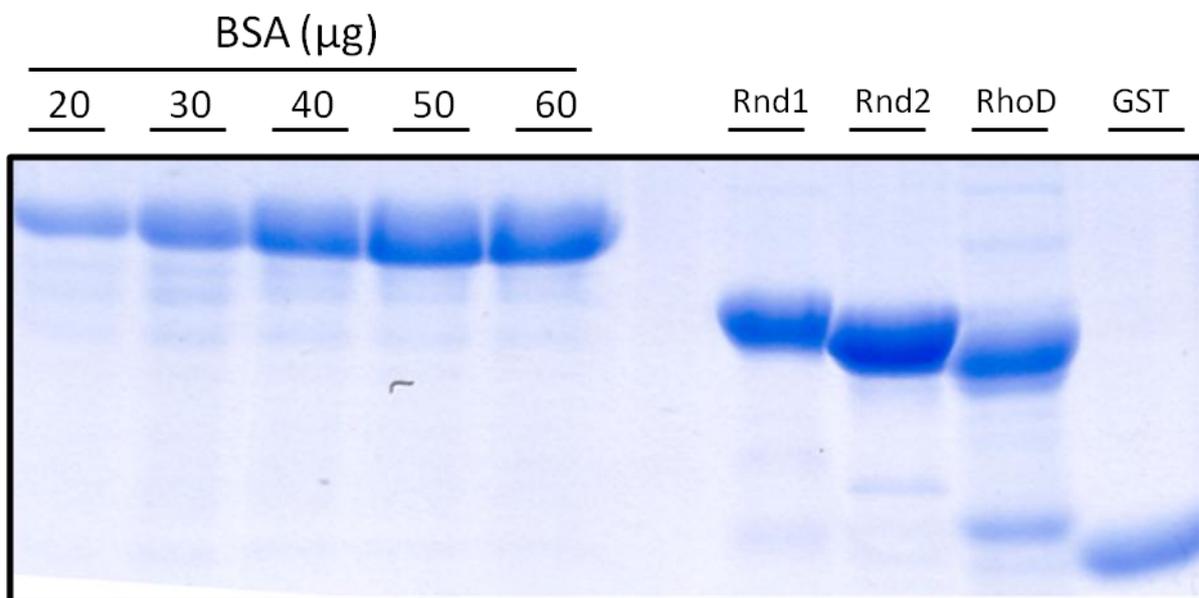


FIGURA 13 – TESTE DE CONCENTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

LEGENDA: BSA, Albumina sérica bovina

FONTE: O AUTOR

Em seguida foi feita uma estimativa visual das concentrações de proteína, descrita na tabela 3.

	[] g/L
Rnd1	0,1
Rnd2	0,06
RhoD	0,02667
GST	0,2

TABELA 3 – CONCENTRAÇÃO ESTIMADA DE PROTEÍNA RECOMBINANTE NOS EXTRATOS

FONTE: O AUTOR

A estimativa da quantidade de proteína foi utilizada, posteriormente, para aplicação de quantidades equivalentes no ensaio de pull-down. Dessa maneira, a proteína alvo (STI1) teve a mesma quantidade de proteína-isca para se ligar, em cada condição.

5.3 Pull-down

O ensaio de pull-down, como sugere o nome em inglês, consiste na co-precipitação de macromoléculas que estejam ligadas devido à sua interação, seja ela direta ou por moléculas intermediárias. A proteína GST, presente em todas as recombinantes, liga-se com grande afinidade a seu substrato, a glutationa reduzida (GSH), imobilizada na resina Glutaciona-Sepharose. A força da ligação GST-GSH é suficiente para sedimentar as proteínas recombinantes juntamente com as microesferas de matriz em suspensão. Qualquer proteína que interaja com a recombinante será também precipitada, desde que sua interação seja suficientemente forte.

As proteínas precipitadas são separadas do sobrenadante e resolvidas em SDS-PAGE seguido de western blot. As bandas mais intensas representam maior quantidade de proteína alvo (STI1) precipitada junto com a proteína isca (recombinantes).

