

CECÍLIA MIDORI IKEGAMI

**PRODUÇÃO DE BIOFERRAMENTAS PARA O ESTUDO
DAS PROTEÍNAS SEMAFORINA 5B E QSOX**

Dissertação de mestrado apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular, Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná

Orientador:

Prof Dr Sílvio Marques Zanata

Co-orientadora:

Prof^a Dr^a Lia Sumie Nakao

CURITIBA

2006

AGRADECIMENTOS

À minha família por todo apoio, por estar sempre presente e que faz a vida valer a pena

A todos os meus amigos Maria, Júnior, Rafael, Letícia, Rose, Juliana, Sílvia, Taís, Tomie, Mari pela força, amizade sincera e incentivo

Aos meus orientadores Sílvio Marques Zanata e Lia Sumie Nakao primeiramente pela amizade inesperada, orientação, por me ter concedido esta oportunidade e assim tornar esse trabalho possível. Também devo a vocês o aprendizado e gosto pela pesquisa

A meus novos amigos da pós-graduação: pela ajuda, debates e troca de idéias interessantes, companheirismo e bons momentos compartilhados

Ao professor Sílvio Sanches Veiga pela colaboração, por disponibilizar materiais, e seu laboratório para que eu fizesse parte de meu trabalho. Sem a sua colaboração os nossos experimentos não teriam sido os mesmos.

Ao pessoal do laboratório de neurobiologia: Luís, Michele, Aline, Kathya, Elizabeth, Walquíria, Ricardo, Gabriel pelo auxílio, “quebra-galhos”, discussões, e companhia

Aos alunos do laboratório de matriz extracelular pela grande ajuda, em especial à Márcia Appel e Olga Meire Chaim. A vocês devo parte considerável do meu conhecimento sobre as técnicas empregadas no laboratório.

À professora Adriana Mercadante pelo auxílio na finalização do meu trabalho com Semaforinas, pela atuação como *referee*, essencial na revisão desta dissertação. Pela prontidão em nos auxiliar, pelos conselhos e por partilhar suas experiências

Ao professor Emanuel Maltempi de Souza pela pronta disposição em sanar dúvidas, pela acessibilidade e dicas

Aos professores Stênio Perdigão Fragoso e Cláudia Nunes Duarte dos Santos pela colaboração, atenção, e pela ajuda nos experimentos de Semaforina 5B

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1 INTRODUÇÃO	1
2 JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS	32
3 METODOLOGIA	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5 PERSPECTIVAS PARA OS PROJETOS DE SEMA5B E QSOX	82
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
7 ANEXOS	98

APRESENTAÇÃO

Este trabalho foi conduzido com a realização de dois projetos distintos: um focado no estudo da proteína Semaforina 5B e outro na proteína Quiescina Sulfidril Oxidase (QSOX)

Embora estas proteínas não estejam a princípio relacionadas, ambas são ubíquas e estão presentes em variados sistemas biológicos. Contudo, os papéis específicos desempenhados por estas proteínas são desconhecidos.

A fim de se esclarecer particularidades de Sema 5B e QSOX, bioferramentas foram produzidas e utilizadas em alguns ensaios. Para tal finalidade, empregaram-se técnicas semelhantes para o estudo de ambas proteínas.

Para tornar a leitura mais inteligível, esta dissertação apresenta divisões que são destinadas à separação da descrição e resultados obtidos para cada proteína contendo em alguns trechos a interpolação desses assuntos distintos.

Ao longo desta dissertação, foi descrito como as bioferramentas foram produzidas e os ensaios que empregaram esses reagentes. No final está incluída uma perspectiva que propõe e descreve aplicações para os mesmos, demonstrando a colaboração deste trabalho integrado a outros experimentos na resolução e esclarecimento de hipóteses produzidas. Também evidencia alguns trabalhos que poderão ser realizados a partir deste “ponta pé” inicial que as técnicas padronizadas e resultados obtidos tornaram possíveis.

Espero, caros leitores, que eu consiga transmitir para vocês um pouco do conhecimento adquirido durante a elaboração desta dissertação. Boa leitura!

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	resíduos de aminoácido
ALR	<i>Augmenter Liver Regeneration</i>
bp	pares de base
C.N.S	<i>central nervous system</i>
CSPG	proteoglicanas portando condroitin sulfato
DTT	ditiotreitól
ERK	quinases reguladas por sinais extracelulares
ERV	<i>Essencial for Respiration and Viability</i>
FAD	flavina-adenina dinucleotídeo
GEF	<i>Guanine Exchange Factors</i>
GSH	glutathiona
GST	glutathiona S-transferase
GPI	glicosilfosfatidilinositol
HRP	peroxidase de raiz forte
HSPG	proteoglicana do tipo heparan sulfato
IgG	Imunoglobulina G
NEM	N-etilmaleimida
Nrp	neuropilina
ORF	fase de leitura aberta
PBS	salina tamponada com fosfato
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonil
QSOX	Quiescina Sulfidril Oxidase
RGD	seqüência de aminoácidos arginina, glicina, asparagina
Sema	semaforina
S.N.	Sistema Nervoso
S.N.C	Sistema Nervoso Central
TBST	salina tamponada com Tris contendo Tween-20

TRX tioredoxina
TSP trombospondina

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi produzir reagentes específicos para estudar as proteínas Semaforina 5B e QSOX. As semaforinas constituem uma grande família de proteínas solúveis, transmembrânicas ou ancoradas à membrana celular; são ubíquas e descritas em vários sistemas biológicos. Até o momento já foram descritas pelo menos 20 Semas as quais encontram-se enquadradas em 8 classes diferentes. Entre as semaforinas de vertebrados, Semas classe 5 são constituídas por proteínas transmembrânicas que possuem no domínio extracelular 7 repetições do tipo TSP em adição ao domínio Sema. Contudo, os papéis específicos desempenhados pelos membros pertencentes às Semas classe 5 são pouco conhecidos, em especial Sema5B. QSOX são flavoenzimas que catalisam a oxidação de grupos sulfidríla a dissulfetos com a redução do oxigênio molecular a peróxido de hidrogênio, e são compostos de 2 domínios distintos: um domínio N-terminal Trx e um domínio próximo à região C-terminal homóloga à ERV1p de levedura. Estas oxidases são encontradas em uma ampla variedade de tecidos em várias espécies, e parecem desempenhar papéis importantes no dobramento protéico oxidativo. No entanto, desconhece-se as reais funções desempenhadas por Sema5B e QSOX e a regulação da expressão destas proteínas. Na tentativa de se elucidar algumas das funções desempenhadas por estas proteínas, produziu-se ferramentas que podem auxiliar no estudo de Sema5B e QSOX. Tais ferramentas incluíram a expressão heteróloga destas moléculas, a produção de anticorpos policlonais contra estes antígenos e o emprego destes anticorpos em ensaios bioquímicos e de localização tecidual. Demonstrou-se com essas bioferramentas a presença de QSOX no soro fetal bovino, e a expressão de Sema5B no S.N. que possivelmente encontra-se na forma de zimogênio *in vivo*. Adicionalmente ensaios de imunohistoquímica e novas subclonagens de Sema5B estão em andamento.

ABSTRACT

The aim of this work was to produce specific reagents to study Semaphorin 5B and QSOX proteins. Semaphorins constitute a large family of soluble and membrane-bound proteins originally identified in several biological systems. To date more than 20 Sema members have been identified and split into 8 individual classes. Amongst the vertebrate semaphorins class 5 Sema is constituted by transmembrane proteins that have an unusual pairing of domains; their extracellular domain contains 7 thrombospondin repeats in addition to the Sema domain. Although many reports have addressed the function of several semaphorins there are few data concerning to semaphoring class 5 biological functions, especially Sema5B. QSOXs are flavoenzymes that catalyze the oxidation of dithiols to disulfides with the reduction of oxygen to hydrogen peroxide, and are composed of two distinct domains, an N-terminal Trx domain and a C-terminal catalytically active yeast ERV1 domain. These oxidases are found in a large variety of tissues in many species, and they are likely to play an important role in oxidative protein folding. In fact, very little is known about the functions that these oxidases have in the cell and about the regulation of the QSOXs. In order to investigate possible roles and regulation of Sema5B and QSOXs, we expressed them as recombinant proteins, raised polyclonal antibodies in rabbits and carried out some biochemical assays. We demonstrated that QSOX is present in fetal bovine serum, and the expression of Sema5B in C.N.S. – apparently this protein is a zymogen. Additionally immunohistochemical assays and other subcloning of distincts domains of Sema5B are being carried out.

1 Introdução

1.1 Ontogenia e moléculas envolvidas no desenvolvimento do Sistema Nervoso

O desenvolvimento da estrutura altamente ordenada do Sistema Nervoso envolve uma variedade de interações entre células neuronais e seu ambiente local.

O sistema nervoso central (S.N.C.) é composto principalmente de neurônios e células gliais que derivam de uma região especializada da ectoderme chamada de placa neural. Esta região sofre diferenciação sob a influência de sinais indutivos que emanam da mesoderme e mesoderme axial, placa pré-cordal e notocorda. A placa neural se fecha sobre a influência destes sinais para formar o tubo neural. O tubo neural é composto de uma camada de células neuroepiteliais que encerram uma cavidade, que constituirá o futuro sistema ventricular do cérebro. Os progenitores das células neuronais proliferam principalmente nas zonas ventriculares e subventriculares do tubo neural e migram para colonizar zonas superficiais/corticais do tubo neural (CASTRO, 2003).

Mecanismos de regionalização controlam diferentes taxas de proliferação e diferenciação das células do neuroepitélio, que originarão as diferentes áreas especializadas e diversidade de células neuronais encontradas no S.N.C. maduro. Exceção feita às células da microglia que possuem origem hematopoiética. Um padrão extremamente preciso de conexões é formado entre os neurônios (10^{15} contatos sinápticos são encontrados no cérebro humano) para que o S.N. maduro adquira sua configuração final e possa realizar as funções a ele atribuídas. Essa conectividade precisa é estabelecida durante o desenvolvimento embrionário e início do desenvolvimento pós-natal pela migração neuronal e estabelecimento ou não de contatos sinápticos (CASTRO, 2003).

Durante a embriogênese, neurônios estendem processos que navegam até seus alvos, normalmente encontrados a grandes distâncias do corpo celular. Estes

processos são responsáveis pelo envio de informações de um neurônio para o outro e são denominados axônios.

A informação que direciona o crescimento axonal é captada e interpretada por uma estrutura sensorial altamente móvel localizada na extremidade mais distal do axônio, nomeada de cone de crescimento (figura 1). 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).

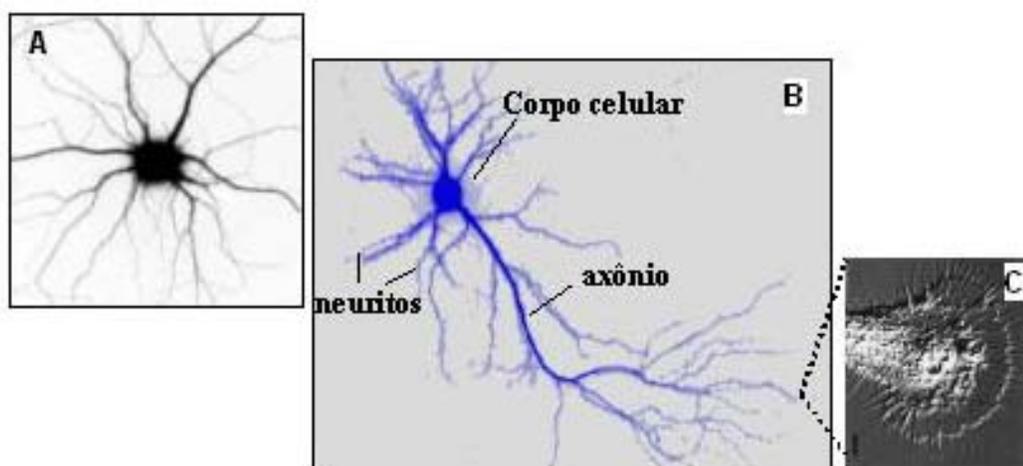


Figura 1: Fotografias de neurônios demonstrando suas principais estruturas. Em A tem-se a imagem obtida em contraste de fase de um neurônio hipocampal. Neste estágio todos neuritos têm aproximadamente o mesmo comprimento. Dentro de poucas horas um destes processos se alongará mais rapidamente do que os outros e se tornará um axônio. Em B visualiza-se um neurônio estrelado com os processos celulares definidos e em C observa-se a estrutura sensorial altamente móvel localizada na extremidade do axônio – o cone de crescimento – apresentado em um aumento maior.

Fonte: <http://devbio.Stanford.ed/overview.html>; www.learner.org

Desta forma as células neuronais são capazes de detectar e responder a moléculas encontradas no ambiente celular e assim selecionar os alvos e contatos corretos pela percepção do ambiente. Neste contexto a navegação axonal possui muitas semelhanças com a migração celular, pois ambas compartilham mecanismos moleculares governados por moléculas quimiotrópicas. Essas moléculas atuam como quimioatraentes quando atraem ou criam ambientes permissivos ao crescimento axonal. Entretanto tais moléculas podem atuar como quimiorepelentes

ou como sinais inibitórios que desviam os axônios de vias e alvos inapropriados, levando ao arranjo apropriado dos axônios e a correta conectividade formada entre os neurônios (OSTER *et al.*, 2003). Muitas destas interações são realizadas com glicoproteínas de superfície celular e componentes da matriz extracelular, que auxiliam na regulação de eventos chave no sistema nervoso em desenvolvimento: migração da célula neuronal, navegação axonal e formação de sinapses (RANSCHT B., 2000).

Um grande número de moléculas sinalizadoras e seus respectivos receptores, que guiam os axônios para alvos apropriados, tem sido identificado em diferentes sistemas e em vários tipos de organismos (MUELLER, 1999).

Muitas daquelas 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 mais importantes famílias de moléculas sinalizadoras e receptoras que regulam o direcionamento axonal encontram-se os receptores do tipo tirosinoquinase (SCHLESSINGER *et al.*, 2000) e tirosino-fosfatase (STOCKER *et al.*, 2001), as moléculas de adesão celular pertencentes à família das imunoglobulinas (KAMIGUCHI & LEMMON, 2000), as caderinas (RANSCHT *et al.*, 2000), as plexinas e neuropilinas, consideradas como receptores prototípicos de semaforinas (TAMAGNONE & COMOGLIO, 2000), as semaforinas (WIT & VERHAAGEN, 2003), as netrinas e os receptores de netrinas (KENNEDY *et al.*, 2000; PUSCHEL *et al.*, 1999) e a família Robo e os seus receptores (GINGER & KOLODKIN, 2001).

1.2 Semaforinas: uma família de proteínas envolvidas 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 permite o encontro correto entre processos neuronais e alvos específicos do sistema nervoso.

Dentre estas moléculas, as semaforinas pertencem a uma grande família de proteínas secretadas ou associadas à membrana. Vários membros desta família de proteínas estão envolvidos na navegação axonal, fasciculação, ramificação e formação de sinapses atuando como inibidores ou quimiorrepelentes (OSTER *et al.*, 2003; Terman *et al.*, 2002). Porém estudos recentes indicam que as semaforinas podem influenciar a navegação axonal realizando quimioatração (WONG *et al.*, 1999, POLLEAUX *et al.*, 2000; PASTERKAMP *et al.*, 2003; JULIEN *et al.*, 2005). Todas as semaforinas contém um domínio amino terminal extracelular de cerca de 500 resíduos de aminoácidos nomeado domínio semaforina (Sema) contendo 17 resíduos de cisteínas altamente conservadas e uma região carboxi terminal classe-específica que pode conter motivos adicionais. Semaforinas também diferem com respeito à sua topologia, podendo ser secretada, transmembrânica ou ancoradas à superfície celular por glicosilfosfatidilinositol – GPI-linked (RAPER, 2000).

Estas características estruturais juntamente com a análise filogenética, permitiram até o momento a designação de 8 classes de semaforinas (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. Em vertebrados, semaforinas classe 4 a 6 são proteínas transmembrânicas; semaforinas classe 3 são proteínas secretadas e a semaforina classe 7 é semelhante à semaforina classe 3, porém está ancorada à superfície celular através de uma ligação por âncora de GPI (figura 2) (Semaphorin Nomenclature Committee, 1999).

Trabalhos mais recentes (PASTERKAMP *et al.*, 2003) demonstraram a existência *in vivo* de uma semaforina classe 7, Sema 7A, tanto ancorada à membrana por GPI como na forma solúvel.

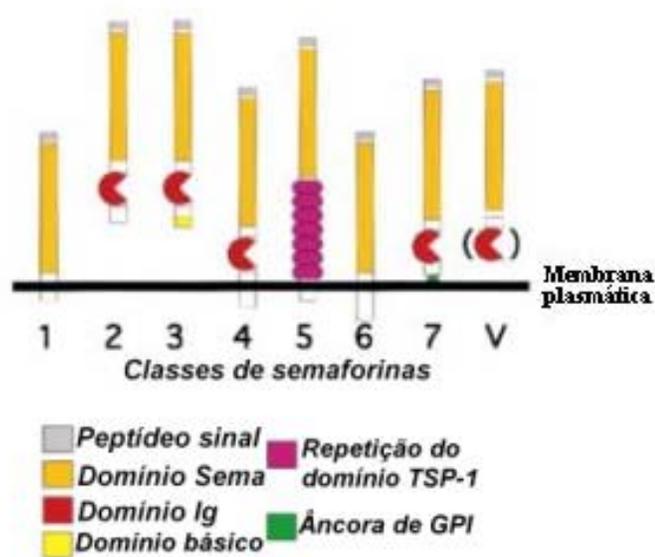


Figura 2: Representação esquemática da família de proteínas Semaforina. As 8 classes estão representadas conforme a topologia e domínios conservados na seqüência protéica. As classes 1 e 2 são encontradas em invertebrados; classes 3 a 7 em vertebrados e classe V engloba semaforinas virais. As semaforinas 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).

1.2.1 Os diferentes papéis funcionais desempenhados pela família Semaforina, seus receptores e parceiros moleculares

A família Sema inclui pelo menos 20 membros diferentes em vertebrados e 3 em invertebrados. Até o presente momento, as semaforinas foram descritas como moléculas ligantes que atuam sobre determinados receptores como as plexinas, neuropilinas, receptor tirosino-kinase Met, CD-72, Tim-2, integrina e moléculas de adesão da superfamília das imunoglobulinas (CASTELLANI *et al.*, 2000; WIT & VERHAAGEN, 2003; JULIEN *et al.*, 2005). Porém, há evidências de que Semas poderiam realizar sinalização bidirecional e atuar também como moléculas receptoras a exemplo das efrinas (Ephrins) e receptores Eph, isto é, algumas Semas

transmêmbranicas poderiam atuar como moléculas ligantes e receptoras (GODENSCHWEGE *et al.*, 2002; TOYOFUKU *et al.*, 2004). A sinalização bidirecional envolve a ativação mútua de vias de sinalização em ambas células que estão interagindo, semelhante ao observado durante a ativação de linfócitos T CD4⁺ por células apresentadoras de antígeno (JANEWAY *et al.*, 2001).

A conservação estrutural do domínio Sema sugere que este seja o elemento chave sinalizador das semaforinas (OSTER *et al.*, 2003; KANTOR *et al.*, 2004; JULIEN *et al.*, 2005).

As semaforinas foram originalmente identificadas em invertebrados (KOLODKIN *et al.*, 1992). Sema3A, o membro protótipo da família semaforina é encontrado em vertebrados, e foi inicialmente purificado a partir de extratos de cérebro de galinha. Observou-se que Sema3A induzia o colapso dos cones de crescimento de raízes ganglionares dorsais (DRG) em cultura. Desde a identificação de Sema3A há mais de uma década, a descoberta e descrição de novos membros levaram a uma rápida expansão desta família de moléculas envolvidas no direcionamento axonal.

Inicialmente as semaforinas foram relacionadas à navegação axonal; entretanto há trabalhos demonstrando a participação de semaforinas na maturação das células do sistema imune, organogênese, vascularização e angiogênese, além de um possível envolvimento na progressão de certos tumores (WIT & VERHAAGEN, 2003).