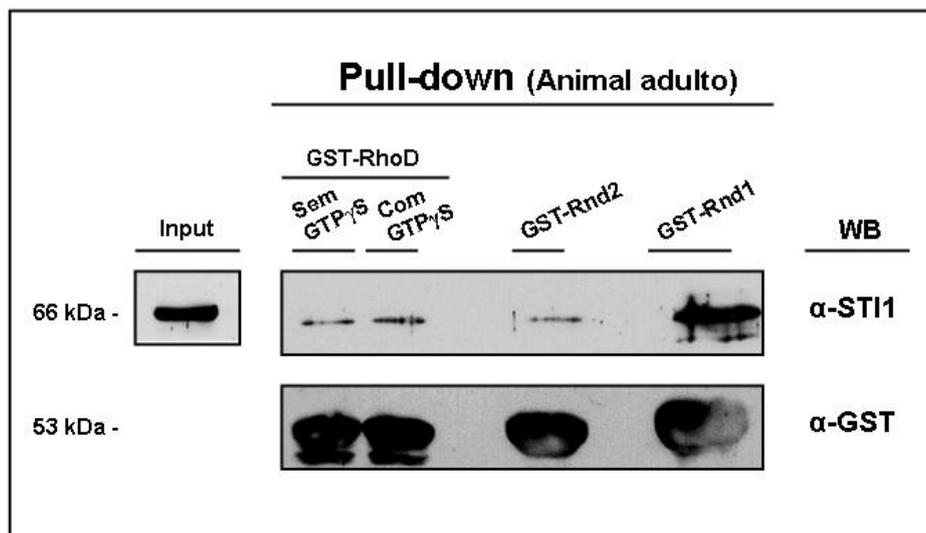


FIGURA 15 – PULL-DOWN I

LEGENDA – Input: 10 μ L de extrato de cérebro de camundongo adulto; GST, GST-RhoD, GST-Rnd2, GST-Rnd1: proteínas isca; GTP γ S: forma não hidrolisável de GTP; WB: western blot; α -STI1 e α -GST, anticorpos.

FONTE: O AUTOR

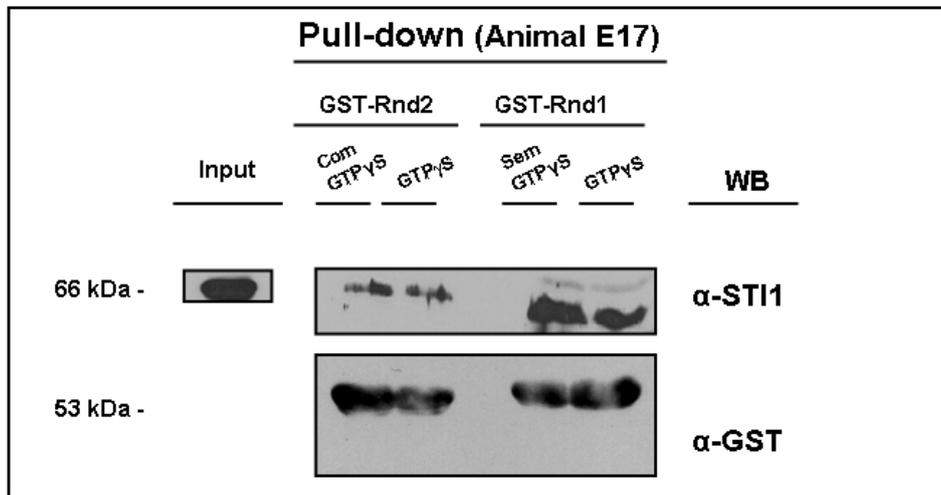


FIGURA 16 – PULL-DOWN II

LEGENDA – Input: 10 µL de extrato de cérebro de camundongo E17; GST, GST-Rnd2, GST-Rnd1: proteínas isca; GTPγS: forma não hidrolisável de GTP; WB: western blot; α-STI1 e α-GST, anticorpos.

FONTE: O AUTOR

6 – Discussão

6.1 Expressão e purificação das GTPases

Apesar da similaridade funcional entre as proteínas, observam-se diferenças na qualidade das expressões e purificações de cada GTPase utilizada. Tais diferenças são derivadas da variação de sequência polipeptídica entre cada uma delas, que, quando super-expressas pela célula bacteriana, geram variações bioquímicas nos produtos finais.

6.1.1 RhoD

As figuras 4, 5 e 6 mostram que foi válida a iniciativa de otimizar as condições de expressão de GST-RhoD. Embora os dados das figuras não tenham sido tratados quantitativamente, pode-se concluir, a partir da comparação das bandas destacadas das figuras 4 e 6, que as condições finais de expressão renderam quantidade significativamente maior de proteína recombinante.