Os membros mais conhecidos e estudados pertencem à semaforinas classe 3, que são proteínas secretadas. Semaforina 3A (Sema3A), é sintetizada como um precursor inativo, tornando-se repulsiva para neuritos sensoriais e simpáticos após processamento proteolítico (ADAMS *et al.*, 1997). Contudo, Sema3C, outra proteína da mesma família, pode atuar tanto repulsivamente (para axônios simpáticos) quanto como fator atrativo (para axônios corticais) (BAGNARD *et al.*, 1998; ADAMS *et al.*, 1997). Assim, como netrinas (PÜSCHEL *et al.*, 1999;

MUELLER *et al.*, 1999; TESSIER-LAVIGNE & GOODMAN, 1996), semaforinas podem ter uma função quimiotrófica dual e dependente do tipo celular.

Recentemente foi demonstrado que Sema3B é capaz de atrair axônios de neurônios encontrados na comissura anterior – que é uma estrutura encontrada na maior projeção comissural cerebral (JULIEN *et al.*, 2005).

Também foi demonstrado que Sema1a, molécula transmembrânica expressa em invertebrados, pode perturbar a navegação axonal *in vivo* quando apresentada como um fator solúvel. Sema1a é expressa em bandas nas células epiteliais dos membros de gafanhotos em desenvolvimento e é uma das moléculas que direcionam o crescimento de axônios Ti I. A superexpressão ectópica de Sema1a permitiu a extensão de axônios Ti I em regiões que normalmente seriam evitadas, sugerindo que Sema1a possa tornar um ambiente não permissivo ao crescimento axonal (repelente) em permissivo (WONG *et al.*, 1999)

Pasterkamp *et al.*, 2003, verificou que Sema7A estimula a formação do trato olfatório lateral, que é um feixe de fibras axonais que se origina no bulbo olfatório e realiza a conexão entre epitélio e córtex olfatório. Experimentos demonstraram que o tamanho e o número de axônios do bulbo olfatório, bem como o diâmetro do trato olfatório lateral aumentaram quando explantes do bulbo olfatório foram cultivados com agregados celulares secretores de Sema7A.

Polleaux *et al.*, 2000 demonstrou que Sema3A pode atuar como quimiorepelente e quimioatraente sobre os processos celulares de um mesmo neurônio, isto é, Sema3A pode atuar como quimiorepelente para o axônio e quimioatraente para o dendrito apical do mesmo neurônio. Este efeito foi visualizado em neurônios piramidais. Estes neurônios integram informações das camadas corticais superficiais e convertem essa informação a vários alvos corticais e subcorticais.

Especula-se que a atração ou repulsão mediada por semaforinas é especificada por componentes do complexo receptor, eventos a montante ao

receptor, ou interação do ligante com outras moléculas (WONG *et al.*, 1999; CASTELLANI & ROUGON *et al.*, 2002).

No sistema imune de vertebrados, CD-72 pode atuar como um receptor para Sema4D, e Tim-2 transduz respostas de Sema4A em células-T (VIT & VERHAAGEN, 2003).

Semaforina 6D está envolvida na morfogênese cardíaca. Sema6D atua de forma atrativa sobre células do segmento conotruncal – estimula a migração destas células que expressam o complexo receptor Plexina A1 e o fator de crescimento vascular endotelial (VEGFR 2). Além disso, Sema6D exerce atividade inibitória impedindo a migração celular das células ventriculares cardíacas que expressam o complexo receptor Plexina A1 e Off-track (TOYOFUKU *et al.*, 2004)

É sabido que Sema3A ativa um complexo protéico situado na superfície das células que contém neuropilina 1 (Nrp-1) como a sub-unidade responsável pela interação com o ligante e plexina como a sub-unidade responsável pela transdução de sinal (TAKAHASHI *et al.*, 1999; TAMAGNONE *et al.*, 1999; TAMAGNONE & COMOGLIO, 2000; ROHM *et al.*, 2000; ZANATA *et al.*, 2002).

Demonstrando a importância da proteína plexina A1 na mediação da repulsão provocada por Sema3A, experimentos do grupo de Püschel (Rohm *et al.*, 2000) que utilizaram células transfectadas com vetores de expressão para neuropilina-1 e plexina, e adição de Sema3A ao cultivo, induziram o colapso das células transfectadas, resultando na contração do corpo celular que permaneceu conectado ao substrato somente por fibras de retração. Ainda, Sema3A não desencadeou efeitos semelhantes em células que expressam somente neuropilina-1 ou plexinas mutantes, sendo que estas não possuem a região citoplasmática; mostrando que a subunidade transdutora de sinal é a plexina, sugerindo que a última pode regular diretamente a atividade de pequenas GTPases.

Recentemente, integrinas foram descritas como receptores para Sema7A, que induz crescimento axonal olfatório sem o requerimento de plexinas. Pasterkamp e colaboradores (2003) verificaram que o domínio semaforina de Sema7A contém a

seqüência ligante de integrina (RGD). Ensaios de bloqueio com o uso de inibidores e anticorpos anti- $\beta 1$ demonstraram que integrinas contendo especificamente a subunidade $\beta 1$ medeia os efeitos promotores do crescimento de Sema7A. As $\beta 1$ integrinas podem constituir os receptores obrigatórios que se associam com proteínas ligantes de Sema 7A ainda não identificados.

Outras Semaforinas (3C e 4G) possuem os motivos conservados (RGD) ligantes de integrina, sugerindo que interações adicionais Sema-integrina possam existir.

As plexinas pertencem a um grupo de proteínas que possuem o domínio semaforina, a qual também estão incluídas as próprias semaforinas e alguns tipos de receptores do tipo tirosino-quinase (BORK *et al.*, 1999; MAESTRINI *et al.*, 1996; WINBERG *et al.*, 1998). Nove tipos de plexinas já foram identificadas em mamíferos e classificadas em 4 classes distintas (classes A-D), sendo que seqüências relacionadas também foram encontradas em *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans* (WINBERG *et al.*, 1998).

Plexinas codificam grandes proteínas transmembrânicas cujo domínio extracelular rico em resíduos de cisteína compartilha regiões de homologia com receptores para fator de cicatrização. O domínio extracelular das plexinas contém cerca de 500 resíduos de aminoácidos correspondentes ao domínio semaforina, assim como certos receptores tirosino-quinases, porém esses domínios são distantemente relacionados ao domínio Sema das semaforinas. O domínio citoplasmático 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 Commiittee, 1999; ROHM *et al.*, 2000; OSTER *et al.*, 2003).

Plexinas humanas da subfamília B e C ligam-se a semaforinas classes 4 e 7 respectivamente, enquanto plexina A e D são possíveis receptores para outras subclasses de semaforinas (WINBERG *et al.*, 1998).

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, Raper (2000) propôs que as plexinas provavelmente sejam os receptores comuns prototípicos das semaforinas, enquanto o requerimento de proteínas auxiliares como as neuropilinas podem representar um caso especial para semaforinas classe 3.

Tamagnone & col (ARTIGIANI *et al.*, 2004) verificaram que a ativação de plexina B3 induzida por Sema5A dispara respostas de colapso em células expressando plexina B3 (células epiteliais, endoteliais primárias e fibroblastos). A interação entre Sema5A e plexina B3 não é dependente de Nrp, pois quando Nrp 1 e 2 eram cotransfectadas com Plex B3 a interação com Sema5A não foi modificada. Este resultado está de acordo com observações realizadas pelo grupo de Sretavan (OSTER *et al.*, 2003) que sugeriu que a função de Sema5A não é mediada por Nrp.

Sema4D induz crescimento invasivo de células epiteliais através do complexo receptor plexina-B1 e o receptor Met tirosino-quinase (GIORDANO *et al.*, 2003). A ligação de Sema4D a plexina B1 leva à ativação da atividade tirosina-quinase de Met resultando na fosforilação de Tyr em ambos receptores. A associação entre Plex B1 e Met tirosino-quinase é independente de ligantes, porém a ativação de Met é resultado de uma interação direta com Sema4D. A ativação de Met é requerida para induzir as respostas biológicas de Sema4D, pois células que expressam apenas Plex B1 não migram em direção ao gradiente de Sema4D; porém estas mesmas células transfectadas com Met realizam essa migração.

1.2.2 Controle da sinalização das semaforinas

Os complexos receptores para a família semaforina ativam vias intracelulares que modulam rearranjos do citoesqueleto modificando assim a forma, o comportamento ou a trajetória tomada pelos cones de crescimento.

Dentre os grupos de mediadores que constituem a maquinaria que transduz os sinais extracelulares e modulam as respostas desencadeadas pelo estímulo a Semas, estão a família das proteínas ligadoras de GTP – ou família Rho GTPases (CASTELLANI & ROUGON, 2002). As Rho GTPases são pequenas proteínas que controlam uma ampla variedade de vias de transdução de sinal em células eucarióticas. Possuem papel central na regulação do citoesqueleto de actina, e há indícios de que estas proteínas influenciam a polaridade celular, dinâmica dos microtúbulos, vias de transporte e atividade de fatores de transcrição (ETIENNE-MANNEVILLE & HALL, 2002).

As proteínas da família Rho ciclam entre uma forma ativa (ligada a GTP) e inativa (ligada a GDP). A ativação e inativação podem ser controladas por GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*) que catalisam a troca de GDP por GTP, isto é, ativam as proteínas Rho; e podem ser controladas por GAPs (*GTPase activating proteins*) que estimulam a hidrólise de GTP, levando à inativação de Rho. As proteínas Rho, de forma geral, possuem atividade GTPásica intrínseca que é apenas acentuada pelas GAPs (ETIENNE-MANNEVILLE & HALL, 2002).

Rho é uma superfamília de proteínas que engloba as subfamílias Rho, Rnd e Rac. As subfamílias Rho e Rac estão envolvidas em vias de transdução de sinais dos receptores para alvos intracelulares, que podem ser proteínas do citoesqueleto, receptores nucleares ou proteínas envolvidas em vias bioquímicas (ETIENNE-MANNEVILLE & HALL, 2002).

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. Plexinas B1 e A1 exercem atividade GAP sobre R-Ras. Esta regula adesão celular e a inativação de R-Ras por plexina pode limitar a adesão celular mediada por integrina. Porém, Plexina B1 requer a ligação direta de Rnd 1, um membro da família Rho GTPase, para exercer sua atividade GAP total (AURANDT *et al.*, 2005).

Swiercz *et al.*, 2002 constatou que LARG e PRG, que são GEFs (trocam GDP por GTP) específicas de Rho, ligam-se à porção C-terminal de plexina-B1 e medeiam a ativação de RhoA sob estimulação de Sema4D. A ligação de LARG ou PRG a Plex B1 e conseqüente ativação de RhoA, causam o colapso do cone de crescimento em células hipocampais.

Rohm *et al.*, 2000 demonstrou que o domínio citoplasmático da Plexina-A1 pode regular diretamente a atividade da *small-GTPase* Rnd1. Paralelamente Vikis *et al.*, 2000 mostrou a interação e funcionalidade da interação da Plexina-B1 com a outra GTPase, Rac. Rnd-1 liga-se a plexina A1 e em menor extensão, também a plexina B1; enquanto Rac 1 interage somente com plexina B1. Rnd 1 e Rac diferem na dependência a GTP para se associarem com as plexinas. Rnd-1 se associa a plexina A1, tanto ligado a GTP ou GDP. Diferentemente, Rac 1-GTP interage somente com plexina B1. Essa interação diferencial das 2 plexinas com Rnd 1 e Rac, indicam que apesar da grande similaridade de sequência entre os domínios citoplasmáticos da família plexina, diferentes tipos de plexina podem ativar vias distintas de sinalização intracelular. O domínio citoplasmático de plexina A1 liga-se a Rnd-1 enquanto plexina B1 interage preferencialmente com Rac 1 e menos fortemente com Rnd-1. Essa interação é independente da presença de seus respectivos ligantes Sema3A e Sema4A ou do co-receptor Nrp-1 (ROHM *et al.*, 2000).

Mais recentemente foi demonstrado que o domínio citoplasmático da Plexina A1 liga-se não só a Rnd1 como a outra GTPase, RhoD (ZANATA *et al.*, 2002). Em contraste, RhoD bloqueia tanto a ativação de Plexina-A1 pela Rnd1 como a repulsão de axônios simpáticos por Sema3A. Assim, o efeito antagonista destas duas GTPases regula a atividade do receptor de Sema3A, sendo sua ativação por Rnd1 aparentemente uma etapa essencial na sinalização mediada pela Plexina A1.

Não resta dúvida que a família das Rho GTPases está intimamente ligada aos fenômenos de neuritogênese e direcionamento axonal (NIKOLIC *et al.*, 2002), contudo muito trabalho ainda deve ser feito para uma clara compreensão de como

seus parceiros moleculares associam-se a estas GTPases e em que contexto regulam sua atividade.

A ativação da família MAPK (*mitogen activated protein kinase*) tem sido associada a algumas respostas celulares desencadeadas por estímulos de Sema7A, Sema3B e 3F (PASTERKAMP *et al.*, 2003; JULIEN *et al.*, 2005). MAPK é um dos ativadores a montante de ERK, que por sua vez, está relacionada a várias funções do sistema nervoso – e.g. desvio axonal, síntese protéica nos axônios e crescimento de neuritos. Porém as proteínas responsáveis pela ativação de ERK quando células são ativadas com Sema não são conhecidas. No entanto, estudos recentes têm revelado algumas vias específicas que são ativadas sob estimulação de semaforinas.

Aurandt *et al.*, 2005 demonstrou que quando a linhagem hipocampal (HT-22) é estimulada com Sema4D ocorre o aumento da fosforilação de ERK. A ativação de plexina B1 por Sema4D, faz com que LARG (que funciona como uma GEF de Rho A) ligue-se a plexina B1. Assim Rho A é fosforilada e ativada; e coopera com Ras para ativar Raf. Uma vez Raf ativada, atua sobre MAPK que fosforila ERK.

A ativação de plexina também pode levar a alterações no estado redox de proteínas celulares. Kolodkin & col (TERMAN *et al.*, 2002) mostraram que uma proteína citosólica expressa em neurônios – MICAL – interage com Plex A estimulada por Sema1a em *Drosophila*.

MICAL é uma família de flavoproteínas monooxigenases, que possuem membros que se associam diretamente com plexinas e são requeridos para atividade repulsiva de Sema3A. A inibição da atividade enzimática das flavoproteínas monooxigenases atenua dramaticamente a repulsão axonal em *Drosophila* e o colapso de cones de crescimento de axônios de DRG de vertebrados.

Desta forma, uma dada molécula pode elicitar respostas diferentes em neurônios que possuem “maquinaria de transdução de sinal” equivalentes, em termos de receptores e efetores a jusante. Outros fatores além da expressão protéica diferencial, e.g. potencial de membrana, potencial redox, concentração de nucleotídeos cíclicos, entre outros, podem fazer com que os neurônios apresentem

respostas alternativas a uma mesma molécula de direcionamento axonal (CASTELLANI & ROUGON, 2002).

1.2.3 Semaforinas classe 5: proteínas transmembrânicas com um domínio contendo repetições do tipo trombospondina

As semaforinas 5A e 5B (SemF e SemG, respectivamente) foram descritas pela primeira vez pelo grupo de Püschel (ADAMS *et al.*, 1996).

Ambas são constituídas de uma região amino terminal extracelular contendo 485 resíduos de aminoácidos correspondente ao domínio Sema, uma região modular com 408 aa compondo 7 repetições de uma sequência com alto grau de homologia às repetições encontradas em tromboespondinas 1 e 2 (TSP – *type 1 repeat*), um único domínio hidrofóbico transmembrânico e uma região citoplasmática carboxi terminal de 80 aa (sema5A) ou 91 aa (sema5B). Esta última apresenta o menor grau de similaridade entre sema5A e 5B em comparação a outras regiões destas proteínas (figura 3) (ADAMS *et al.*, 1996).

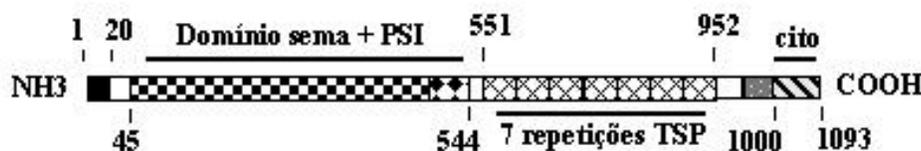


Figura 3: Representação esquemática da proteína Semaforina 5B. Esta proteína possui 1093 aminoácidos e massa molecular predita de 120 kDa. Sema5B é composta de um peptídeo sinal (1-20 aa), um domínio sema + PSI (45-544 aa), 7 repetições do tipo tromboespondina 1 (TSP-1; 551-952 aa); um domínio transmembrânico composto de 20 resíduos de aminoácidos (979-999 aa) e uma região citoplasmática (1000-1093 aa). PSI é um peptídeo que possui sequência conservada e está presente em *Plexinas*, *Semaforinas* e *Integrinas*. Os domínios de Sema5B foram preditos a partir de dados obtidos do servidor ExPASy (www.expasy.ch/tools/).

1.2.3.1 Expressão de Sema5A e 5B durante a embriogênese e período pós nascimento

Sema5A e 5B são diferencialmente expressas nos tecidos embriônicos e adultos. Análise de *northern blot* de mRNAs isolados de embriões murinos revelou a presença de 2 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 embriônico 10 (E10) ao nascimento (ADAMS *et al.*, 1996)

Em tecidos adultos são encontrados 3 transcritos de Sema5A. No cérebro ocorre a expressão destes 3 transcritos com 3.6, 5.5 e 9.4 kb. E para Sema5B denotou-se a presença de um único transcrito de 5.9 kb que é expresso apenas no cérebro (ADAMS *et al.*, 1996).

Ensaio de hibridização *in situ* em tecidos de camundongos detectou transcritos de Sema5A (E9.5) 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).

Skaliora *et al.*, 1998 analisaram os padrões de expressão de algumas semaforinas no cérebro de ratos e observou a presença de transcritos de Sema5B em todos neuroepitélios ao longo do cérebro (neuroepitélios do córtex, gânglio basal e tálamo). Essa localização específica indica um possível envolvimento de Sema5B na proliferação de células neuronais. E a expressão de Sema5B no neuroepitélio do córtex e gânglio basal, subplaca e massa branca do córtex, estriatum e cápsula interna do gânglio basal e córtex retrosplenial do hipocampo persiste após o nascimento.

1.2.3.2 Funcionalidade das semaforinas classe 5

A característica marcante de Sema5A e 5B é a presença de 7 repetições que apresentam alta homologia aquelas encontradas em trombospondinas 1 e 2 e um aspecto interessante é que as semaforinas classe 5 são as únicas semas que possuem representantes em vertebrados e invertebrados (FIORE *et al.*, 2005). As repetições de TSP-1 têm sido implicadas na diferenciação, no crescimento de neuritos, no desenvolvimento do S.N.C., nos processos de regeneração e na adesão neuronal (ADAMS & TUCKER, 2000). Trombospondinas interagem com um grande número de proteínas e estão envolvidas em vários aspectos das interações entre células e matriz extracelular.

Há trabalhos demonstrando que as repetições TSP estão implicadas na associação e modulação da interação de Sema5A com outras proteínas.

OSTER *et al.*, 2003 verificaram que a quimera protéica constituída pela região Fc de imunoglobulinas e o domínio extracelular Sema5A desprovido das repetições TSP e oligomerizado com uso de anticorpos α -Fc, desencadeia o colapso de cones de crescimento de células ganglionares retiniais, porém essa atividade inibitória é menos eficiente quando comparada à inibição desencadeada pelo domínio extracelular de Sema5A intacto.

O tratamento destes mesmos cones de crescimento com domínios Sema isolados ou TSP de Sema5A não induz nem colapso dos cones de crescimento, nem promove o crescimento dos explantes de células retiniais, sugerindo que os domínios isolados da Sema5B não possuem qualquer atividade biológica, mas que a ação coordenada dos diversos domínios estruturais é que promovem a fenomenologia observada em cultura.

A proteína Sema5A está presente no epitélio do nervo óptico, cerceando o feixe dos axônios oriundos das células ganglionares retiniais (RGCs). No sistema visual, o nervo óptico consiste de axônios de RGCs, e transfere informação retinal a alvos do sistema nervoso central. Assim Sema5A atua como uma barreira inibitória

presente ao longo do nervo óptico e disco óptico, induzindo o crescimento dos axônios de RGC em um feixe, pelo impedimento da saída de axônios das células ganglionares retiniais deste feixe. Oster & col (2003) também demonstraram que Sema5A se apresenta invariavelmente inibitória para os cones de crescimento de células retiniais mesmo quando estes cones são expostos simultaneamente a outras moléculas quimioatrativas, como L1, laminina e netrina 1.

Kantor *et al.*, 2004 demonstraram em ensaios de cultivo, que neurônios do núcleo da Habénula (Hb) semeados sobre membranas experimentais, contendo a porção extracelular de Sema5A intacta, produzem um crescimento axonal robusto ao contrário das membranas que não possuem nenhuma proteína imobilizada. Quando estes mesmos neurônios (Hb) são semeados sobre membranas contendo o domínio Sema de Sema5A fusionado ao domínio transmembrânico (Sema + TM), isto é, destituído das repetições TSP, não há crescimento preferencial desses neurônios sobre estas membranas (não há diferença de crescimento de neurônios em relação ao controle).

Em experimentos usando construções de Sema5A com deleções de domínios, verificou-se que a interação específica entre PGHSs (proteoglicanas do tipo heparan sulfato) e semaforina 5A – interação essa quimioatrativa - é dependente dos domínios TSP. Pois construções de Sema5A sem repetições TSP interagem fracamente com PGHSs, em comparação com aquelas de Sema5A compostas dos domínios extracelulares intactos (KANTOR *et al.*; 2004). Estes ensaios em conjunto demonstram que o domínio TSP pode acentuar a interação entre Sema5A e seus parceiros moleculares tanto na quimiorepulsão quanto quimioatração. Provavelmente as repetições TSP contribuem para as interações ligante-receptor.

Kolodkin & Col. (KANTOR *et al.*, 2004) demonstraram que Sema5A atua de forma dual, isto é, exerce efeitos atrativos e inibitórios, e é requerida para o apropriado desenvolvimento do fasciculus retroflexus (FR) que é um trato fibroso diencefálico.

Durante o desenvolvimento, o diencéfalo se torna subdividido ao longo do eixo rostro-caudal em uma série de segmentos chamados prosomeros. Certos tratos axonais dorso-ventrais se formam entre os prosomeros, de forma que axônios pioneiros utilizam moléculas direcionadoras de navegação axonal expressas nesses segmentos que estabelecem um “suporte axonal” onde gerações subseqüentes de axônios estendem-se e fasciculam seletivamente. Supõe-se que tipos distintos de moléculas direcionadoras de navegação axonal atuem sobre esses tratos ou feixes, para que estes tratos se formem entre os prosomeros (KANTOR *et al.*, 2004).

O fasciculus retroflexus (FR) consiste de feixes de axônios que se originam de neurônios do núcleo da Habenula (Hb) que projetam-se ao longo da vizinhança entre os prosomeros 1 e 2. Moléculas repulsivas são expressas nos prosomeros e impedem que os axônios do fasciculus retroflexus (FR) se desenvolvam sobre estas áreas e moléculas atrativas são expressas nos axônios pioneiros localizados entre os prosomeros (no FR) que promovem a fasciculação de axônios subseqüentes.

Foi verificado que Sema5A é expressa nos axônios pioneiros do fasciculus retroflexus (FR) juntamente com o proteoglicano contendo heparan sulfato (PGHS) sindecam-3. A co-expressão destas duas moléculas (Sema5A + PGHS), forma um substrato atrativo onde axônios subseqüentes fasciculam-se seletivamente, assim Sema5A + PGHSs medeiam efeitos permissivos encontrados no feixe de axônios do FR. Além de PGHS, Sema5A está co-localizada com outro proteoglicano contendo condroitin sulfato (PGCS), o qual forma uma vizinhança molecular em torno do FR, onde os axônios dos neurônios do núcleo da Habenula não invadem.

Kolodkin & col (KANTOR *et al.*, 2004) empregando cultivo de neurônios do núcleo da Habenula (Hb) sobre preparações mostraram que Sema5A atua como repelente para axônios do FR quando associada à PGCS no prosomero 2. Porém quando expressa em fibras do fascículo retroflexus com PGHS, Sema5A funciona como molécula atrativa. Assim a natureza da resposta dos cones de crescimento à Sema5A depende dos tipos de proteoglicanas presentes no ambiente do desenvolvimento.

O grupo de Püschel (FIORE *et al.*, 2005) verificou que animais nocaute para semaforina 5A são inviáveis - embriões de camundongos que não possuem o gene para Sema5A não sobrevivem após o dia do desenvolvimento embriônico 12.5 (E12.5).

A análise destes animais revelou que a estrutura geral do sistema vascular, o desenvolvimento dos tecidos extraembriônicos, e o sistema nervoso se apresentam normais nos camundongos mutantes. Contudo observou-se a diminuição no número de vasos de grande diâmetro na região cranial de embriões E10.5 mutantes. 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.

Assim semaforinas classe 5 parecem estar envolvidas em diversos processos celulares durante o desenvolvimento do embrião. Porém mais estudos devem ser realizados para melhor definir as múltiplas funções de semaforinas classe 5, em especial a proteína Sema5B que até o presente momento possui funcionalidade e características desconhecidas.

1.3 Influência do ambiente redox sobre a fisiologia dos organismos e controle da sinalização celular

Muitas proteínas contêm resíduos cisteína (Cys) e metionina (Met) que estão sujeitos à oxidação. Estas proteínas que incluem transportadores, receptores e enzimas, respondem a variações no ambiente redox.

Mudanças na atividade dessas proteínas podem alterar a funcionalidade dos órgãos e influenciar processos como o desenvolvimento e ontogenia dos

organismos, absorção, função secretora, neurotransmissão e susceptibilidade a compostos tóxicos.

As 2 maiores vias de sinalização celulares envolvem: (I) a fosforilação de proteínas, ou (II) alterações redox do enxofre de grupos sulfidrila das proteínas devido a mudanças do ambiente redox celular. Logo o estado redox pode regular a homeostasia tecidual pelos efeitos na proliferação celular, diferenciação, atividade funcional e apoptose (SHAFER & BUETTNER, 2001).

Por exemplo, muitos fatores de transcrição eucarióticos são ativos somente na forma reduzida; e a translocação de fatores de transcrição para o núcleo é freqüentemente redox-dependente; e.g. a translocação do receptor nuclear de glicocorticóides é inibida na presença de 0,5-2 mM de H_2O_2 ; ambientes celulares mais redutores estão geralmente associados à proliferação celular (SHAFER & BUETTNER, 2001). Opostamente, moléculas pró-oxidantes, como certos metabólitos do ácido araquidônico e lipídeos peroxidados, elevam a concentração intracelular de espécies reativas de O_2 e podem induzir apoptose, geralmente inibida por agentes antioxidantes, como NAC, GSH, proteínas contendo tióis reduzidos (e.g. TRX) (MORIARTY-CRAIGE & JONES, 2004). Desta forma o ambiente redox da célula pode determinar se uma célula irá proliferar, diferenciar ou morrer.

Estresse oxidativo também pode selecionar as células necessárias ao desenvolvimento e eliminar as redundantes. Exemplo típico desta seleção é encontrado durante o início do desenvolvimento onde normalmente há produção de células além do número necessário. No início do desenvolvimento do sistema nervoso a maioria dos neurônios imaturos sobrevive independentemente de suporte trófico, mas esses se tornam dependentes dos fatores tróficos em estágios mais tardios. Os fatores tróficos aumentam as capacidades antioxidantes neuronais e inibem morte neural induzida por estresse oxidativo *in vivo* e em neurônios cultivados (CASTAGNE *et al*, 1999).

Em adição à possível inibição do ataque oxidativo direto por radicais livres, neurotrofinas podem também atuar indiretamente sobre os fatores de transcrição

sensíveis ao estado redox. Efeitos do estado redox na expressão gênica foram estudados em eventos iniciais da arteriosclerose e destino de células neuronais (CASTAGNE *et al.*, 1999). Em ambos eventos demonstrou-se o efeito redox sobre o fator nuclear Kappa B (NF-KB), o qual controla uma miríade de genes, e é considerado um dos grandes reguladores da expressão gênica.

O fator nuclear Kappa B (NF-KB) é localizado normalmente no citoplasma na forma inativa. Estímulos ativadores de NF-KB, que incluem espécies reativas de oxigênio (ROS), induzem a fosforilação e degradação da subunidade inibitória (I-KB). Após a dissociação de NF-KB de I-KB, ocorre a translocação de NF-KB para o núcleo que então interage com seqüências regulatórias KB e seus genes alvo. Em contraste à ativação citoplasmática, a ligação de NF-KB no núcleo é inibida por agentes oxidantes. A regulação redox da atividade de NF-KB é modulada de forma dual nos 2 compartimentos subcelulares: ROS ativam NF-KB citoplasmático e inibem NF-KB nuclear (CASTAGNE *et al.*, 1999; MORIARTY-CRAIGE & JONES, 2004)

1.3.1 Origem, regulação do potencial redox e consequências da variação deste potencial na homeostasia celular e desenvolvimento

A energia necessária para manter o estado ordenado dos organismos vem da captura da energia liberada nos processos de oxidação. A energia vem do movimento dos elétrons de moléculas orgânicas oxidáveis pelo oxigênio. Este processo contribui para a manutenção de um ambiente redox nas células e tecidos.

As duplas redox nas células são as responsáveis pelo fluxo de elétrons, que levam a mudanças no ambiente celular a oxidante/redutor.

Há várias duplas redox na célula que trabalham em conjunto para manter o ambiente redox, como por exemplo, $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$; $\text{GSSG}/2\text{GSH}$; $\text{TrxSS}/\text{Trx}(\text{SH})_2$; Cys/CySS (SHAFER & BUETTNER, 2001). A dupla $\text{GSSG}/2\text{GSH}$ é a mais abundante na célula e é considerada o maior tampão tiol-

dissulfeto intracelular. GSH e GSSG também são encontradas fora das células, mas geralmente em pequenas quantidades. A maioria do GSH nas células é encontrado no citosol. GSH no núcleo mantém o estado redox de proteínas sulfidrilas críticas, que são necessárias para o reparo de DNA e expressão. Em contraste à mitocôndria e ao núcleo, o retículo endoplasmático é mais oxidante que o citosol (SCHAFER & BUETTNER, 2001). A razão GSH/GSSG é de 1:1; enquanto a razão na célula total é de 30:1. Quando células e tecidos são submetidos à estresse oxidativo, ocorre a liberação de GSSG para o ambiente extracelular. E o estresse oxidativo leva a formação de GSSG intracelular às custas de GSH. Esta mudança da razão GSH/GSSG leva o estado redox celular a um potencial mais positivo (ou mais oxidante). Se este potencial se eleva excessivamente, torna-se letal para a célula, ocasionando morte celular (SCHAFER & BUETTNER, 2001).

Numerosas proteínas contêm grupos sulfidrilas (PSH) devido aos resíduos de cisteína. A concentração de grupos PSH ou cisteínas nas células e tecidos é muito maior do que a de GSH. Estes grupos podem ser tióis (PSH), dissulfetos (PS-SP) ou dissulfetos mistos, por exemplo, PS-SG (quando as proteínas são conjugadas com GSH). A oxidação da forma tiol de uma enzima ou a redução da forma dissulfeto pode resultar em ativação ou inativação da função enzimática. Normalmente a oxidação de sulfidrilas protéicas a dissulfetos mistos é uma resposta primária ao estresse oxidativo (SCHAFER & BUETTNER, 2001).

A detiologia protéica como na reação: $PS-SG + GSH \rightarrow PSH + GSSG$, parece ocorrer sob a influência enzimática de algumas proteínas como PDI e tioredoxina (TRX) (SCHAFER & BUETTNER, 2001).

. Há evidências de que estas proteínas possam proteger as células contra os efeitos deletérios dos radicais livres (SCHAFER & BUETTNER, 2001). O grupo de Shiota (2002) verificou que tioredoxina (Trx) é expressa a partir do dia embrionário 8.5 (E8.5) em camundongos, período esse que antecede o aumento do aporte de O_2 para o embrião. Estes pesquisadores também demonstraram que embriões transgênicos que expressam continuamente o gene Trx, e cultivados sob

pressões de oxigênio hiperbáricas (10 ou 25 % de O₂), têm os produtos do estresse oxidativo significativamente reduzidos quando comparados aos embriões selvagens. Logo os embriões transgênicos que superexpressam Trx são significativamente mais resistentes aos efeitos lesivos da hiperóxia em relação aos embriões selvagens.

Nos sistemas biológicos, o metabolismo aeróbico normal produz radicais livres, alguns altamente reativos (CASTAGNE *et al*, 1999). Estes podem reagir outras moléculas e oxidá-las. Uma ampla variedade de antioxidantes ocorre naturalmente nos organismos. Dentre os agentes antioxidantes estão algumas enzimas como a glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase. Na morte neuronal natural ou induzida por axotomia, por exemplo, há variações nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) que sugerem a participação de estresse oxidativo. Corroborando essa hipótese há estudos que evidenciam o impedimento da morte neuronal por agentes antioxidantes (CASTAGNE *et al*, 1999). Neurônios simpáticos sofrem apoptose quando privados de fatores de crescimento como o NGF. Todavia quando estes neurônios são injetados com Cu/Zn superóxido dismutase (SOD) ou com o vetor de expressão contendo o cDNA de SOD a apoptose neuronal pode ser impedida.

As modificações do estado celular durante o desenvolvimento também estão normalmente associadas com mudanças acentuadas na atividade de SOD. Alterações da atividade da SOD durante o desenvolvimento de invertebrados e vertebrados também foram relatadas (ALLEN & BALIN; 1989). Quando o protista *P. policephalum* é cultivado sob condições severas, como por exemplo em meio de cultivo pobre em nutrientes, ele se torna mitoticamente inativo e forma paredes celulares. Durante a transição do organismo mitoticamente ativo para uma forma quiescente (esférulas/espores) ocorre um pequeno decréscimo inicial da atividade da MnSOD; porém no decorrer da diferenciação, a atividade da MnSOD aumenta 46 vezes (ALLEN & BALIN; 1989). Também foi denotado o aumento da atividade da SOD em 346 % durante o desenvolvimento de *Drosophila*. A atividade desta enzima também eleva-se progressivamente durante o desenvolvimento de *D. pictus* e *R.*

ridibunda (2 espécies de anfíbios) e alcança um pico durante a fase metamórfica destes organismos (ALLEN & BALIN; 1989).

Logo a direção de vários processos celulares depende do estado redox intra e extracelulares. Portanto proteínas que modificam o estado redox de outras moléculas são moduladores críticos de fatores reguladores, como os envolvidos no controle da expressão gênica, sinalização celular e componentes da matriz extracelular.

1.3.2 Sulfidril oxidases: enzimas envolvidas na formação de pontes dissulfeto e dobramento oxidativo de uma grande variedade de proteínas

As enzimas sulfidril oxidases catalisam a oxidação de grupos sulfidril a dissulfetos com a redução do oxigênio molecular a peróxido de hidrogênio:



Até o momento, foram descritas duas classes principais de sulfidril oxidases, e a classificação se baseia no cofator utilizado para essas enzimas. São as enzimas sulfidril oxidases metalo-dependentes (contém cobre ou ferro); e as sulfidril oxidases dependentes de FAD (flavina adenina dinucleotídeo) (THORPE *et al.*, 2002).

Membros da família de proteínas Quiescina-sulfidril oxidases (QSOX) utilizam um domínio tioredoxina e um pequeno domínio ligado a FAD para oxidar grupos sulfidril a dissulfeto com a redução do oxigênio a peróxido de hidrogênio (THORPE *et al.*, 2002).

Recentemente foi descoberto que algumas sulfidril oxidases como as encontradas na clara do ovo de galinha (HOOBER *et al.*, 1996), fibroblastos de pulmão humano (COPPOCK *et al.*, 1993), trato reprodutivo masculino e fluido de vesículas seminais (OSTROWSKY & KESTLER, 1980; BENAYOUN *et al.*, 2001), epiderme de camundongo (MATSUBA *et al.*, 2002) são todos membros de uma família de enzimas sulfidril oxidases dependentes de FAD (quiescina sulfidril

oxidases – QSOX). Estas proteínas contêm 2 domínios: um domínio N-terminal tioredoxina (TRX) e um domínio próximo à região carboxi terminal homóloga à ERV1p. ERV1p é produto de um gene de *S. cerevisiae* requerido para a respiração e viabilidade celular (figura 4) (THORPE *et al.*, 2002).



Figura 4: Representação esquemática de QSOX1 de camundongo. Esta figura mostra o arranjo típico de domínios encontrado nas sulfidril oxidases ligadas à flavina. A proteína inicia com uma seqüência sinal localizada na porção N-terminal (1-33 aa), seguido por um motivo tioredoxina (TRX – 38-127 aa); uma região espaçadora com pouca homologia entre as diferentes sulfidril oxidases e um motivo ERV1/ALR (384-515 aa). Há 3 motivos CXXC redox ativos na seqüência de QSOX (a localização destes motivos está denotada com asteriscos). A QSOX nativa de camundongo tem uma ORF de 1704 bp, traduzida em uma proteína de 568 aa. A estrutura e seqüência protéica foram baseadas em Benayoun *et al.*, 2001 e Matsuba *et al.*, 2002.

No entanto o arranjo das proteínas QSOX, formadas pela fusão dos domínios TRX e ERV1/ALR, foi inicialmente reconhecido em quiescina Q6.

A família de proteínas QSOX tem sido descrita como proteínas que participam na elaboração da matriz extracelular, maturação de poxvírus, como fatores de crescimento envolvidos na regeneração de tecidos, sensibilização de células de neuroblastoma a estímulos apoptóticos e como fatores de regulação de crescimento e adesão celulares (COPPOCK *et al.*, 1998; THORPE *et al.*, 2002; WITTKE *et al.*, 2003).

O gene QSOX é encontrado em uma vasta variedade de organismos abrangendo filós eucariotos e genes relacionados em protistas. Contudo estes genes ainda não foram encontrados em leveduras (THORPE *et al.*, 2002). Para humanos foram descritos 2 genes para estas enzimas. Estes genes são encontrados em cromossomos distintos e são denominados QSOX1 (Q6) e QSOX2 (QSOXN) localizados nos cromossomos 1q24 e 9q34.3, respectivamente (COPPOCK *et al.*, 1993; THORPE *et al.*, 2002). Coppock & Thorpe (revisão não publicada)

consideram que os metazoários duplicaram o gene QSOX; postula-se, portanto, que todo o clado dos vertebrados possui as duas formas do gene descritas acima.

A expressão do gene QSOX1 (Q6) de humanos, inicialmente denominado quiescina Q6, é baixa em fibroblastos em proliferação. Porém sua expressão é induzida quando fibroblastos entram em quiescência. A maior expressão gênica sugere que esta proteína esteja envolvida no processo normal de quiescência celular reversível e portanto a inibição desta poderia levar a processos patológicos como câncer (COPPOCK *et al.*, 1998).

As funções precisas de Q6 e seus homólogos ainda não são conhecidas. Porém vários genes são expressos durante a quiescência celular reversível, incluindo 4 colágenos e decorina, que são componentes da matriz extracelular. Estas proteínas secretadas possuem múltiplas pontes dissulfeto essenciais para a integridade estrutural da matriz. Por exemplo, a formação de pontes dissulfeto em muitos colágenos é requerida para o arranjo trimérico destas proteínas, que também são necessárias para a geração das redes de colágeno extracelulares (COPPOCK *et al.*, 1998).

Descobriu-se a existência da segunda forma do gene QSOX (QSOX 2) pela identificação de uma sulfidril oxidase derivada de neuroblastoma humano. Este gene foi identificado por Schwab & col (WITTKE *et al.*, 2003) na procura por genes específicos que sensibilizavam células de neuroblastoma a estímulos pró-apoptóticos. Foi demonstrado que a inativação de QSOX2, utilizando a expressão de QSOX2 antisenso em células de neuroblastoma, confere resistência à apoptose induzida por IFN- γ . Em contraste super expressão de QSOX2 sensibiliza as células à morte celular induzida.