Dessa maneira, a expressão em larga escala e a purificação da proteína alcançaram bons rendimentos, embora aquém das demais proteínas expressas. Na figura 7, a análise das canaletas não induzida (NI) e induzida (I) nos indica que a expressão foi tão boa quanto o esperado a partir da miniexpressão. O VOID nos mostra que, após a incubação da resina de Glutathione–Sepharose com o extrato bacteriano, quase nenhuma proteína recombinante restou no extrato (conclui-se isso, pois a banda maior, presente em I e ausente em NI, volta a desaparecer em VOID). Ou seja, a ligação GST-matriz se deu como o esperado. Já a análise da canaleta onde foi aplicada a resina (RES) nos indica que, após a eluição, restou proteína na fase sólida. Duas possibilidades podem explicar esse fato: ou a eluição não foi eficiente, e restou proteína ligada à matriz, ou a proteína recombinante tornou-se insolúvel no tampão de eluição, precipitando assim juntamente com a resina na etapa de centrifugação.

Foram feitos dois testes para abordar o problema da proteína insolúvel. Primeiro, repetimos o ensaio diluindo o extrato: partimos de um meio de cultivo com metade do volume original, e fizemos a lise no mesmo volume de tampão. Em seguida, utilizamos um tampão mais exigente: o dobro da concentração de glutathione reduzida. Ambos os testes foram realizados para averiguar, respectivamente, se: a proteína recombinante em fase sólida estaria precipitando por altas concentrações, ou a porção GST da proteína não estaria desligando-se da matriz. Os resultados obtidos por ambos os testes não diferiram do resultado mostrado na figura 7.

Situações como essa são comuns em purificações de grandes quantidades de proteína em *E. coli*, e há relatos na literatura sobre como contornar esse problema. Por exemplo, Macinkovic *et al.* (2013) abordaram-no trabalhando com proteínas quiméricas que foram corpos de inclusão (agregados proteicos insolúveis que precipitam na primeira etapa de centrifugação após a lise das bactérias). Esses pesquisadores mostraram que a adição de 2M ureia ao tampão de lise favorece a solubilidade da recombinante, mantendo níveis de até 85% de atividade da GST. Essa etapa será testada em nosso laboratório futuramente.

Nos eluatos de RhoD observam-se bandas bem marcadas na altura aproximada de 50kDa (esperado: GST 26kDa + RhoD 21kDa = 47kDa) e outras bandas na altura de 26 kDa, indicando provável degradação da proteína recombinante.

O vetor pGEX 4T2 codifica para a tradução do inserto ligado à GST. A sequência polipeptídica que une ambas as proteínas possui um sítio de clivagem por trombina, para facilitar a clivagem. Como no gel é observada uma banda na altura aproximada de GST, é possível que a bactéria possua uma enzima de hidrólise de ligações peptídicas que atue sobre sítio semelhante ao da trombina. Isso explicaria a presença de uma banda na altura esperada para GST. No entanto, se essa hipótese fosse admitida, seria esperado observar bandas na altura de GST também nas demais purificações, já que todas utilizaram a mesma cepa de *E. coli*.

Em síntese, a purificação de GST-RhoD foi satisfatória, e alíquotas da proteína estão à disposição para ensaios bioquímicos futuros.

6.1.2 Rnd1

A figura 8 nos mostra que as condições de expressão de Rnd1, obtidas de Souza_(2012), foram excelentes. Isto porque as canaletas I mostram uma grande banda, em comparação com NI, que não apresentam tal banda. Essa banda é referente à indução por IPTG, ou seja, trata-se do produto gênico do inserto no plasmídeo pGEX-4T2 (GST-Rnd1, no caso), regulado pelo operon *lac*.

Apesar de as condições terem sido repetidas na expressão em larga escala, a eficiência da expressão não foi tão boa quanto na miniexpressão (comparar figura 8, clone 6, com figura 9, NI e I). Isso se deve, provavelmente, a variações esperadas para cada repetição do experimento. Ainda assim, a ligação com a resina foi eficiente (figura 9, canaleta VOID: não restou proteína recombinante).

Surgiu, na purificação de GST-Rnd1, o mesmo problema ocorrido em GST-RhoD: há ainda muita proteína que permanece na fase sólida após a eluição. No caso de Rnd1, como se observa a partir da canaleta RES da figura 9, a quantidade de proteína presa à fase sólida é muito maior que em RhoD. Também foram testadas variações no tampão de eluição assim como diluição do extrato no tampão, sem resultados melhores. Portanto, para Rnd1 seria especialmente interessante aplicar uma etapa de ressolubilização com ureia, como explicado para RhoD. Em purificações futuras, será realizado tal procedimento.

Apesar de pouco concentrados em comparação com a resina, os eluatos de GST-Rnd1 não apresentaram concentrações detectáveis (pelo método de coloração por Coomassie) de proteína degradada.

Assim como para RhoD, purificação foi satisfatória, e alíquotas da proteína estão à disposição para ensaios bioquímicos futuros.

6.1.3 Rnd2

As condições de expressão de Rnd2 foram adotadas em semelhança às de RhoD. Analisando a figura 10 da mesma maneira que as miniexpressões

anteriores, vemos que o resultado foi bastante eficiente. A expressão em larga escala foi a melhor obtida neste estudo. Comparando NI e I da figura 11, vemos que a expressão pela bactéria foi muito boa. Em seguida, vemos que restou proteína recombinante na canaleta VOID (comparação VOID com NI), o que indica que a resina não capturou toda a GST-Rnd2 do extrato bacteriano. É possível que isso represente a saturação dos 300 µL de resina utilizados (mesmo volume das demais recombinantes). Ou seja, se houvesse sido utilizado maior quantidade de resina no extrato bacteriano de GST-Rnd2, poderíamos ter purificado maior quantidade de proteína, o que não ocorreria para as outras GTPases, já que seus VOIDs não apresentaram a banda da proteína recombinante.

Vemos, novamente, retenção da recombinante na fase sólida após a eluição (canaleta RES). Ainda assim, a concentração de proteína final nos eluatos foi muito expressiva. Observa-se pequena quantidade de proteína degradada na altura aproximada de 26 kDa (canaleta ELUATOS, figura 11).

Assim como para RhoD e Rnd1, purificação foi satisfatória, e alíquotas da proteína estão à disposição para ensaios bioquímicos futuros.

6.1.4 GST

A proteína GST não foi purificada por haver estoque suficiente no laboratório. Foi, no entanto, realizada a expressão em larga escala a partir das condições estabelecidas por Souza (2012). A miniexpressão demonstrou que tais condições foram adequadas (figura 12, comparação NI e I). O clone escolhido para a expressão em larga escala foi o que melhor expressou a proteína na miniexpressão: o primeiro (CLONE 1, figura 12).

Como descrito em materiais e métodos, o volume final de cultivo foi lisado em prensa de French e estocado em alíquotas de 1 mL.

6.2 Pull-down

O ensaio de pull-down demonstrou interação entre a proteína STI1 e a Rnd1. Embora STI1 tenha aparentemente ligado a GST, a ligação com Rnd1 foi visivelmente mais forte. Além disso, a comparação com as outras GTPases (Figuras 14 e 15) nos indica que Rnd1 é a que mais afinidade possui com STI1.

Dentre as muitas GTPases envolvidas com alterações de citoesqueleto, foram escolhidas RhoD e Rnd2 por suas características particulares. Segundo Zanata, 2002b, RhoD interage com a porção citoplasmática de plexina A1 de maneira antagônica à que Rnd1 interage. Essa interação seria uma das etapas da cascata de sinalização que induz ao colapso do cone de crescimento. Essa hipótese de antagonismo entre as GTPases foi estendida ao presente estudo, e RhoD foi selecionada como uma candidata a antagonista de Rnd1 também na interação com STI1 (apenas no sistema *in vitro*. Nenhum dado foi obtido acerca da interação RhoD-STI1 *in vivo*). Os resultados corroboraram essa hipótese: RhoD foi a proteína com menor ligação a STI1.

Por sua vez, Rnd2 foi escolhida por ser a proteína conhecida com maior similaridade de sequência a Rnd1 (54% de identidade). O intuito da inserção dessa GTPase foi testar a especificidade da interação STI1-Rnd1: se a proteína mais similar a Rnd1 não interage com STI1 com tanta afinidade, como foi demonstrado (figura 15), a interação bioquímica STI1-Rnd1 não pode ser atribuída a artefatos de técnica. Assim, tal interação e sua consequente função *in vivo* recebem apoio teórico para a caracterização detalhada dos seus efeitos biológicos, como visto em de Souza *et al.* (2014).