Somando-se à existência de 2 genes codificantes para sulfidril oxidases dependentes de FAD, podem ocorrer formas diferentes de RNAm e proteínas truncadas devido à ocorrência de processamento alternativo do RNAm (COPPOCK & THORPE, 2006). Em camundongos e ratos dois transcritos para QSOX foram relatados. Porém observou-se a tradução de apenas um dos transcritos, que codifica

uma proteína com massa molecular aparente próxima à 70 kDa, que corresponde à mesma proteína encontrada na vesícula seminal desses animais (MAIRET-COELLO *et al.*, 2005). A extensão dos mRNAs traduzidos são similares ao de humanos, com 2433 bp para o camundongo e 2472 bp para o rato (BENAYOUN *et al.*, 2001; THORPE *et al.*, 2002). O genoma de camundongo contém seqüências homólogas ao longo do transcrito humano de QSOX1. Contudo a expressão desta seqüência não foi observada (THORPE *et al.*, 2002)

A enzima oriunda de aves é a mais estudada e utilizada como protótipo. A enzima está presente na clara de ovos de galinhas e em amplo espectro de aves e répteis. QSOX1 é particularmente abundante no tecido secretório do oviduto de galinhas e apresenta uma ampla distribuição nos tecidos de aves (THORPE *et al.*, 2002). A sulfidril oxidase de aves consiste de um dímero de 2 subunidades glicosiladas idênticas, cada uma possui massa molecular aparente de 93 kDa devido à alta glicosilação – esta massa molecular é obtida em ensaios de SDS-PAGE (o esqueleto protéico da proteína possui cerca de 67 kDa e a seqüência é muito similar à de Quiescina Q6 humana) (HOOBER *et al.*, 1996; HOOBER *et al.*, 1999). Cada subunidade contém uma molécula de FAD ligada por interações não covalentes e uma ponte dissulfeto redox-ativa. Os substratos conhecidos de QSOX de ave são peptídeos e substratos protéicos reduzidos (HOOBER *et al.*, 1999; THORPE *et al.*, 2002), e parece haver pouca dependência em relação à massa molecular ou pI destes substratos protéicos. Proteínas secretadas com 1 ou 2 tióis parecem ser os melhores substratos para a oxidase com valores de Km típicos de 110 a 330 μM /tiol já a ovoalbumina apresenta Km de 1,7 mM; 20 mM para glutathiona e 50 mM para β -mercaptoetanol (HOOBER *et al.*, 1999). O alto Km para GSH e a baixa eficiência catalítica de glutathiona sugerem que este abundante redutor celular não seja o substrato primário da enzima. Contudo GSH pode servir como um co-substrato da oxidase, com a geração de pontes dissulfeto mistas num primeiro passo no processo oxidativo *in vivo*. Thorpe & col. (HOOBER *et al.*, 1999) mostraram que RNase reduzida é um substrato de QSOX de ave. Porém os pareamentos corretos, isto é, a

recuperação eficiente dos padrões dissulfetos nativos em RNase reduzida ocorre somente quando PDI (proteína dissulfeto isomerase) é adicionada à reação.

QSOX de rato, de camundongo e bovina são monoméricas, diferentemente da proteína de aves (HOOBER *et al.*, 1993; THORPE *et al.*, 2002), apresentando massa molecular de 65 kDa, enquanto a holoenzima de aves obtida em gel filtração possui 202 kDa (HOOBER *et al.*, 1996; MATSUBA *et al.*, 2002; HOOBER *et al.*, 1999).

As massas moleculares das sulfidril oxidases de rato e de boi foram preditas a partir de ensaios de sedimentação em gradiente de sacarose, gel filtração e SDS-PAGE. Ensaios enzimáticos demonstraram que estas enzimas têm atividade enzimática e atuam sobre uma variedade de pequenos compostos sulfidrila como glutationa, cisteína e ditioneitol (OSTROWSKY *et al.*, 1979; OSTROWSKY *et al.*, 1980).

Também, o grupo de Suga (MATSUBA *et al.*, 2002) purificou e caracterizou QSOX a partir de epiderme de camundongo como uma tiol protease de 65 kDa. Descreveram o cDNA de camundongo apresentando uma ORF de 1704 bp codificando uma proteína de 568 aminoácidos.

As enzimas QSOX são proteínas ubíquas. Coppock & Thorpe (revisão não publicada) observaram que na maior parte dos tecidos de mamíferos QSOX1 é consideravelmente mais abundante que QSOX2. Sabe-se que um mesmo tipo celular expressa transcritos de um mesmo gene, e que estes transcritos são produzidos a partir de processamento alternativo. Foi demonstrado 3 transcritos com tamanhos diferentes em neuroblastoma, oriundos do gene QSOX2 (WITTKE *et al.*, 2003). Estudos imunohistoquímicos mostram uma ampla expressão de sulfidril oxidases em uma variedade de tecidos, e a localização dessa expressão é bastante específica. Essas são encontradas extracelularmente e em tipos celulares associados com vias secretoras, como a superfície secretória luminal de células epiteliais, sítios envolvidos na secreção apócrina, células do ducto epitelial da parótida, ilhotas de Langerhans, trato reprodutivo, entre outros (THORPE *et al.*, 2002).

Vários trabalhos demonstram a presença de QSOX no ambiente extracelular, como fluídos seminais (BENAYOUN *et al.*, 2001), clara do ovo (HOOBER *et al.*, 1996; HOOBER *et al.*, 1999), sobrenadante de cultivo de fibroblastos quiescentes (HOOBER *et al.*, 1999). O destino extracelular de QSOX sugere que esta possa estar envolvida na remodelação dos componentes da matriz extracelular ou na sinalização celular principalmente pelo favorecimento da formação de pontes dissulfeto dentro de uma mesma proteína ou entre proteínas distintas, pois proteínas secretadas e os domínios extracelulares de proteínas de membrana contem ligações dissulfeto que são requeridas para o apropriado dobramento, função e estabilidades protéicas (THORPE *et al.*, 2002).

No sistema nervoso, QSOX1 pode modular interações célula-célula, levando em consideração que essa pode ser liberada nos sítios sinápticos e hipoteticamente implicar no fortalecimento sináptico quando liberada juntamente com neurotransmissores. (AMIOT *et al.*, 2004; MAIRET-COELLO *et al.*, 2005). Também poderia exercer influência nos processos de migração e estabelecimento celulares, crescimento da arborização dendrítica pela introdução e/ou manutenção das pontes dissulfeto em proteínas secretadas, componentes da matriz extracelular, ou proteínas de membranas (MAIRET-COELLO *et al.*, 2005).

Em relação ao seu possível papel durante o desenvolvimento fetal, o grupo de Grunwald (HOSHIJIMA *et al.*, 2002) verificou que uma proteína dissulfeto isomerase (PDI-P5) expressa na linha medial embriônica é requerida para a formação do padrão assimétrico direito/esquerdo. Apesar de uma aparência externa de simetria bilateral, os órgãos internos dos vertebrados exibem uma estrutura morfológica assimétrica. Os processos de expressão gênica assimétrica e morfogenéticos subsequentes são regulados pela linha medial embriônica. A expressão gênica bilateral resultante da perda de estruturas da linha medial tem sido interpretada como originária da perda da “barreira” produzida pela linha medial a sinais que promovem expressão gênica do lado esquerdo e/ou a perda de sinais que inibem a expressão gênica do lado direito (HOSHIJIMA *et al.*, 2002). Caso a linha

medial constitua uma barreira fisico-química que impessa a propagação de sinais que emanam do lado esquerdo em direção ao lado direito, é necessária a existência de uma matriz extracelular intacta na linha medial para a manutenção das assimetrias. Assim QSOX1 poderia ser um dos fatores que atuam neste modelo para a manutenção da integridade da matriz extracelular.

Estas supostas funções para QSOX induzem o conceito de que estas proteínas exercem papel central na geração de dissulfetos *in vivo*. Todavia deve-se levar em consideração que o único estudo detalhado da especificidade enzimática foi feita apenas com QSOX de ave; não há estudos de animais nocaute ou mutantes para QSOX de vertebrados; desconhece-se mutações que gerem processos patológicos; e as vias para a interconversão de tióis e dissulfetos possuem múltiplos catalisadores e abrangem processos com especificidades sobrepostas. Dessa forma é possível que QSOX possa introduzir dissulfetos em uma pequena parcela de peptídeos e proteínas, que dependem do substrato protéico e tipo celular em questão (COPPOCK & THORPE, revisão não publicada).

QSOX também é encontrada intracelularmente. Esta proteína pode ser localizada no retículo endoplasmático, golgi, grânulos secretórios, e também relatou-se a enzima associada à mitocôndria ou na matriz mitocondrial durante o desenvolvimento de células testiculares de mamíferos (COPPOCK & THORPE, revisão não publicada).

Schwab e col. (WITTKE *et al.*, 2003) observaram que a proteína QSOX2 possui uma extensão C-terminal, o que leva a predizer que essa pode ser direcionada para a membrana celular. Até o momento QSOX2 foi encontrada somente associada às membranas nucleares e citoplasmáticas. Porém quando células de neuroblastoma são induzidas à apoptose com IFN- γ , observou-se que QSOX2 é translocada para outro compartimento celular ainda não caracterizado. Este grupo propôs que a função/localização desta enzima pode ser modulada por estímulos exógenos.

Levando-se em consideração que os papéis específicos desempenhados por QSOX na fisiologia celular e dos organismos ainda não foram identificados, a

localização e a expressão desta família de proteínas fornecem pistas que podem auxiliar na elucidação da funcionalidade e substratos específicos das diferentes sulfidril oxidases dependentes de FAD.

2 Justificativas e objetivos do trabalho

Estudos recentes têm relacionado as diferentes Semas a mecanismos de quimiorepulsão e quimioatração sobre células neuronais, levando a crer que estas proteínas têm papel crucial em fenômenos de navegação axonal e neuritogênese.

Levando-se em consideração a potencial importância desempenhada pelas proteínas da família Semaforina, bem como a falta de dados referente à atuação destas, em particular Sema5B, e a inexistência de reagentes comerciais disponíveis para se levar a cabo a busca sistemática dos parceiros moleculares desta proteína, tem-se como um dos objetivos do presente trabalho a obtenção de ferramentas que poderão ser utilizadas no estudo das possíveis funções biológicas apresentadas pela proteína Sema5B..

Trabalhos recentes têm demonstrado evidências do envolvimento de processos redox durante o desenvolvimento, ontogenia celular e dos organismos, assim como a participação na modulação da sinalização celular e dobramento correto de proteínas. Portanto torna-se bastante interessante avaliar a expressão de QSOX e buscar proteínas que com ela interagem, numa tentativa de melhor se compreender o papel de tióis críticos na fisiologia celular e dos organismos.

Recentemente o nosso grupo demonstrou a presença de QSOX ativa em soro fetal bovino (ZANATA *et al.*, 2005). Há hipóteses sobre a relevância de QSOX durante o desenvolvimento, contudo é necessário a realização de mais estudos para melhor esclarecer o papel funcional destas enzimas. Também estamos conduzindo trabalhos com ensaios de imunohistoquímica (para inferir a localização tecidual de QSOX), imunoprecipitação com QSOX nativa e avaliação da atividade enzimática da proteína recombinante; estes últimos visam a identificação de possíveis substratos e parceiros moleculares das sulfidril oxidases dependentes de FAD.

A elucidação de muitas das vias sinalizadoras, tanto envolvendo Sema5B como QSOX, passa necessariamente por etapas que dependem do estabelecimento

de metodologias adequadas, bem como a produção de reagentes que reconheçam especificamente as moléculas estudadas.

2.1 Objetivos gerais:

1. Estabelecimento de metodologias para obtenção da proteína Semaforina 5B e QSOX recombinantes e nativas;
2. Produção de reagentes que reconheçam especificamente estas moléculas;

2.2 Objetivos específicos

1. Subclonagem de domínios distintos do cDNA de Sema5B para futura expressão em sistemas de expressão bacterianos;
2. Expressão do domínio citoplasmático de Sema5B subclonada no vetor pQE30 (construção gentilmente cedida pelo Dr. Andreas Püschel – Max Planck Institut – Germany);
3. Clonagem e expressão do cDNA de QSOX de camundongo subclonado no vetor de expressão bacteriano pET 32a;
4. Obtenção de anticorpos policlonais das proteínas recombinantes a partir da imunização de coelhos e camundongos BALB/c com Sema5B rec e coelhos com QSOXrec;
5. Caracterização completa dos anticorpos gerados a partir de técnicas de separação cromatográfica e detecção imunológica;
6. Utilização dos reagentes obtidos em ensaios bioquímicos e de função biológica.

3 Metodologia

3.1 Clonagem de Semaforina 5B e quiescina sulfidril oxidase de camundongo

3.1.1 Vetores de expressão e seqüências clonadas da proteína Semaforina 5B – vetor pQE30

Parte da seqüência de cDNA codificadora da região citoplasmática da proteína Sema5B de camundongo que possui 281 bp (Acession number NM 013661) foi subclonada no vetor pQE30 (Qiagen). A preparação dos plasmídeos de expressão, pQE30-Sema5B, foi realizada no Instituto Max-Planck Frankfurt e estes foram gentilmente cedidos pelo professor Dr. Andreas Püschel.

O vetor pQE30 tem como características um promotor T5, repressão em *trans* e confere resistência ao antibiótico ampicilina. Possui um sítio de ligação ao ribossomo posicionado antes do códon ATG de iniciação de tradução e uma série de 6 códons para histidina que funcionam como um domínio ligante de metais na proteína traduzida.

O plasmídeo recombinante deve ser amplificado em uma linhagem de *E.coli* que contendo o gene *lac I^q* (repressão em *trans*) para prevenir o escape da indução da expressão da proteína de interesse e com baixa taxa de recombinação e endonucleases. Neste trabalho utilizou-se a linhagem de *E.coli* XL1-BLUE na amplificação do plasmídeo pQE30-Sema5B. A expressão pode ser feita em qualquer linhagem bacteriana; porém deve-se optar preferencialmente por linhagens que possuam o gene *lac I^q*. Assim o hospedeiro de escolha para a expressão foi *E.coli* M15 e XL1-BLUE.

A fim de confirmar a clonagem da região citoplasmática de Sema5B realizou-se o PCR de colônias de bactérias contendo o vetor pQE30 utilizando os oligonucleotídeos comerciais (Qiagen) flanqueadores do sítio de policlonagem do vetor: *Forward* 5' AGATTCAATTGTGAGCGGAT 3'; *Reverse* 5' CTATCAACAGGAGTCCAAGC 3' como descrito (SAMBROOK & RUSSEL,

2001). Após a verificação da presença de um inserto no sítio de policlonagem, realizou-se uma reação de sequenciamento automático usando esses mesmos oligonucleotídeos para confirmar a identidade deste inserto.

Posteriormente realizou-se uma reação de sequenciamento desta mesma construção (pQE30-Sema5B) com técnica de terminação de cadeia de Sanger (1977) usando dideoxinucleotídeos marcados com ^{33}P (ver item 3.14).

→ Figura do vetor pQE-30 e seqüência de nucleotídeos e de aminoácidos de Sema 5B estão em anexo

3.1.2 Subclonagem de QSOX de camundongo – vetor pET-32a

A seqüência codificadora da proteína quiescina sulfidril oxidase de camundongo (EMBL accession number NM 023268), que possui 1707 bp, foi subclonada no vetor de expressão pET-32a (Novagen). A seqüência subclonada corresponde a parte da seqüência codificadora e corresponde + 123 a +1646 bp (39-549 aa), e portanto possui 1533 bp.

O vetor pET-32a possui o promotor do fago T7, repressão em *cis*, confere resistência ao antibiótico ampicilina, e origina proteínas de fusão contendo seqüência de 6 histidinas. Esta última característica permite a purificação da proteína de fusão por cromatografia de afinidade em uma coluna quelante carregada com Ni^{+2} (NiNTA-agarose).

O plasmídeo recombinante deve ser amplificado em uma linhagem de *E. coli* que não contém a RNA polimerase do fago T7 para prevenir o escape de expressão da proteína recombinante e com baixa taxa de recombinação e endonucleases. Para a realização de minipreparações da construção pET 32a-QSOX usou-se a cepa DH5 α .

A expressão dos fragmentos da proteína QSOX foi feita em uma linhagem que contém a RNA polimerase do fago T7 sobre o controle de um promotor

indutível, tal como Lac UV-5, que é induzido na presença de IPTG. Logo o hospedeiro utilizado para a expressão foi BL21(DE3).

Para construir o vetor pET32a-QSOX amplificou-se por PCR a seqüência codificadora de QSOX a partir de cDNA de cerebelo de camundongo adulto. As condições utilizadas para a produção de cDNA de cerebelo foram como as descritas em SAMBROOK & RUSSEL (2001). Brevemente, o RNA total do homogenato de cerebelo foi extraído com Trizol (Invitrogen), as proteínas da amostra foram extraídas com clorofórmio e a precipitação do RNA foi realizada com a adição de isopropanol gelado. O cDNA total obtido foi amplificado de forma semelhante à reação de RT-PCR descrita em 3.13. E a obtenção do fragmento de QSOX de interesse foi realizada por uma reação de PCR subsequente usando os oligonucleotídeos:

KpnI

Forward 5' GG *GGT ACC* TAC TCG TCC TCT GA 3' ; esse oligonucleotídeo insere um sítio *Kpn I* na terminação 5';

HindIII

E o oligonucleotídeo *Reverse* 5' CCC *AAG CTT TCA* AGA AGA GTC TAT GAC GAT 3'; que insere um sítio *HindIII* e um códon de término TGA na terminação 3' do fragmento clonado.

As condições da reação de PCR foram como as descritas por SAMBROOK & RUSSELL, 2001 e os ciclos de temperatura utilizados foram: 94° C – 5 min; (94° C – 1 min; 52° C – 1 min; 72° - 4 min) esse ciclo foi repetido 35x seguido por um passo a 72° por 5 min.

O produto obtido da reação de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8 %; a banda de interesse (fragmento de 1533 bp) foi recortada e purificada com o Kit (pure link quick gel extraction Kit – Invitrogen).

O plasmídeo pET 32a foi obtido por minipreparações com o Kit (Fast Plasmid Mini Kit – Eppendorf). Cerca de 8 µg de plasmídeo foi digerido 20 U de

enzimas *KpnI* e *HindIII* (Fermentas) em um volume final de reação de 50 µl por 16 horas a 37°C. Paralelamente, procedeu-se a digestão do fragmento purificado com as mesmas enzimas. Após a digestão, submeteu-se o plasmídeo e o fragmento digeridos à eletroforese em gel de agarose 0,8%, e as bandas de interesse foram purificadas com Kit. Depois de se verificar o rendimento do material obtido, procedeu-se a reação de ligação. Nesta reação, a proporção utilizada de vetor linearizado e inserto foi: 1:5. A enzima utilizada foi a T4 DNA ligase (New England Biolab) e a reação ocorreu por 16 h a 16°C.

A triagem das colônias contendo o vetor com o inserto de interesse (pET 32-QSOX) foi realizada em duas etapas: - primeiramente 30 colônias foram tomadas e ressuspendidas em tampão de aplicação, e após a eletroforese comparou-se o padrão de migração das construções com o plasmídeo parental (pET32-QSOX) não recombinante não digerido. As colônias que apresentaram os DNAs cujas massas moleculares eram maiores que a do vetor vazio (não recombinante) foram submetidas à PCR com os primers utilizados na amplificação do cDNA de QSOX. As colônias, cujas construções apresentaram a amplificação de um produto de 1533 bp (que contém o inserto de interesse), foram crescidas em meio LB e o seu vetor extraído com uso de kit (Pure Link Quick Gel Extraction Kit – Invitrogen) – esses vetores recombinantes obtidos foram submetidos ao método de sequenciamento automático (ver item 3.14), com os oligonucleotídeos comerciais do vetor pET (T7 promoter e T7 terminator primer – Novagen) para confirmar a identidade do fragmento subclonado.

→ Figura do vetor pET-32a está em anexo juntamente com a seqüência de nucleotídeos e aminoácidos de QSOX de camundongo retratada neste trabalho.

3.2 Preparação e transformação de *E. coli* competentes

Os vetores de expressão construídos (mencionados acima) foram inseridos em bactérias através de transformação por eletroporação. Cepas bacterianas

eletrocompetentes DH5 α , M15, XL1-BLUE e BL21 foram preparadas como descrito anteriormente (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

3.3 Expansão das culturas de *E.coli* (M15, XL1-BLUE e BL21) transformadas para purificação preparativa das proteínas recombinantes de interesse

Utilizando as bactérias transformadas e plaqueadas, procedeu-se o seu crescimento para obtenção da proteína de interesse. Colônias de bactérias transformadas foram raspadas com o auxílio de palitos estéreis e inoculadas em 75 ml de meio LB contendo o antibiótico apropriado e crescidas durante à noite (a 37°C sob vigorosa agitação). Essa cultura saturada de bactérias foi inoculada em meio LB (675 ml de cultura) com antibióticos. Incubando-se novamente a 37°C sob vigorosa agitação até atingir uma Abs₆₀₀ de 0.6.