O ensaio de pull-down não garante que a mecânica de interação seja direta entre as proteínas. Entretanto, o ensaio de binding, realizado em de Souza (2014), mostra que há interação direta entre STI1 e Rnd1, sem proteínas intermediárias.

6.2.1 O primeiro ensaio de pull-down

A figura 14 mostra o ensaio de pull-down entre três GTPases e STI1. Vemos que a ligação mais forte ocorreu entre Rnd1 e STI1, e que praticamente não houve interação entre STI1 e RhoD ou Rnd2. A interação entre GST e STI1 carece de explicações, pois não há na literatura interação descrita para

essas proteínas. Podemos hipotetizar que a GST recombinante, não fusionada a uma GTPase, interaja com outras proteínas do metabolismo de *E. coli*, formando complexos proteicos pelos quais STI1 possua afinidade.

A utilização de GTP γ S é uma técnica para diferenciar a GTPase no seu estado ativo e inativo. Esta forma de GTP não é hidrolisável, de maneira que a GTPase, quando ligada a esta molécula, não poderá hidrolisá-la, mantendo-se assim permanentemente ativa. No caso de RhoD, como GTPase típica, é importante definir sua interação com STI1 em estado ativo ou inativo. Já no caso das Rnds, com baixa atividade GTPásica, é tendência que estejam constitutivamente ligadas a GTP. Entretanto é possível que, nas condições de expressão e purificação da proteína recombinante, ocorra o desacoplamento de GTP da proteína. Por essa razão, foi adicionado GTP γ S às Rnds.

Como mencionado na revisão bibliográfica, recentemente foi publicado um artigo relacionando STI1 e RhoC. Por não dispormos do vetor para a expressão de RhoC com tag de GST, essa molécula não foi incluída no trabalho. Será interessante, no futuro, repetir os ensaios incluindo RhoC entre as proteínas isca.

6.2.2 O segundo ensaio de pull-down

A figura 15 mostra a ligação de STI1 a Rnd1 e Rnd2. Nesse caso, para eliminar a hipótese de ativação variável das Rnds, foi adicionado GTP γ S a ambas. Como esperado, não houve mudança na afinidade de STI1. Observamos nessa figura que a afinidade maior de STI1 é por Rnd1, e corroboramos assim sua especificidade.

Deve-se ressaltar que, neste ensaio, a fonte de STI1 foi extrato de cérebro de embrião de camundongo aos 17 dias de gestação (E17). Esse fato é importante pois, no modelo de estudo, a interação Rnd1-STI1 ocorre no desenvolvimento do sistema nervoso. Assim, partimos do princípio que, em estágios embrionários, STI1 estivesse nas condições originais de ligação a Rnd1.

7 - Conclusão

- As condições de expressão das proteínas recombinantes foi aperfeiçoada, a partir de variações na concentração de IPTG e tempo de expressão.

- Três proteínas recombinantes (GST-RhoD, -Rnd1 e -Rnd2) foram expressas, purificadas e armazenadas para ensaios bioquímicos futuros.

- Quatro proteínas recombinantes (GST, GST-RhoD, -Rnd1 e -Rnd2) foram expressas e aliquotadas para ensaios de pull-down.

- Foram realizados dois ensaios de pull-down.

- Caracterizou-se interação específica entre Rnd1 e STI1.

Este trabalho mostrou, com sucesso, a interação específica entre a GTPase Rnd1 e a proteína STI1. Este fato está integrado com um conjunto maior de dados, que foram publicados em 2014, em artigo intitulado “STI1 antagonizes cytoskeleton collapse mediated by small GTPase Rnd1 and regulates neurite growth”, na revista *Experimental Cell Research* (Anexo). É o primeiro trabalho na literatura científica a abordar a interação entre as citadas proteínas, e demonstrar sua relevância biológica.

7.1 Perspectivas futuras

O delineamento de experimentos futuros está baseado em artigos recentes. Goh e Manser (2012) mostram que os efetores de Rnd1, 2 e 3 regulam a atividade destas prevenindo-as da degradação. Assim, pretendemos realizar uma curva da concentração de Rnd1 transfectada em HEK293, sozinha ou co-transfectada com STI1, sob a ação de drogas que inibam a síntese de proteínas (como a cicloheximidina).