A expressão proteica foi induzida através da adição de IPTG para uma concentração final de 0,7 mM para a expressão de Sema5B rec e de 0,4 mM para QSOXrec, prosseguindo-se à incubação do cultivo por 4 horas a 37° C.

As bactérias foram sedimentadas por centrifugação à 4000 x g por 20 min e congeladas a – 70° C.

Amostras da cultura antes da indução e após a indução foram recolhidas. Essas amostras foram sedimentadas e resuspendidas em tampão de amostra redutor 1X SDS-PAGE e submetido à SDS-PAGE em gel 15% para Sema5B e 10% para QSOX.

3.4 Obtenção de extratos bacterianos

Confirmada a expressão de Sema5B na cepa M15 e de QSOX na cepa BL-21 após a indução, foi realizada a lise bacteriana.

As bactérias procedentes de cerca de 750 ml de cultivo em meio LB estavam congeladas à – 70°C. Estas foram descongeladas, resuspendidas e

homogeneizadas em 30 ml de tampão de lise U (200 mM NaCl, 20 mM Tris HCl; 8 M uréia; pH 8.0) com 10 mM de imidazol e inibidor de protease PMSF (1 mM).

A suspensão celular em tampão de lise contendo 8 M de uréia foi submetida à alta diferença de pressão fornecida pela prensa de French (French Press) a fim de se obter a lise das bactérias e, portanto, o extrato bacteriano.

Para verificar se as proteínas obtidas eram solúveis ou encontravam-se em corpos de inclusão procedeu-se lises em tampão nativo contendo detergentes neutros (tampão U sem uréia) paralelamente à lise desnaturante com tampão U contendo uréia.

Os extratos bacterianos foram mantidos no gelo durante todo o procedimento de lise e o inibidor de protease – PMSF (1 mM) – foi adicionado aos extratos durante o processo de lise e purificação.

3.5 Purificação das proteínas de interesse – Sema5B rec e QSOXrec - do extrato bacteriano em tampão desnaturante

Por meio da presença de uma etiqueta de poli histidina nas proteínas recombinantes, realizou-se a separação de Sema5B rec e QSOXrec do extrato bacteriano pela purificação das proteínas por cromatografia de afinidade a metal imobilizado.

O extrato bacteriano foi clarificado por centrifugação à 10.000 x g, a 4°C, por 30 min. O sobrenadante foi recuperado (30 ml) e incubado com 1,5 ml (*pack*) da resina Ni-NTA agarose (Qiagen) pré equilibrada em tampão U (200mM NaCl, 20mM Tris pH 8,0; 8M de uréia) acrescido de 10 mM imidazol.

Alternativamente as frações de proteína solúvel e insolúvel provenientes da lise em tampão nativo foram separadas por centrifugação. Após a centrifugação e separação do sobrenadante (proteína solúvel) e precipitado (proteína insolúvel) separou-se alíquotas destas frações para verificar por SDS-PAGE em qual delas encontravam-se as proteínas recombinantes. Após a incubação (2h) da resina com o

extrato bacteriano em tampão desnaturante, à 4° C, procedeu-se a montagem da coluna, com o empacotamento da resina. O extrato não ligado à resina foi recuperado e armazenado para ser submetido novamente a uma posterior purificação. Foi realizada uma lavagem da coluna com gradiente contínuo para a retirada gradual da uréia (de 8M para 1M), com tampão U (40 ml contendo 8M de uréia no início e no final 40 ml com 1M de uréia) acrescido de 20 mM de imidazol.

As proteínas Sema 5B e QSOX recombinantes foram eluídas da resina com tampão U acrescido de 1M de uréia e 300 mM imidazol. Foram coletadas 20 frações de 1 ml. A presença das proteínas recombinantes em cada uma das frações foi monitorada através de ensaio de Bradford em escala semi-micro empregando placas de 96 poços, conforme instrução do fornecedor (Bio-Rad).

Para confirmar a presença de proteínas nas amostras, cerca de 8 µl de cada fração foi submetida à separação eletroforética em gel de poliacrilamida, eletroeluição para membranas de nitrocelulose e reação de western blot com o anticorpo comercial anti-His tag (Qiagen).

3.6 Renaturação das proteínas recombinantes

As proteínas recombinantes Sema5B rec e QSOXrec solubilizadas em tampão de eluição desnaturante (tampão U com 1M de uréia) foram dialisadas contra PBS. Foram realizadas 3 trocas de 20 volumes de tampão durante a diálise com duração de 14 h sob 4°C. O tampão de diálise foi mantido em agitação magnética durante o período de renaturação das proteínas.

Alternativamente procedeu-se a renaturação de Sema5B com a retirada gradual de uréia. O tampão de renaturação (PBS) continha inicialmente 1 mol/l de uréia. A uréia da solução foi diluída gradativamente por gotejamento de PBS usando uma bomba peristáltica e a diálise permaneceu em agitação magnética a 4° C durante um período de 12 horas.

3.7 Ensaio de *western blot* utilizando anticorpo anti His-tag

Terminada a etapa de eluição e dosagem protéica, um ensaio de *western blot* utilizando anticorpo anti His-tag (Qiagen) foi desenvolvido, para confirmar se a expressão e purificação das proteínas recombinantes havia sido bem sucedida.

Cerca de 1.0 µg da Sema5B rec e 3.0 µg de QSOXrec não dialisadas, diluídas em tampão de amostra 3X redutor, foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (16% para Sema5B rec e 10% para QSOXrec).

A proteína resolvida por separação eletroforética foi transferida e imobilizada à membrana de nitrocelulose. Após coloração da membrana com vermelho Ponceau-S para avaliação da eficiência da transferência, a membrana foi bloqueada 1 h com TBST (120 mM NaCl; 20 mM Tris; 0.05% de Tween 20), com 5 % de leite desnatado liofilizado e posteriormente incubada com anticorpo de camundongo anti His-tag diluídos em tampão de bloqueio (diluição 1:4000) durante à noite à 4° C. Lavou-se a membrana 5 vezes (5 min cada lavagem) com TBST. A membrana foi então incubada com anticorpo anti IgG de camundongo acoplado a HRP – Horseradish peroxidase (Santa Cruz) diluído em tampão de bloqueio. Nova série de 5 lavagens foi efetivado, prosseguindo a revelação da membrana com substrato adequado para reação quimioluminescente (Amersham – Pharmacia). Um filme radiográfico (Kodak) foi exposto à membrana até obtenção do sinal adequado.

3.8 Ensaio de *western blot* para averiguar o reconhecimento de QSOXrec de camundongo pelo anticorpo comercial anti peptídeo SOX humano.

A proteína QSOX recombinante foi reagida com o anticorpo comercial anti-pep 14. Este anticorpo foi produzido pela empresa Bethyl co. conforme descrito por HOOBER *et al.*, 1999; o anticorpo foi produzido em cabra contra o peptídeo humano EDPQFPKVQWPPRE (resíduos 494-507 aa)

Imobilizou-se 10 µg de QSOX recombinante em membranas de nitrocelulose de forma semelhante à descrita no item 3.7. Após o bloqueio das membranas, incubou-se com o anticorpo anti-pep 14 em TBST contendo 5 % de leite (diluição 1:1000) O/N, à 4° C. Após 5 lavagens, as membranas foram reagidas com o anticorpo anti-cabra HRP diluído em TBST com 5 % de leite (1:2000) durante uma hora à temperatura ambiente. Após novo ciclo de 5 lavagens, procedeu-se a revelação com substrato (Amersham-Bioscience) para reação quimioluminescente.

3.9 Preparação de extratos para a obtenção de proteínas Sema5B e QSOX endogenamente expressas.

3.9.1 Preparação de membrana de cérebro e de raiz ganglionar dorsal (DRG) para obtenção de Sema5B

A preparação de membrana foi realizada de forma similar à descrita por WOODHOUSE *et al.*, 2003.

Foram preparadas membranas de cérebros de camundongos recém-natos, e de embriões (E10) e todo procedimento foi realizado em gelo. Os cérebros e a medula espinhal com as raízes ganglionares dorsais foram coletados imediatamente após a morte dos animais. Coletou-se apenas as raízes ganglionares dorsais (DRG) dos embriões (E10). Estes tecidos coletados foram lavados com PBS, e posteriormente lisados em tampão A contendo 10 mM HEPES, 1mM EDTA, 250 mM sacarose (pH 7,4) e inibidores de protease (benzamidina 10 mM, iodoacetamida 10 mM, NEM 1 mM, PMSF 1 mM, fenantrolina 10 nM). A lise foi realizada mecanicamente, passando-se estes tecidos através de uma agulha com 20-Gauge por 10 vezes. Este lisado foi incubado em gelo por 10 minutos, e posteriormente foi centrifugado à 1000 x g/10min a 4°C. O pellet resultante foi novamente resuspendido com tampão A e centrifugado a 3000 x g/10min a 4°C. Os

sobrenadantes foram combinados e centrifugados a 3000 x g/10min a 4°C. O sobrenadante recuperado desta última etapa é a preparação de membrana; sua concentração protéica foi determinada pelo método de Bradford (1976) e as alíquotas foram estocadas à -70°C.

3.9.2 Preparação de homogenato de líquido seminal de camundongo e rato para a obtenção de QSOX

O líquido seminal coletado a partir da vesícula seminal desses animais foi homogeneizado e vortexado em tampão de lise gelado (50 mM Tris HCl pH 7,4; 0,2% de deoxicolato; 0,5% de Triton X-100; 0,5% de NP-40 com inibidores de proteases Roche). O extrato, com aspecto floculado foi centrifugado a 12000 x g por 30 s e o sobrenadante recuperado teve a concentração protéica dosada por Bradford e armazenado à -20°C.

3.10 Produção de anticorpos policlonais em camundongos e coelhos

Todos os procedimentos envolvendo animais de experimentação foram submetidos à aprovação da comissão de ética em experimentação animal – Setor de Ciências Biológicas – UFPR, a qual forneceu o certificado de aprovação número 103.

As proteínas purificadas foram utilizadas na imunização de camundongos BALB/c e coelhos (Sema5B rec) ou só coelhos (QSOX). Os camundongos receberam as injeções intraperitonealmente, sendo a 1ª imunização efetivada com adjuvante completo de Freund e as imunizações subsequentes com óleo mineral. A concentração do antígeno (Sema 5B rec) ministrada foi de 50 µg por imunização; e o intervalo entre as imunizações foi de 3 semanas (HARLOW & LANE, 1989).

Para a imunização dos coelhos, injetou-se cerca de 130 µg de Sema ou de QSOX presente em uma emulsão e 100 µg separados por eletroforese em gel de

poliacrilamida, que foi macerado em PBS. Os animais receberam as injeções por duas vias: subcutânea e intramuscular. A primeira imunização foi realizada com adjuvante completo de Freund e as imunizações subsequentes com óleo mineral. O intervalo entre as imunizações foram entre 4 a 6 semanas (HARLOW & LANE, 1989).

Para verificar a produção de anticorpos, amostras de soro foram coletadas através da sangria dos camundongos e coelhos. O sangue foi obtido através do plexo orbital dos camundongos com o auxílio de pipetas Pasteur de vidro, em torno de 10 dias após a última imunização (a coleta de soro foi feita após a 4ª imunização e reforços subsequentes). A coleta do soro dos coelhos foi realizada por punção cardíaca, 14 dias após o último reforço (a coleta foi feita após a 3ª e 6ª imunizações).

Após a obtenção do soro hiperimune contra QSOX em coelho, purificou-se IgG por cromatografia de afinidade a proteína A-sepharose (protein A sepharose CL-4B – Pharmacia Biotech Amersham). Purificou-se cerca de 2,5 ml de soro e o procedimento foi realizado conforme as recomendações do fabricante.

3.11 Averiguação da produção de anticorpos anti Sema5B e anti QSOX

Utilizando o soro hiperimune coletado dos camundongos BALB/c e dos coelhos, foram realizados ensaios de *western blot* para testar se os soros obtidos reconheceriam a Sema5B recombinante e aquela presente em preparações de membrana de cérebro de camundongo; e QSOX recombinante e endogenamente produzida pela vesícula seminal de camundongo e rato. Os títulos dos soros α -QSOX também foram acompanhados por ELISA.

3.11.1 ELISA utilizando soro hiperimune anti QSOX para verificar o título do soro

O antígeno (proteína recombinante QSOX) foi diluído para 0.2 μ g/50 μ l em tampão de sensibilização (tampão carbonato 0.1 mol/l; pH 9.6). Adicionou-se 50 μ l

de solução de antígeno em cada poço em placa de poliestireno para ELISA. A placa foi incubada por 12 horas a 37° C, esvaziada e lavada 5 vezes com tampão de lavagem (PBS com 0,05 % de Tween 20). Para o bloqueio, foram adicionados a cada poço 100 µl de tampão de lavagem com 1% de BSA. Incubou-se a placa a 37° C por uma hora, seguida de ciclo de 3 lavagens. Foi feita uma diluição seriada na placa num volume de 50 µl por poço, a partir da segunda coluna. A diluição inicial foi de 1:100 e a final de 1:12800. Incubou-se novamente a placa por 1 h a 37° C. Um novo ciclo de 5 lavagens foi efetivado. Foram adicionados 50 µl por poço de solução de anticorpo secundário anti IgG de camundongo acoplado a HRP (Santa Cruz) diluído em tampão de bloqueio. As placas foram incubadas por mais 1 h a 37° C. Novo ciclo de lavagens foi efetivado. Procedeu-se uma lavagem com 50 µl de tampão citrato (pH 5.0). A revelação foi feita com o OPD (o-dihidroclorato de fenilenodiamina) em tampão citrato contendo H₂O₂. Para parar a reação foram adicionados 100 µl de H₂SO₄ 4 M. A leitura dos resultados foi feita em leitor de placas com comprimento de onda a 490 nm.

3.11.2 Western blot utilizando IgG purificada anti-QSOX para averiguação da produção de anticorpos anti-QSOX

Verificando a produção de anticorpos policlonais anti-QSOX realizou-se ensaios de *western blot*. Preparou-se ensaios distintos para verificar a presença de anticorpos anti-QSOX na IgG purificada de coelho imunizado. Um ensaio desafiou QSOXrec e outro foi reagido com QSOX nativa, ambas proteínas estavam imobilizadas em membrana de nitrocelulose.

Extratos de vesícula seminal de camundongo e rato (35 µg de extrato por canaleta) foram separados eletroforicamente em gel de poliacrilamida 10% SDS-PAGE e transferidos para membrana de nitrocelulose (1h; 100V).

De forma semelhante, 0.2 µg de QSOXrec foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida 10 % SDS-PAGE e eletroeluída para membranas de

nitrocelulose. Estas membranas contendo QSOXrec e QSOX nativa foram bloqueadas com tampão de bloqueio, TBST contendo 10% de leite, e incubadas com a IgG purificada anti-QSOX produzida em coelho diluída em tampão de bloqueio (1:500) O/N. O restante do ensaio foi procedido conforme descrito previamente (item 3.11.3) para a proteína Sema 5B.

3.11.3 Western blot utilizando o soro hiperimune anti-sema para averiguar o reconhecimento da proteína Sema5B

Foram realizados ensaios de *western blot* para verificar a produção de anticorpos policlonais anti Sema5B pelos animais imunizados.

Um destes ensaios utilizou preparação de membrana de cérebro de camundongos e outro utilizou a proteína Sema5B rec. Submeteu-se as preparações de membrana de cérebro e de DRG de camundongos pós natos (P0 e P1) e embrião (E10) (150 µg por canaleta) à eletroforese SDS-PAGE 8.5%. O extrato proteico resolvido por separação eletroforética foi imobilizado à membrana de nitrocelulose em tampão de transferência (25 V – O/N). A eficácia da transferência foi averiguada corando-se a membrana com o corante vermelho Ponceau-S.

Paralelamente, a proteína Sema5B rec purificada foi submetida à eletroforese SDS-PAGE em gel 15 %, (10 µg de proteína recombinante/canaleta).. Essa proteína foi transferida para membrana de nitrocelulose em condições similares às descritas acima para a preparação de membrana de cérebro de camundongo.

Após a transferência e imobilização das proteínas às membranas de nitrocelulose – extrato de cérebro e proteína recombinante – bloqueou-se as membranas durante 1 hora com TBST contendo 10% de leite desnatado liofilizado; posteriormente, incubou-se as membranas com soros hiperimunes dos camundongos e de coelho diluídos em tampão de bloqueio (1:500), O/N.

Lavou-se a membrana 5 vezes (5 min/lavagem), a seguir incubou-se a membrana reagidas com o soro hiperimune de camundongo com um anticorpo

secundário anti IgG de camundongo-HRP (Amersham) diluído em tampão de bloqueio (1:15000) durante 50 minutos. E a membrana incubada com o soro hiperimune do coelho foi reagida com anticorpo secundário anti IgG de coelho – HRP (Amersham) diluído em tampão de bloqueio (1:20000) durante 50 minutos. As membranas foram lavadas novamente 5 vezes com TBST e reveladas com o substrato adequado para a reação quimioluminescente (Amersham – Pharmacia). Um filme radiográfico foi exposto à membrana até obtenção do sinal adequado.

3.12 Ensaio de competição utilizando os anticorpos anti-Sema5B, anti-QSOX e anti-pep 14.

A fim de se demonstrar a especificidade dos anticorpos produzidos contra Sema5B, e QSOX, e demonstrar a presença de SOX em soro fetal bovino, realizou-se ensaios de competição. Estes ensaios consistiram em incubar os anticorpos anti-Sema5B, anti-QSOX e anti-pep 14 com as proteínas recombinantes produzidas antes de reagir os anticorpos contra proteínas imobilizadas em membranas de nitrocelulose.

3.12.1 Bloqueio do reconhecimento do anticorpo policlonal de coelho anti-QSOX

Realizou-se um ensaio de competição bloqueando-se o reconhecimento do anticorpo anti-QSOX. Para tal finalidade, um ensaio de western blot como descrito no item 3.13.3 foi realizado.

Extrato de líquido seminal de camundongo e de rato foram reagidos com o anticorpo policlonal anti-QSOX (Ig G purificada) previamente incubados com a proteína QSOX recombinante purificada e dialisada. Incubou-se 2 μ l [$1,7 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$] de IgG anti-QSOX com 50 μg de QSOXrec (volume final: 500 μ l de proteína solúvel em PBS) durante 1.5 h a 4° C sob agitação. Após esse período, completou-se o

volume para 1 ml com TBST leite 10 % e a (diluição final do anticorpo 1:1000). A incubação do anticorpo anti-QSOX, lavagens, incubação do anticorpo anti IgG de coelho e a revelação, foram realizados conforme descrito no item 3.11.3.

3.12.2 Ensaio de competição do anticorpo anti-pep 14 com QSOX recombinante

Cerca de 20 µl de soro fetal bovino diluído 50X foi submetido à SDS-PAGE em gel 10 %. O soro foi então eletroeluído para membranas de nitrocelulose, e o bloqueio das membranas foi efetivado com TBST acrescido de 5 % de leite mólico desnatado. O anticorpo anti-pep 14 foi pré incubado com 50 µg de QSOXrec diluída em 500 µl de PBS por 1.5 h a 4° C com agitação. Após essa incubação adicionou-se a essa solução 500 µl de TBST 10 % de leite (diluição final do anticorpo anti-pep 14 1:1000). Como controle da reação foi utilizado o anticorpo anti-pep 14 pré incubado apenas com PBS.

Após 5 lavagens com TBST, as membranas foram incubadas com anticorpo anti cabra HRP (colocar fabricante) diluição 1:2000 em TBST 5 % de leite. As membranas foram lavadas novamente com TBST e reveladas com o substrato adequado.

3.12.3 Ensaio de competição do anticorpo anti-Sema5B com a proteína Sema5B recombinante

De forma semelhante, para confirmar a identidade da proteína reconhecida pelo anticorpo anti-Sema5B na preparação de membrana de cérebro do item (3.11.3) um ensaio de bloqueio incubando-se soro anti-Sema5B purificada com Sema5B recombinante foi realizado. Conforme descrito para o ensaio de bloqueio de QSOX, o soro anti-Sema5B (2 µl) foi incubado com 5 µg de Sema5B recombinante purificada em PBS; volume final 500 µl. Adicionalmente, o soro anti-Sema5B foi incubado com extrato bacteriano (15 µl de extrato de M15 não transformada),

diluídos em 500 µl de PBS, para demonstrar que a proteína reconhecida no extrato de cérebro era Sema 5B e não outra proteína com epítomos semelhantes à proteínas bacterianas. Como controle da reação incubou-se soro anti-Sema diluída em PBS.