Oinuma *et al.* (2012) mostraram um mecanismo de regulação para as Rnd que consiste em compartimentalização subcelular. Quando direcionadas aos lipid rafts, essas proteínas apresentam maior interação com seus efetores, enquanto no citoplasma essa interação é diminuída. Assim, pretendemos realizar um experimento que analise a presença de STI1 e Rnd1 em frações de

membrana, em especial nos lipid rafts, sob a ação de uma droga que desestabiliza os rafts (metil- β -ciclodextrina).

8 – Referências Bibliográficas

- Aoki, J., Katoh, H., Mori, K., & Negishi, M. (2000). Rnd1, a novel rho family GTPase, induces the formation of neuritic processes in PC12 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 278(3), 604–8. doi:10.1006/bbrc.2000.3842
- Goh, L. L., & Manser, E. (2012). The GTPase-deficient Rnd proteins are stabilized by their effectors. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(37), 31311–20. doi:10.1074/jbc.M111.327056
- Greene, L. a, & Tischler, a S. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(7), 2424–8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=430592&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Ishikawa, Y., Katoh, H., & Negishi, M. (2006). Small GTPase Rnd1 is involved in neuronal activity-dependent dendritic development in hippocampal neurons. *Neuroscience Letters*, 400, 218–223.
- Lopes, M. H., Hajj, G. N. M., Muras, A. G., Mancini, G. L., Castro, R. M. P. S., Ribeiro, K. C. B., ... Martins, V. R. (2005). Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neurogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(49), 11330–9. doi:10.1523/JNEUROSCI.2313-05.2005
- Luo, L. (2000). Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nature Reviews. Neuroscience*, 1(3), 173–80. doi:10.1038/35044547
- Mačinković, I. S., Abughren, M., Mrkic, I., Grozdanović, M. M., Prodanović, R., & Gavrović-Jankulović, M. (2013). Employment of colorimetric enzyme assay for monitoring expression and solubility of GST fusion proteins targeted to inclusion bodies. *Journal of Biotechnology*, 168(4), 506–10. doi:10.1016/j.jbiotec.2013.09.019
- Meldolesi, J. (2011). Neurite outgrowth: this process, first discovered by Santiago Ramon y Cajal, is sustained by the exocytosis of two distinct types of vesicles. *Brain Research Reviews*, 66(1-2), 246–55. doi:10.1016/j.brainresrev.2010.06.004
- Negishi, M., & Katoh, H. (2004). [Rho family GTPases as key regulators for neuronal network formation]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso. Protein, Nucleic Acid, Enzyme*, 49(3 Suppl), 331–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14976751>
- Negishi, M., & Katoh, H. (2005). Rho family GTPases and dendrite plasticity. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 11(3), 187–91. doi:10.1177/1073858404268768
- Oinuma, I., Kawada, K., Tsukagoshi, K., & Negishi, M. (2012). Rnd1 and Rnd3 targeting to lipid raft is required for p190 RhoGAP activation. *Molecular Biology of the Cell*, 23(8), 1593–604. doi:10.1091/mbc.E11-11-0900

- Silva, J. S & Dotti, C. G. (2002). Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis. *Nature Reviews Neuroscience*.
- Souza, L. E. R. (2012). UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ 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 de doutorado, Universidade Federal do Paraná
- Souza, L. E. R., Moura Costa, M. D., Bilek, E. S., Lopes, M. H., Martins, V. R., Püschel, A. W., ... Zanata, S. M. (2014). STI1 antagonizes cytoskeleton collapse mediated by small GTPase Rnd1 and regulates neurite growth. *Experimental Cell Research*, 324(1), 84–91. doi:10.1016/j.yexcr.2014.03.017
- Van Pelt, J., & Uylings, H. B. M. (2002). Branching rates and growth functions in the outgrowth of dendritic branching patterns. *Network (Bristol, England)*, 13(3), 261–81. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12222814>
- Wherlock, M. (2002). The Rho GTPase family : a Racs to Wrchs story. *Cell Science*, 239–240.
- Willmer, T., Contu, L., Blatch, G. L., Edkins, A. L. (2012). Knockdown of Hop downregulates RhoC expression, and decreases pseudopodia formation and migration in cancer cell lines. *Cancer letters*
- 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. *Journal of Neuroscience*, 22(2), 471–477. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11784792>
- Zanata, S. M., Lopes, M. H., Mercadante, A. F., Hajj, G. N. M., Chiarini, L. B., Nomizo, R., ... Martins, V. R. (2002). Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *The EMBO Journal*, 21(13), 3307–16. doi:10.1093/emboj/cdf325