Sema5B rec, soro, extrato de bactérias e PBS foram incubados durante 1,5 h a 4°C sob agitação. Após esse período, o soro diluído em PBS contendo a proteína Sema5B, extrato bacteriano ou apenas PBS, foi reagido com as preparações de membranas de cérebro separadas eletroforicamente e imobilizadas em membranas de nitrocelulose conforme descrito no item 3.11.3.

3.13 Subclonagem de domínios distintos de Sema5B – vetores pET28a e pGEX-2T

Com o intuito de se obter proteína para produção de anticorpos e para realização de ensaios de “pull-down” e ensaios *in vitro* com semaforina 5B decidiu-se subclonar parte da região extracelular de Sema5B (domínios Sema + PSI – resíduos 45 a 550 aa) e o domínio citoplasmático integral (citoplasmático – resíduos 1000 a 1093 aa) em vetores de expressão para a produção destes domínios recombinantes em bactéria. Lembrando que a sequência codificadora da proteína Semaforina 5B possui 3282 bp e codifica uma proteína transmembrânica de 1093 aa (massa molecular predita: 120 kDa).

Ambos domínios serão subclonados nos vetores pET-28a (Novagen) e pGEX-2T (GE-Healthcare). Partes da sequência codificante para Semaforina 5B foram amplificadas por PCR a partir do cDNA de cérebro de camundongos P7 (7 dias pós-natos). A concentração de sais (e.g. MgCl₂) e concentração dos primers e dNTPs foram baseados em protocolos descritos por SAMBROOK & RUSSELL, 2001. Todas as reações foram acompanhadas de um controle negativo (todos os componentes da reação, exceto o cDNA).

Extraíu-se RNA total a partir de 30 mg de cérebro usando o Kit – RNeasy MiniKit (Qiagen); após a extração do RNA total, procedeu-se uma reação de RT-PCR com Kit da Promega e uso de oligo-dT (poli T) para produção de cDNAs a

partir de RNA total. As condições da RT-PCR foram: 70° C – 5 min; banho em gelo – 3 min e incubação em banho aquecido a 42° C por 2 h. A amplificação das seqüências foi feita a partir deste cDNA obtido.

Os oligonucleotídeos utilizados na amplificação da porção extracelular de Sema (133 – 1649 bp) foram:

EcoRI *NdeI*

----- -----

Forward Sema+PSI 5'GT *GAA TTC* AT *CAT ATG* CAC CCC ATC GTC GCC
TTT G3'

EcoRI *NdeI*

----- -----

Reverse Sema+PSI 5'CC *GAA TTC* C *CAT ATG TCA* CCG TGT CAC ATT TCG
TAC AGG3'

O sítio *EcoRI* será digerido no fragmento para a clonagem no vetor pGEX 2T; e o sítio *NdeI* será digerido para clonagem no vetor pET-28a.

As condições da reação de PCR para a subclonagem do domínio Sema + PSI foram: 95° C por 4min; (95° C – 30 s; 57° C – 45 s; 72° C – 2 min) esse ciclo foi repetido 35x e 72° - 10 min; gerando um produto com 1516 bp. Realizou-se essa reação variando a temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos; utilizou-se 60° C, porém houve uma menor amplificação do produto desejado; portanto para realizar a clonagem manteve-se a temperatura de anelamento em 57° C.

E os oligonucleotídeos utilizados na amplificação da porção citoplasmática de Sema 5B (2998 a 3282 bp) foram:

BamHI *NdeI*

----- -----

Forward citoplasmático 5'CG *GGA TCC* *CAT ATG* TCT TGC CAG CAC TGC
CAG C3'

BamHI

Reverse citoplasmático 5'CG *GGA TCC TCA* GCT GTT GGG GAA ACA GCG
CTG TCC AGG T 3'

O sítio *Bam*HI será digerido no fragmento para a clonagem no vetor pGEX 2T e os sítios *Nde*I e *Bam*HI serão digeridos para clonagem no vetor pET-28a.

As condições da reação de PCR para a subclonagem do domínio citoplasmático foram: 95° C – 4 min; (95° C – 30 s; 60° - 45 s; 72° C – 2 min) esse ciclo foi repetido 35x e 72° - 10 min; gerando um produto com 284 bp.

3.14 Reações de sequenciamento

Para as reações de sequenciamento “automático” foi utilizado o Kit ABL Prism™ Big Dye Termination Cycle Sequencing Ready Reaction (PerkinElmer) conforme instruções do fabricante, e o processamento das mesmas foi realizado no seqüenciador automático ABL Prism 377 DNA Sequencer (PerkinElmer).

E as reações de sequenciamento com leitura “visual” – técnica de terminação da cadeia de Sanger (1977), com dideoxynucleotídeos marcados com ³³P usou-se o Kit Redivue ³³P labeled DNA sequencing reaction (AmershamBiosciences) conforme as instruções do fabricante.

4 Resultados e discussão

4.1 Sema5B

4.1.1 Verificação da subclonagem do cDNA correspondente à região citoplasmática de Sema 5B no vetor plasmidial pQE30

Logo após o recebimento do plasmídeo pQE30-Sema5B, cedido gentilmente pelo Dr. Andreas Püschel (Max-Planck Institut – Frankfurt), procedeu-se uma reação de PCR com oligonucleotídeos específicos flanqueadores do sítio de policonagem do vetor. Como produto desta reação obteve-se um fragmento de 600 bp (figura 5).

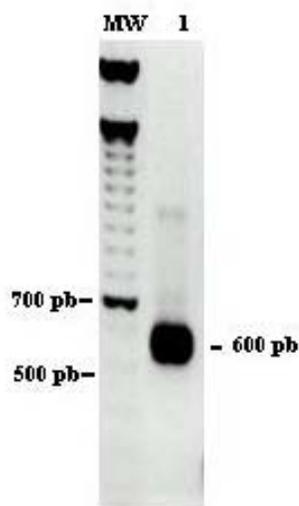


Figura 5: Eletroforese do fragmento clonado no vetor plasmidial pQE 30 amplificado por PCR com os primers comerciais do vetor. O produto da amplificação do fragmento presente no sítio de clonagem (linha 1), foi resolvido por separação eletroforética em gel de agarose 1%, e corado com brometo de etídio. Verifica-se a presença de um fragmento de 600 pb. O marcador de massa molecular (MW) utilizado foi o GeneRuler 1 kb DNA ladder plus (Fermentas).

Posteriormente a essa análise que demonstrou a presença de um inserto no sítio de policonagem, realizou-se uma reação de sequenciamento pelo método de terminação de cadeia utilizando dideoxinucleotídeos fluorescentes – e a reação foi

lida em sequenciador automático. Esta reação foi realizada pois: a) A sequência clonada era desconhecida – o grupo da Alemanha não soube informar qual fragmento estava clonado, bem como, os sítios de restrição utilizados na clonagem; b) tinha-se o intuito de reclonar o fragmento em outro vetor (série pGEX – GE Healthcare). Assim, para tal finalidade precisava-se conhecer as enzimas utilizadas na digestão do vetor e fragmento.

Somando-se a estes problemas, o produto oriundo desta reação de sequenciamento automático apresentava muitos erros, o que não permitia inferir de forma exata qual seqüência da proteína Sema5B havia sido clonada, bem como os sítios de restrição utilizados na clonagem. A fim de se obter maior acuracidade nos dados da seqüência procedeu-se a realização de uma reação de sequenciamento com leitura “visual” – método de terminação de cadeia por dideoxinucleotídeo marcado com ^{33}P (Sanger *et al.*, 1977).

Por meio da seqüência obtida a partir deste último sequenciamento pôde-se inferir que os sítios utilizados na clonagem foram *Bam*HI e *Kpn*I; e concluiu-se que a proteína codificada trata-se de uma quimera contendo a região citoplasmática de Semaforina 5B a partir do resíduo 3008 aa fusionada a um peptídeo desconhecido (o programa “BLAST” identificou um peptídeo com homologia a seqüências presentes em *Oriza sativa* – popularmente conhecido como arroz).

O produto da reação de sequenciamento com leitura “visual” demonstrou que a seqüência obtida com o *primer Forward* está em fase de leitura e codifica Sema5B a partir do resíduo 3008 aa e corresponde à seqüência : 5' CACT GCCAGCGCCAGTCTCAGGAGTCCACGCTTGTCCATCCTGCCACACCTAAC CACTTGCACTGCAAGGGTGG 3'; e a seqüência obtida com o *primer Reverse* codifica o peptídeo desconhecido de *Oriza sativa* e corresponde a: 5'GGGGGGAGCTCCAGCTGCCATAGCTATTCGTA ACTACCCATGGAGTCG ACAACCCTTTGT 3'

Porém, a descoberta de que a construção pQE30-Sema5B codificava uma quimera (região citoplasmática de Sema5B + peptídeo desconhecido) só foi

realizada 14 meses após o início dos experimentos com o uso do sequenciamento com leitura “visual”. No momento da descoberta, já haviam sido feitos vários experimentos: expressão da proteína recombinante, imunização de coelhos e camundongos, produção de anticorpos policlonais em coelhos e ensaios de *western blot* com o soro obtido.

No caso da produção de anticorpos e antígenos recombinantes, a construção de quimeras entre o gene de interesse e outro codificante para proteínas não relacionadas à espécie que será utilizada nos protocolos de imunização pode ser uma estratégia interessante. Esta metodologia permite uma espécie de “sabotagem” do sistema imune quando o antígeno de interesse é muito conservado entre as diversas espécies de animais normalmente utilizadas na prática da obtenção de anticorpos. Procedimento semelhante é utilizado há mais de 20 anos na obtenção de anticorpos policlonais contra peptídeos. Neste procedimento emprega-se a proteína KLH (hemocianina de um tipo de molusco) principalmente como carreador protéico (massa molecular 2000 kDa). Esta é oriunda de molusco e mostra-se como potente imuno-estimulador da resposta humoral em coelhos e roedores, muito provavelmente pela diferença filogenética entre moluscos e mamíferos (HARLOW & LANE, 1989).

Por outro lado, a utilização de tais quimeras pode levar à produção de anticorpos policlonais que reconheçam epítomos conservados em outras proteínas, levando à produção de um soro hiperimune pobre em imunoglobulinas específicas para o antígeno de interesse e eventualmente apresentando alta inespecificidade.

Levando em consideração a conjuntura apresentada acima, este trabalho foi desenvolvido conforme o esquema denotado a seguir:

Organograma do trabalho relativo à proteína Sema5B:

recebimento do vetor pQE30-Sema5B – construção fornecida pelo Instituto Max-Planck Frankfurt



observação da presença de um inserto no sítio de policlonagem com a realização de PCR de colônia com oligonucleotídeos comerciais do vetor



reação de sequenciamento automático

o produto desta reação continha muitos “erros” – porém, programas de alinhamento identificaram o inserto como codificador da região citoplasmática de Sema5B



esta construção (pQE30-Sema5B) foi usada na expressão da proteína Sema5B rec na estirpe bacteriana XL1-BLUE e M15



a proteína Sema5B rec obtida foi purificada por IMAC



Sema5B purificada foi usada da imunização de coelhos e camundongos



o soro hiperimune foi utilizado em ensaios de *western blotting* demonstrando que o soro é capaz de reconhecer Sema5B rec e Sema5B endogenamente expressa em tecido nervoso

Devido a problemas de solubilidade protéica de Sema5B rec, presença de muitos “erros” no sequenciamento automático, e levando-se em considerando o intuito de se reclonar o inserto presente na construção pQE30-Sema5B realizou-se outra reação de sequenciamento, com leitura “visual”, da construção pQE30-Sema5B.

esta reação demonstrou que a construção contém um cDNA codificador de uma quimera: região citoplasmática de Sema5B + peptídeo desconhecido de *Oriza sativa*



assim novas subclonagens de Sema5B estão sendo realizadas;

estas correspondem à subclonagem da porção citoplasmática de Sema5B (resíduo 1000 à 1093 aa) e parte da região extracelular de Sema5B (domínios Sema + PSI – resíduos 45 à 550 aa)

os produtos obtidos nesta etapa serão inseridos nos vetores pET28a e pGEX 2T para futuras expressões de Sema5B rec

4.1.2 Transformação e expansão das culturas de *E. coli* para purificações preparativas: expressão de Sema5B (porção citoplasmática) clonada no vetor pQE30.

Verificada a presença do cDNA codificante da provável região citoplasmática de Sema5B no vetor pQE30, prosseguiu-se a preparação e transformação de *E. coli* competentes (cepas M15 e XL1-BLUE) e expansão das culturas de bactérias transformadas. Estas etapas foram realizadas logo após o recebimento da construção pQE30-Sema5B, e confirmação da identidade da subclonagem por reação de sequenciamento automático

Verificando a efetivação da transformação e expressão de Sema5B em M15, separou-se alíquotas de 1 ml do cultivo bacteriano induzido e não induzido. As amostras foram submetidas à eletroforese, e *western blot* utilizando anticorpo comercial (Qiagen) contra etiqueta de 6 histidinas que revelou a presença de semaforina 5B recombinante nas amostras induzidas (figura 6).



Figura 6: As amostras do cultivo bacteriano não induzido (linha 1) e induzido (linha 2) foram submetidas à eletroforese em gel 15% SDS-PAGE, transferidas para membrana de nitrocelulose e reagidas com anticorpo anti-His (Qiagen). Visualiza-se o aparecimento de uma banda com aproximadamente 15 kDa, denotando a expressão da provável proteína quimérica Sema5B rec no sistema heterólogo.

4.1.3 Verificação da solubilidade da Sema 5B recombinante produzida

Procedeu-se lises bacterianas em tampão U nativo e submeteu-se esses extratos à eletroforese em gel de poliacrilamida para verificar se as proteínas expressas eram solúveis ou estavam presentes em corpos de inclusão. Verificou-se que a maior parte das proteínas encontravam-se presentes em corpos de inclusão (resultado não mostrado).

Tentou-se otimizar a expressão de Sema5B para obtenção de proteína solúvel. Para tanto, variou-se a concentração de IPTG utilizada (0,4 mM e 0,7 mM) e temperaturas de indução à 37° C e 32° C; porém sob essas condições a proteína continuou presente em corpos de inclusão (resultados não apresentados). Assim a purificação de semaforina 5B foi realizada em tampão desnaturante.

As condições utilizadas para a expressão de Semaforina 5B foram: inoculação do cultivo com a cultura crescida O/N (pré-inóculo) numa diluição de 1:10; temperatura de crescimento e indução 37° C; início da indução quando a $Abs_{600}=0,5$; concentração de IPTG de 0,7 mM e indução de 4 h.

Testou-se diferentes tampões para a lise e purificação de Sema5B rec. Esses tampões consistiram no uso de uma solução com 500 mM de NaCl, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 10 % de glicerol. Para solubilizar as proteínas testou-se detergentes: 0,5 % de Triton X-100; 0,5 % de Tween 20; ou 0,5 % de sarcosil. Não houve solubilização das proteínas dos corpos de inclusão com o uso de detergentes neutros (Triton X-100; Tween 20); logo não se prosseguiu protocolos de purificação com o uso destes detergentes (resultados não mostrados).

O único detergente que solubilizou satisfatoriamente as proteínas insolúveis foi o sarcosil. Testou-se o uso de sarcosil paralelamente ao protocolo com o uso de uréia (utilizado na maior parte dos experimentos de purificação). Apesar do rendimento da purificação com tampão contendo sarcosil ser semelhante ao da purificação com uso de uréia (sob as condições de expressão e purificação descritas em metodologia), houve maior presença de contaminantes após a purificação.

Portanto, preferiu-se purificar as proteínas recombinantes com uréia, pois a presença de proteínas contaminantes era menor em relação à purificação com sarcosil.

4.1.4 Purificação das proteínas Sema5B rec por cromatografia de afinidade (IMAC)

Posteriormente à confirmação da expressão das proteínas recombinantes, procedeu-se a realização da lise bacteriana por métodos físicos e químicos, bem como a purificação de Sema5B rec por cromatografia de afinidade a metal imobilizado (ver detalhes em metodologia – item 3.5).

Foram realizados ensaios de Bradford e submissão das diferentes frações eluídas à eletroforese SDS-PAGE, a fim de se testar a presença de proteínas purificadas a partir do extrato bacteriano. Ambos os ensaios demonstraram a presença de proteínas nas diferentes alíquotas obtidas da purificação cromatográfica, confirmando a eluição da proteína ligada à resina Ni-NTA agarose (resultados não mostrados).

Sema5B rec foi dialisada conforme descrito em metodologia (item 3.6). Sema5B rec precipitava durante a diálise, independentemente da concentração protéica, bem como das condições de crescimento e indução bacterianas (em M15 e XL1-Blue) testadas. Testou-se o uso de diálise com a retirada gradual da uréia, que também resultou em Sema5B insolúvel.

Um dos objetivos iniciais do projeto era a realização de ensaios de “pull-down” com Sema5B rec com o intuito de se isolar proteínas que poderiam interagir com o domínio citoplasmático de Sema5B. Entretanto para tal fim é necessária a obtenção da proteína solúvel em tampão não desnaturante. Este tampão deve ser compatível com a resina utilizada (neste caso compatível com resina Ni-NTA agarose) e o tampão deve possuir uma baixa estringência, e.g. baixa concentração de detergentes - que sejam preferencialmente neutros, a fim de permitir a interação proteína-proteína ou proteína-efetor.

Uma vez que Sema5B rec precipitava durante a retirada de uréia, não foi possível a realização de ensaios de “pull-down”. Logo, um dos propósitos futuros de se reclonar a porção citoplasmática de Sema5B no vetor pGEX é obter proteína solúvel. Pois o vetor pGEX origina uma proteína recombinante contendo a proteína glutationa S-transferase na porção amino-terminal, a qual pode aumentar a solubilidade da proteína recombinante. O domínio citoplasmático de Sema5B também será reclonado no vetor pET-28a – pois uma das metodologias para obtenção da proteína solúvel é testar diferentes vetores de clonagem e distintas estirpes bacterianas para expressão proteica.

A reclonagem também será realizada, pois a construção utilizada neste trabalho (pQE30-Sema5B) origina uma quimera protéica desconhecida. O peptídeo fusionado à Sema 5B pode interagir indesejavelmente com proteínas presentes em extratos de cérebro, por exemplo, nos ensaios de *pull down* (ligação), obtendo-se assim um resultado inconsistente que constitui apenas um artefato de ligação inerente à quimera.

4.1.5 Ensaio de *western blot* utilizando anticorpo anti His-tag

As amostras das proteínas não dialisadas foram submetidas à eletroforese em SDS-PAGE e imobilizadas à membrana de nitrocelulose.

Incubando-se a membrana com anticorpos anti His-tag-HRP e revelação com substrato adequado, observou-se o aparecimento de uma banda de aproximadamente 15 kDa para Sema5B rec (figura 7), demonstrando a obtenção e purificação da proteína de interesse Sema5B rec fusionada à uma sequência de 6 histidinas.

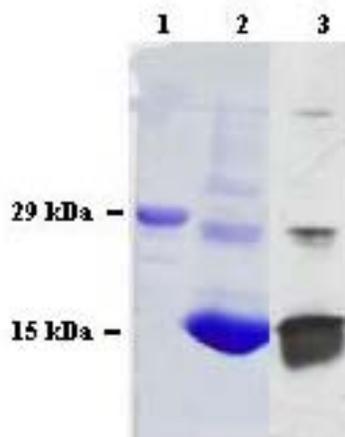


Figura 7: Sema5B rec purificada e submetida à eletroforese e corada com azul de coomassie ou imobilizada em membrana de nitrocelulose e reagida com anticorpo comercial anti-his tag (Qiagen). 25 µg da proteína recombinante purificada foi resolvida por separação em SDS-PAGE 16%. Parte do gel foi corada (linha 2) com azul de coomassie e outra parte foi eletrotransferida (linha 3) para membrana de nitrocelulose que posteriormente foi incubada com anticorpo anti His-tag. Observa-se a presença de uma banda específica de 15 kDa correspondente à Sema5B rec e a presença de algumas proteínas contaminantes juntamente com Sema5B (linha 2). Aparentemente Sema5B rec também ocorre como múltímeros (visualiza-se uma banda com cerca de 26 kDa no gel corado e na reação com o anticorpo anti-His tag). Linha 1 marcador de massa molecular anidrase carbônica.

4.1.6 Averiguação da produção de anticorpos policlonais anti-Sema5B

A proteína Sema5B rec foi utilizada na imunização de camundongos BALB/c e coelhos. Com o intuito de se testar a produção de anticorpos anti Sema5B pelos animais imunizados, realizou-se ensaios de *western blot*.

Soro hiperimune de coelho e de camundongo anti-sema5B foi reagido com a proteína Sema5B rec e preparação de membrana de cérebro de camundongo em ensaios de *western blot* (figuras 8, 9, 10, 11, 12).

4.1.7 Ensaio de *western blot* utilizando a proteína Sema5B rec immobilizada à membrana de nitrocelulose

A detecção de anticorpos específicos anti Sema5B rec presentes nos soros hiperimunes de coelho (figura 8) e camundongo (figura 9) foi realizada pelo uso de *western blot* utilizando a proteína recombinante previamente immobilizada em membranas de nitrocelulose.

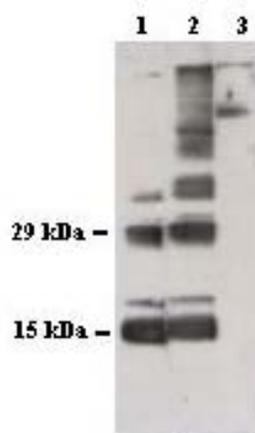


Figura 8: Reação de *western blot* denotando o reconhecimento da proteína Sema5B rec pelo soro anti-Sema5B produzido em coelho. Soro hiperimune (linha 2) reconheceu fortemente Sema5B rec (2 µg de proteína), monômeros (15 kDa), prováveis multímeros e proteínas bacterianas de alta massa. Controles da reação: 10 µg de Sema5B rec incubados com o anticorpo anti His-tag (linha 1) e soro pré imune de coelho (linha 3). Pela comparação das bandas obtidas, verifica-se que o soro reconhece Sema5B recombinante, embora reconheça proteínas bacterianas.

Após a revelação do ensaio, pôde-se observar que os soros policlonais reconheceram bandas distintas correspondentes a proteínas com massas moleculares diferentes (figuras 8 e 9). Esperava-se que os soros reconhecessem apenas a proteína Sema 5B rec na forma de monômero (15 kDa). Porém os soros reagiram com proteínas com massas moleculares maiores do que 15 kDa. Esse reconhecimento pode ser ocasionado pela presença da proteína recombinante Sema5B na forma de multímeros.

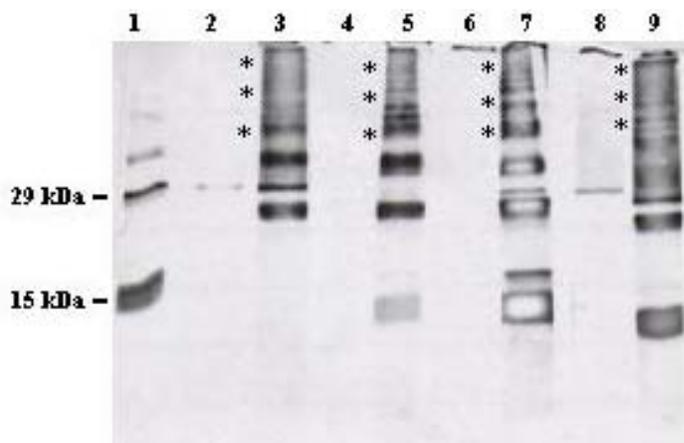


Figura 9: Reação de *western blotting* utilizando membranas sensibilizadas com a proteína Sema5B rec (purificada) reagidas com soros de camundongos imunizados. Soros hiperimunes (linhas 3, 5, 7 e 9) reconhecem a proteína recombinante (5 µg de proteína/lane) - monômeros (15 kDa) e prováveis multímeros. Observa-se um forte reconhecimento de proteínas bacterianas com massas moleculares acima de 29 kDa denotadas nesta figura com asteriscos. Linha 1 controle positivo - anticorpo anti His-tag (Qiagen). Linhas 2, 4, 6 e 8 soros pré-imune dos camundongos.

Além disso, proteínas de alta massa molecular não reconhecidas pelo anticorpo anti-His (figuras 8 e 9) e que reagem com os anticorpos policlonais produzidos sugerem que imunoglobulinas direcionadas contra antígenos de *E. coli* estão presentes em altas concentrações nestes soros hiperimunes. Tal fato pode ser conseqüência das proteínas bacterianas contaminantes purificadas juntamente com a proteína recombinante, sendo utilizadas na imunização dos animais, gerando-se assim anticorpos específicos contra proteínas bacterianas.

4.1.8 Ensaio de *western blot* utilizando preparações de membrana de cérebro e de raiz ganglionar dorsal (DRG) de camundongos imobilizadas à membrana de nitrocelulose com os soros hiperimunes gerados contra Sema5B

As preparações de membrana de cérebros de camundongos pós natos (P0 e P1) e embriões (E10) foram resolvidas por SDS-PAGE 8,5 %, transferidas para membranas de nitrocelulose e reagidas com os soros hiperimunes de coelho e

camundongos. A revelação da reação apresentou o reconhecimento de uma proteína específica com massa molecular de aproximadamente 70 kDa, que não é reconhecida pelo soro pré-imune destes animais (figuras 10, 11).

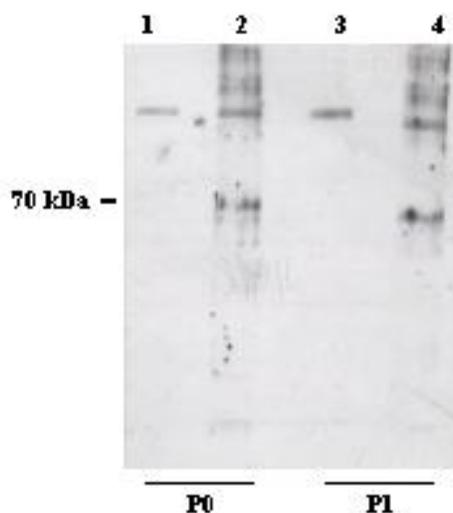


Figura 10: Reação de *western blot* utilizando preparações de membrana de cérebro de camundongos pós natos P0 (linhas 1 e 2) e P1 (linhas 3 e 4) imobilizadas em membranas de nitrocelulose e reagidas com soro de camundongo anti Sema5B. O soro hiperimune de camundongo (linhas 2 e 4) contra Sema5B reconheceu uma banda de 70 kDa. Essa banda foi reconhecida nas preparações de membrana de cérebro de animais pós natos P0 e P1. Nenhuma proteína de massa molecular semelhante à 70 kDa foi reconhecida quando soro pré imune de camundongo foi utilizado (linhas 1 e 3);

Visualiza-se que os soros hiperimune de coelho (figura 11) e de camundongos (figura 10) reconhecem uma proteína de 70 kDa – que provavelmente corresponde à proteína Sema5B. Como descrito em metodologia (item 3.11.3) aplicou-se a mesma massa de proteínas nos géis e os extratos usados nestes ensaios eram oriundos de um mesmo lote. A averiguação da transferência com o corante vermelho Ponceau-S denotou a transferência das proteínas dos géis para as membranas com igual intensidade nos ensaios apresentados nas figuras 10 e 11 (resultado não mostrado).

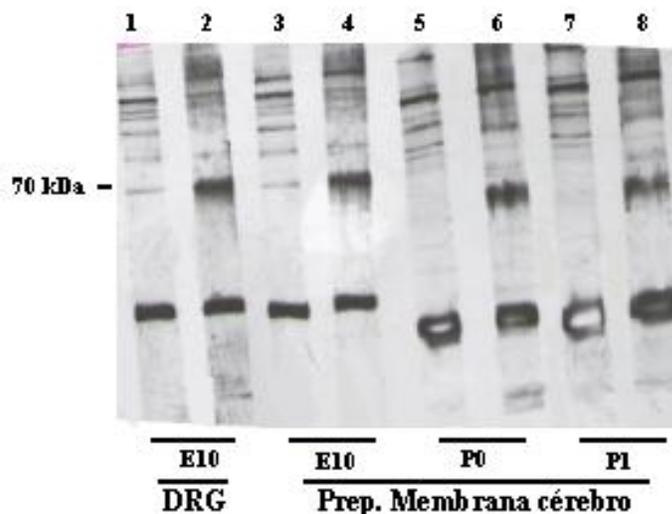


Figura 11: Reação de *western blot* utilizando preparações de membrana de cérebros de embriões (E10) de camundongos (linhas 3 e 4), de DRG destes mesmos embriões (linhas 1 e 2) e de preparações de membrana de camundongos pós natos P0 (linhas 5 e 6) e P1 (linhas 7 e 8), imobilizados em membrana de nitrocelulose e reagidos com soro hiperimune de coelho contra Sema5B. Este soro (linhas 2, 4, 6, 8) reconheceu uma proteína de cerca de 70 kDa que não foi reconhecida pelo soro pré-imune de coelho (linhas 1, 3, 5, 7). Esta proteína foi reconhecida tanto nas preparações de membrana embriônica de DRG (linha 2) e de cérebro (linha 4). Essa mesma proteína foi reconhecida nas preparações de membrana de cérebros de camundongos pós natos P0 (linha 6) e P1 (linha 8).

Então a diferença no reconhecimento dos soros dos camundongos e dos coelhos não é devida à diferença da quantidade de proteína e amostras aplicadas e sim às diferenças no reconhecimento de Sema5B pelos soros. Comparando-se as figuras 10 e 11 é possível sugerir que o soro hiperimune de coelho reconhece Sema5B de forma mais intensa em relação ao soro de camundongo. Este fato possivelmente está relacionado a mecanismos de auto-tolerância dos camundongos. A auto tolerância adquirida protege o animal de danos autoimunes e pode desempenhar um papel determinante na imunogenicidade apresentada a um respectivo antígeno. Portanto as imunizações deveriam ser realizadas em animais com parentesco evolutivamente distante da fonte do antígeno (HARLOW & LANE; 1989).

Porém, neste trabalho, utilizou-se Sema5B codificada a partir do gene de camundongo nas imunizações de camundongos. Logo acredita-se que os camundongos BALB/c tenham apresentado tolerância ao antígeno – Sema5Brec.

Outro fator que contribui para uma diminuição da produção de anticorpos anti Sema5B é a de que camundongos BALB/c são isogênicos. Esta característica leva a uma diminuição da diversidade de proteínas de Classe II ou outras proteínas envolvidas na resposta imune (HARLOW & LANE, 1989).

Levando em consideração tal característica, pode-se esperar o desenvolvimento de uma resposta imune tênue em BALB/c, com baixa produção de anticorpos a determinados antígenos, como verificada para Sema5B.

Pretendia-se produzir anticorpos monoclonais contra Sema5B; porém os camundongos se mostraram pouco responsivos à Sema5B, e o soro hiperimune destes reconhecia fortemente as proteínas bacterianas (figura 9), desta forma não foi dado prosseguimento à produção de anticorpos policlonais e monoclonais em camundongos. Também, deve-se levar em conta que, uma das etapas mais críticas para a produção de anticorpos monoclonais é a realização da triagem dos clones positivos, isto é selecionar os hibridomas que secretam os anticorpos contra o antígeno de interesse – neste caso hibridomas que secretem anticorpos anti-Sema5B. A triagem é efetuada com ensaios de *western blot* ou ELISA. Os anticorpos secretados pelos hibridomas são reagidos contra a proteína recombinante nestes ensaios. Como contaminantes bacterianos aparentemente são co-purificados com Sema5B ficaria difícil distinguir entre hibridomas secretores de anticorpos específicos para Sema5B ou para o contaminante bacteriano. Além disso, espera-se que o antígeno bacteriano seja muito mais potente em estimular a imunidade humoral dos animais do que Sema5B, a qual é expressa pelo camundongo. Neste contexto, o número de clones de linfócitos B específicos para antígenos bacterianos provavelmente seria muito maior que aqueles para Sema5B, o que resultaria em uma baixa eficiência na produção de hibridomas secretores de anticorpos específicos para Sema5B.

4.1.9 Especificidade do soro hiperimune de coelho contra Sema5B

A fim de se demonstrar a especificidade dos anticorpos produzidos em coelhos contra Sema5B, efetuou-se um ensaio de *western blot*, empregando membranas de nitrocelulose sensibilizadas com preparação de membrana de cérebro de camundongos P0.

Previamente à incubação da membrana com o soro hiperimune contra Sema5B, incubou-se este com a proteína recombinante (5 µg - dialisada em PBS), com PBS e extrato de bactérias não induzidas. O resultado da reação após a revelação está apresentado a seguir na figura 12.

Contudo a confirmação da identidade da proteína será possível somente após a produção de outros anticorpos. Estes serão gerados pela imunização de novos animais com os domínios de Sema5B recombinante cujas construções já foram iniciadas e parte delas estão descritas neste trabalho. Ou alternativamente pela realização de ensaios de bloqueio deste soro hiperimune com a proteína Sema5B rec (domínio citoplasmático) produzida a partir das construções acima mencionadas. Os mesmos ensaios sob as mesmas condições serão repetidos e, caso obtenha-se resultados equivalentes, poderemos afirmar que a proteína em questão é Sema5B. Outra possibilidade seria o isolamento da molécula de 70 kDa e caracterização da sua identidade por espectrometria de massa.

A massa molecular predita do precursor não processado de Sema5B é de cerca de 120 kDa (www.swissprot.ch). A diferença observada entre a massa molecular da proteína reconhecida no extrato (70 kDa – figuras 10, 11, 12) e a predita na literatura (120 kDa) pode ser ocasionada por modificações pós transcricionais e pós traducionais que devem ocorrer apenas nas células de mamíferos.

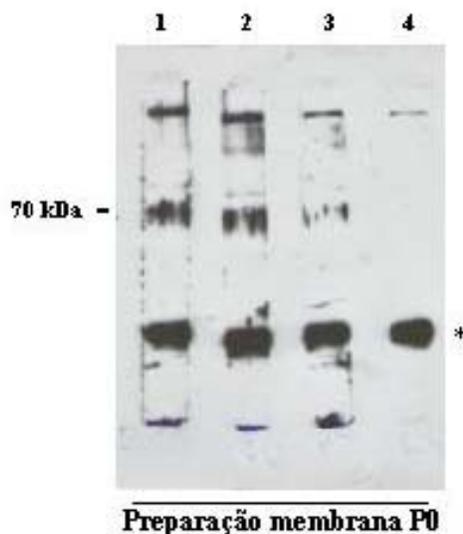


Figura 12: Reconhecimento específico da banda de 70 kDa pelo soro hiperimune anti-Sema5B presente em preparação de membrana de cérebro de camundongos P0. Pode-se visualizar o reconhecimento de uma proteína de 70 kDa pelo soro hiperimune (linha 1 → soro + PBS), cujo reconhecimento não é bloqueado pela incubação do soro com extrato bacteriano (linha 2), mas é atenuado quando o soro é incubado com 5 µg de Sema5B rec (linha 3). O soro pré-imune de coelho não reconhece a proteína com massa molecular de 70 kDa (linha 4). A reação inespecífica está denotada com asterisco.

Algumas modificações podem ser ocasionadas por processamento alternativo de mRNA, clivagem para a ativação funcional de Sema5B (a proteína poderia ser produzida como um precursor inativo – zimogênio – que adquire funcionalidade após processamento proteolítico).

A ocorrência de processamento alternativo do mRNA foi descrita para outras proteínas da família Semaforina. A Semaforina 6D é principalmente expressa no cérebro e pulmão; esta proteína possui 5 variantes provenientes de processamento alternativo de mRNA, sendo os padrões de expressão das diferentes isoformas variável, dependente do estágio do desenvolvimento e da localização tecidual (TANIGUSHI & SHIMIZU, 2003).

Comportamento semelhante foi descrito para Sema5A (ADAMS *et al.*, 1996; SKALIORA *et al.*, 1998).

Alternativamente, Sema5B pode sofrer modificação por processamento enzimático. Modificação similar foi demonstrada para Sema3A. Esta é sintetizada na

forma de um zimogênio que sofre processamento proteolítico dependente de serino-proteases do tipo furina. A ativação da atividade inibitória de Sema3A é dependente deste processamento que gera diferentes isoformas, e esta atividade inibitória é modulada de acordo com o número e localização dos sítios proteolíticos clivados durante a ativação de Sema3A. Esses processamentos levam a variações estruturais e funcionais de Sema3A (ADAMS *et al.*, 1997). Logo, se a proteína Sema5B sofrer processamento semelhante a este, justifica-se a massa molecular de 70 kDa encontrada para Sema5B. Essa proteína de 70 kDa reconhecida pelo soro hiperimune anti-Sema5B corresponde somente a uma parte da semaforina 5B.

O soro hiperimune reconhece essa proteína de 70 kDa apenas em preparações de membrana. Reagiu-se este mesmo soro contra extrato total de cérebro e não houve o reconhecimento desta proteína (resultado não mostrado). Isto pode significar que esta parte de Sema5B (constituída da porção citoplasmática, transmembrânica e parte da região extracelular) realmente está presente na membrana plasmática e não é secretada ou liberada para o ambiente extracelular e também não parece residir em outros compartimentos celulares, como por exemplo, no complexo de Golgi e no retículo endoplasmático. Os extratos provavelmente apresentam Sema5B; porém, esta proteína pode estar diluída neste tipo de extração. Ou alternativamente, os detergentes utilizados no preparo dos extratos não extraíram Sema5B das membrana celulares de forma eficaz.

Corroborando a hipótese de que Sema5B possa ser uma proteína exclusiva de membrana há vários trabalhos que demonstram a presença da proteína Sema5A, proteína muito semelhante à Sema5B, em preparações e frações de membrana, e nenhum destes trabalhos relata a secreção de Sema5A (FIORE *et al.*, 2005; KANTOR *et al.*, 2004; OSTER *et al.*, 2003). Bem como o grupo de Liotta (WOODHOUSE *et al.*, 2003) detectou a presença de Sema5A e Sema5D em preparações de membrana de células de melanoma humano (A2058) e Sema5D localizada na membrana de células de tumor ovariano em ensaios de imunohistoquímica.

O domínio extracelular de Sema5B ou parte deste (domínio Sema + PSI + 7 repetições TSP-1) possivelmente é clivado e origina um fragmento protéico que não é reconhecido pelo soro hiperimune (que foi gerado contra o domínio citoplasmático de Sema5B). Este fragmento poderá ser detectado por anticorpos que reconheçam o domínio extracelular de Sema5B.

A análise *in silico* da estrutura primária da proteína Sema5B permite a designação de 13 sítios de glicosilação potenciais do tipo inespecífica (açúcares N-ligados). O aspecto borrado das bandas obtidas nos ensaios de *western blot* (figuras 16 e 17), sugerem que a proteína Sema5B possa ser glicosilada.

Por sua vez, experimentos utilizando a técnica de *northern blotting* e hibridização *in situ*, encontraram um único mRNA com 5,9 Kb para Sema5B expresso em cérebro de camundongo (ADAMS *et al.*, 1996; SKALIORA *et al.*, 1998). Assim, fundamentando-se nestes estudos preliminares, supõe-se que, a diferença encontrada entre a massa molecular predita e a obtida dos experimentos realizados neste trabalho sejam oriundas de modificações pós traducionais como processamento enzimático e glicosilação proteica diferenciais.

A massa molecular descrita na literatura para Sema5A a partir de preparações de membrana e posterior detecção em ensaios de *western blot* variou de 110 kDa (em células A2058) a 135 kDa (em células da retina de camundongos E14) (WOODHOUSE *et al.*, 2003; OSTER *et al.*, 2003). Se este comportamento de Sema5A for extrapolado para Sema5B, baseando-se na grande similaridade compartilhada entre as duas moléculas, os resultados obtidos também poderiam sugerir que a banda de 70 kDa observada é resultado de artefato experimental como consequência da manipulação inadequada das amostras/tecidos contendo Sema5B, ou seja, a proteína de 70 kDa seria resultante da degradação protéica de semaforina 5B por proteases do S.N.C.

Tamagnone & col (ARTIGIANI *et al.*, 2004) demonstraram que plexina-B3 é um receptor funcional para Semaforina 5A - a exemplo de Semaforina 4D que estimula a ativação de Met pela interação com receptores específicos da subfamília

plexina B (GIORDANO *et al.*, 2002), Sema5A desencadeia o colapso de células COS expressando plexina-B3 em sistema heterólogo. Devido à grande homologia entre Sema5B e Sema5A, este grupo testou se Sema5B poderia induzir efeitos semelhantes à Sema5A. Assim foi demonstrado que apesar da similaridade entre as moléculas, Sema5B não se liga à plexina-B3 e portanto não leva ao colapso celular. Esse resultado presuppõe que apesar da similaridade entre as 2 semaforinas classe 5, não se pode generalizar características funcionais para essas proteínas. Cada semaforina apresenta particularidades específicas que nem sempre podem ser extrapoladas para outros membros da família semaforina, mesmo quando estes pertencem a uma mesma classe.

Portanto Semaforina 5B pode requerer processamento proteolítico para desencadear respostas celulares, pois no experimento citado acima incubou-se a porção extracelular completa de Sema5B com plexina-B3 (GIORDANO *et al.*, 2002); no entanto é possível que Sema5B interaja com o seu receptor somente após processamento proteolítico. Provavelmente essa proteína recombinante não sofreu o processamento adequado para exercer a sua atividade. Esta hipótese também poderia explicar a ausência de modulação positiva ou negativa neuritogênica observada pela incubação de Sema5B recombinante com neurônios obtidos de cultivo primário (A. Püschel, comunicação pessoal).

Kikutani e col. (TOYOFUKU *et al.*, 2004) verificaram que Sema6D – que é uma semaforina transmembrânica – pode ser encontrada em 2 formas *in vivo*: na forma integral com 150 kDa e na forma truncada com 80 kDa. A última provavelmente é resultante da clivagem proteolítica da região extracelular de Sema6D. A forma truncada é encontrada na fração de membrana de células cardíacas – semelhante à forma encontrada para Sema5B neste trabalho – que corresponde à região da proteína que contém parte da porção extracelular, a região transmembrânica e intracelular. A proporção de Sema6D truncada aumenta na presença de Plexina A1, que é o receptor para Sema6D. Logo este é um indício de que a interação entre Sema6D e o receptor Plexina A1 acentua a clivagem

proteolítica de Sema6D. Neste contexto poderíamos especular um mecanismo de sinalização semelhante para Sema5B, uma vez que neste trabalho detectamos a presença desta forma truncada de 70 kDa.

4.1.10 Obtenção dos fragmentos correspondentes aos domínios de Sema5B: Sema+PSI e Sema citoplasmática

Com o intuito de se expressar domínios distintos de Semaforina 5B em sistema heterólogo (*E. coli*), amplificou-se por reação de PCR partes do fragmento (cDNA) codificante para Sema5B.

O nosso grupo tem interesse em obter 2 fragmentos: um codificante de parte da porção extracelular de Sema5B (domínio Sema+PSI) e outro codificante da porção citoplasmática desta proteína. Para tal finalidade, realizou-se reação a produção de cDNA a partir de homogenato de cérebro de camundongo através de PCR, com oligonucleotídeos específicos para os domínios em questão.

Optou-se por tal metodologia pois os genes que codificam as diferentes semaforinas apresentam várias seqüências intervenientes longas o que impossibilita realizar a clonagem diretamente a partir do DNA celular (dado confirmado ao se comparar a seqüência nucleotídeos do mRNA de semaforina 5B com o genoma do camundongo – com o auxílio da ferramenta de comparação de seqüências de DNA e aminoácidos ‘blat’ - www.blat.net). Procurou-se amplificar Sema5B a partir de tecidos que expressam a proteína baseando-se em dados da literatura que indicam sua expressão confinada ao sistema nervoso (ADAMS *et al.*, 1996). Assim empregou-se cDNA de cérebro de camundongos jovens (P7).

Para averiguar a amplificação dos fragmentos de interesse a partir de cDNA de cérebro, submeteu-se o produto obtido da reação de PCR com os oligonucleotídeos específicos para Sema5B, à eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. Como mostrado nas figura 13 e 14, os fragmentos obtidos possuem tamanhos próximos aos esperados, o que nos leva a acreditar que

os produtos gerados da amplificação correspondam aos domínios Sema+PSI (1516 bp) e citoplasmático de Semaforina 5B (284 bp). Pretende-se subclonar os fragmentos obtidos nos vetores de expressão pET-28a e pGEX-2T para a produção destes domínios de Sema 5B em bactérias e em larga escala.



Figura 13: Produto da reação de amplificação do domínio citoplasmático de Sema5B. O fragmento de DNA obtido da reação de amplificação possui o tamanho esperado - 300 bp (linha 2). Observa-se também que não ocorreu amplificação no controle negativo (linha 3). Linha 1 – marcador de massa (GeneRuler 100 bp DNA ladder plus – Fermentas).

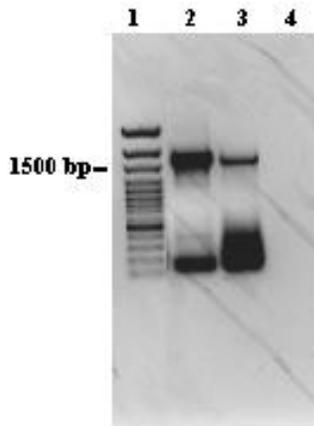


Figura 14: Amostras obtidas da reação de PCR para amplificar o domínio extracelular de Sema5B (domínio Sema + PSI). As amostras apresentadas nesta figura correspondem aos produtos amplificados por PCR sob as mesmas condições, excetuando-se a temperatura de anelamento (T_m) dos oligonucleotídeos. Em ambas condições ocorre a amplificação de um fragmento de aproximadamente 1497 bp, que é o tamanho próximo ao esperado para o fragmento Sema + PSI e de um produto inespecífico. Porém na reação realizada com T_m de 57° C (linha 2) observa-se um maior rendimento da amplificação do fragmento de interesse (1550 bp) bem como uma menor quantidade de produto inespecífico quando comparado à reação da linha 3 (reação conduzida com um T_m de 60° C). Linha 4 controle negativo – reação de PCR sem o cDNA e T_m de 57° C. Linha 1 marcador de massa molecular (GeneRuler 100 bp DNA ladder plus – Fermentas)

4.2 QSOX

4.2.1 Subclonagem de cDNA de QSOX no vetor plasmidial QSOX

A fim de obter a proteína QSOX recombinante, realizou-se a subclonagem do cDNA correspondente à QSOX de cerebelo de camundongo no vetor de expressão pET-32a. Após a reação de RT-PCR com oligodT para obter cDNA de cerebelo, PCR para amplificar QSOX, e reação de ligação, e transformação de bactérias realizou-se triagens para verificar quais colônias possuíam a construção com o inserto de interesse inserido na orientação correta.

Para se realizar esta triagem, as construções foram submetidas à PCR com primers comerciais da série pET (T7 promoter e T7 terminator primers - Novagen). As construções, que continham um inserto de 1533 bp, foram seqüenciadas com o uso dos mesmos primers utilizados para amplificar o cDNA de QSOX a partir de cDNA total – descrito em metodologia item 3.1.2.

Obteve-se ao final 2 construções que possuíam a orientação correta e o fragmento de interesse QSOX (+ 115 a + 1648 bp) – confirmado pela reação de sequenciamento automático e comparação com o programa BLAST (www.ncbi.nih.gov/BLAST/).

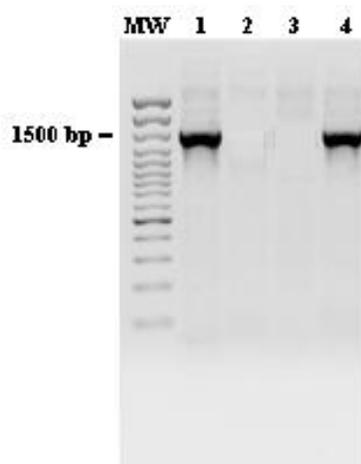


Figura 15: Produto da reação de PCR das construções pET-32a-QSOX submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8 %. Marcador de massa molecular - MW (GeneRuler 100 bp DNA Ladder plus – Fermentas). Linhas 1 e 4 correspondem às construções que possuem o inserto de interesse posicionados na orientação correta. Linhas 2 e 3 correspondem às construções que provavelmente possuem o inserto posicionado incorretamente.

4.2.2 Transformação da cepa bacteriana BL21 com a construção pET32a-QSOX e expressão da proteína recombinante

De forma semelhante ao descrito para Sema5B (item 4.1.2), a proteína QSOX de camundongo foi expressa na cepa bacteriana BL21(DE3). Alíquotas do cultivo bacteriano induzido e não induzido foram submetidas à eletroforese em gel 10% SDS-PAGE, e o padrão de bandas obtido confirmou a expressão de QSOX recombinante murina.

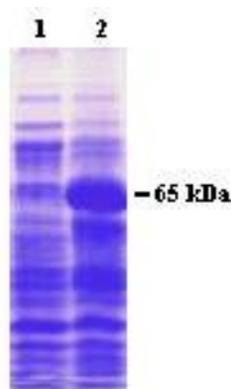


Figura 16: Amostras do cultivo bacteriano BL 21, submetidas à eletroforese em gel 10% SDS-PAGE e coradas com o corante Azul de Coomassie. Pode-se observar o aparecimento de uma banda intensa de 65 kDa (linha 2) correspondente à amostra do cultivo induzido, confirmando a expressão da proteína QSOXrec. Linha 1 corresponde à amostra do cultivo bacteriano não induzido.

4.2.3 Verificação da solubilidade de QSOX recombinante produzida e purificação de desta por cromatografia de afinidade (IMAC)

Semelhantemente à proteína Sema5B, QSOX encontrou-se presente em corpos de inclusão (resultado não mostrado).

Como o intuito inicial era apenas gerar anticorpos contra QSOX, não se otimizou as condições de crescimento e indução bacterianas para se obter a proteína de interesse solúvel. E as purificações de QSOX foram realizadas em tampão U desnaturante contendo uréia. Paralelamente às purificações utilizando uréia, testou-se o uso de outros agentes solubilizantes de forma similar à descrita para Sema5B (item 4.1.3). QSOX também não se tornou solúvel satisfatoriamente com o uso destes agentes (resultados não mostrados). Conseqüentemente, QSOX foi purificada apenas em tampão desnaturante contendo uréia.

QSOX foi dialisada após a purificação conforme descrito em metodologia. QSOXrec não precipitou durante as diálises e permaneceu solúvel em tampão PBS, mesmo sob concentrações próximas à $1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$.

4.2.4 Ensaio de *western blotting* utilizando anticorpo anti His-tag

As amostras da proteína purificada foram submetidas à eletroforese em SDS-PAGE e imobilizadas em membranas de nitrocelulose. Incubando-se a membrana com anticorpo anti His-tag-HRP e revelação com substrato adequado, observou-se o aparecimento de bandas de massas moleculares iguais ou menores a 65 kDa mouse (figura 17).

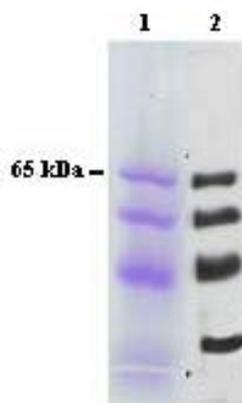


Figura 17: Padrão de bandas obtido para a proteína QSOXrec purificada. Submeteu-se 10 μ l de uma das frações oriundas da purificação de QSOX à eletroforese SDS-PAGE 10%. Parte do gel foi corado com azul de Coomassie (linha 1) e parte foi transferido para membrana de nitrocelulose e esta foi reagida com anticorpo comercial anti His-tag (linha 2). Pelo padrão de bandas obtido pode-se visualizar a ocorrência de proteólise de QSOXrec durante a purificação.

Parece não ocorrer a purificação de proteínas contaminantes juntamente à QSOXrec, ao contrário de Sema5B rec que apresenta maior conteúdo de proteínas contaminantes após a purificação (demonstrado no ensaio da figura 8 pela presença de bandas extras na linha 2).

Para QSOXrec percebe-se a ocorrência de degradação protéica, uma vez que bandas de massa molecular inferior a 65 kDa são evidenciadas com anti-His após purificação. Interessantemente alíquotas do cultivo bacteriano induzido para a expressão de QSOXrec eletroeluídos e submetidos à reação de *western blot* com o anticorpo anti His-tag-HRP (resultados não mostrados) apresentam uma única banda de aproximadamente 65 kDa sugerindo que a degradação ocorra durante o

processamento do sedimento bacteriano durante a purificação. A degradação ocorre mesmo com adição de inibidor de proteases (PMSF), uso de soluções geladas e equipamentos refrigerados. As hipóteses para a ocorrência de degradação é que a proteína QSOX de camundongo pode ser lábil, susceptível à degradação. Pode ser degradada por proteases não inibidas por PMSF; ou ainda a cepa bacteriana utilizada pode estar influenciando no produto gerado na expressão proteica.

Deve-se levar em consideração as observações feitas pelo grupo de Suga (MATSUBA *et al.*, 2002) que clonou QSOX de epiderme de camundongo e expressou-a em células eucarióticas HEK e Pt-K2. Foi relatado que devido à instabilidade inerente da enzima QSOX não se conseguiu caracterizar adequadamente a enzima. O grupo não citou se ocorreram problemas de degradação protéica. Testaram também a atividade enzimática de QSOX de epiderme de camundongo, pela incubação desta com vários substratos tióis (cisteína, ditioneitol, glutathione e extratos epidérmicos crus), porém a proteína não apresentou funcionalidade e não formou pontes dissulfeto.

Logo há fatores desconhecidos que influenciam na estabilidade protéica de QSOX de camundongo. O nosso laboratório espera contornar esses problemas pela otimização da expressão de QSOX e pela aplicação de diferentes metodologias que já estão em andamento.

4.2.5 Caracterização e averiguação da especificidade dos anticorpos anti-QSOX gerados em coelhos e detecção de QSOX em soro fetal bovino

A proteína QSOXrec foi utilizada na imunização de coelhos. Com o intuito de se testar a produção de anticorpos anti-QSOX pelos animais imunizados, realizou-se ensaios de ELISA e *western blot*.

IgG purificada (anti-QSOX) a partir do soro de coelho hiperimune foi reagido contra a QSOXrec e extrato de vesícula seminal de camundongo e rato

imobilizadas em membrana de nitrocelulose. O método de ELISA foi empregado com QSOXrec imobilizada em poços de poliestireno.

4.2.5.1 ELISA para verificar a titulação do soro anti-QSOX

Para se verificar a capacidade dos anticorpos policlonais em reconhecer QSOX em um ambiente mais próximo da realidade fisiológica (e.g. força iônica e pH), ao contrário do observado em ensaios de *western blotting*, e determinar-se a titulação dos soros obtidos, foi realizado ELISA

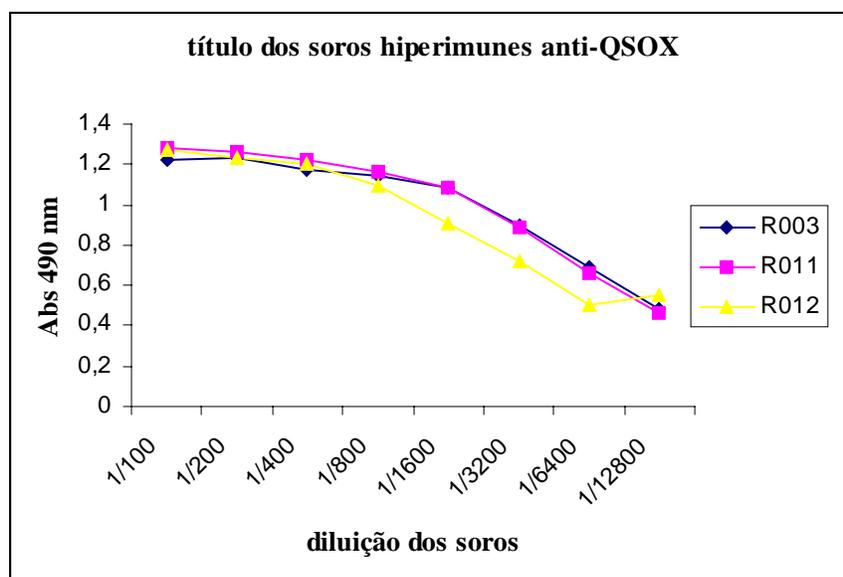


Figura 18: Resultados do ELISA para determinação dos títulos dos soros anti-QSOX. As reações de ELISA foram feitas com QSOX recombinante purificada e reagida com o soro de 3 coelhos distintos (R003, R011 e R012). Os títulos para os soros estão indicados na legenda.

A titulação apresentada pelo soro dos diferentes coelhos foi semelhante. E a diluição máxima que o soro é capaz de reconhecer o antígeno de forma adequada (por ELISA) é de 1:3200.

4.2.5.2 Ensaio de *western blot* utilizando a proteína QSOXrec e QSOX endogenamente expressa imobilizadas à membrana de nitrocelulose

A fim de se verificar se o anticorpo anti-QSOX de camundongo produzido em coelho era capaz de reconhecer QSOXrec e o antígeno presente em líquido seminal, reagiu-se IgG purificada anti-QSOX contra a proteína recombinante e extrato de líquido seminal. Utilizou-se preparação de líquido seminal, pois conforme descrito na literatura (BENAYOUN *et al.*, 2001), altos níveis de expressão desta proteína ocorrem no trato reprodutor masculino de ratos e secreções deste – especialmente secreções da vesícula seminal e epidídimo.

QSOXrec e proteínas da preparação de líquido seminal de camundongos e ratos foram imobilizadas em membrana de nitrocelulose e incubadas com o soro hiperimune. Estes ensaios permitiram a confirmação da especificidade dos anticorpos obtidos (anticorpos policlonais produzidos em coelhos - anti-QSOX de camundongo), pois houve um fortíssimo reconhecimento da proteína QSOX como pode ser visualizado nas figuras 19 e 20.

Como controle positivo da reação, indicada na figura 19, foi utilizado o anticorpo comercial α -peptídeo 14 (anti-pep 14); este anticorpo reconhece a seqüência de aminoácidos da QSOX humana – resíduos 494-507: EDPQFPKVQWPPRE. A QSOX de camundongo também possui esta seqüência de 14 resíduos de aminoácidos (resíduos 497-510) com uma única alteração no 4º resíduo desta seqüência: a Glutamina (Q) presente em humanos foi substituída por uma Histidina (H) na de camundongos. Essa alteração aparentemente não compromete o reconhecimento de QSOX de camundongo pelo anticorpo anti-peptídeo (anti-pep14), como pode ser visto na figura 19. O padrão de bandas obtidas após a incubação com os anticorpos anti QSOX e anti-pep 14 é o mesmo. Também pode-se visualizar várias bandas que possivelmente correspondam à degradação protéica de QSOXrec (figura 19).

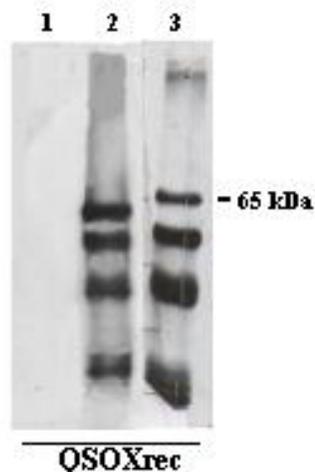


Figura 19: QSOX recombinante de camundongo é reconhecida pelo anticorpo gerado em coelho (α -QSOX) e pelo anticorpo comercial anti-pep 14. A proteína recombinante foi imobilizada em membrana de nitrocelulose e incubada com a IgG purificada de coelho - α -QSOX – diluição 1:500 (linha 2) e o anticorpo comercial anti-pep 14 – diluição 1:1000 (linha 3). Ambos anticorpos reconhecem intensamente a proteína recombinante. Com soro pré-imune não ocorreu nenhuma reação (linha 1), demonstrando a especificidade dos anticorpos anti-QSOX gerados.

Na reação realizada com preparação de vesícula seminal de rato/camundongo, houve o reconhecimento de uma proteína de massa molecular de cerca de 65 kDa quando a IgG foi reagida com estas amostras (linhas 2 e 5 – figura 20). Nos controles negativos não houve reconhecimento de nenhuma proteína, denotando a especificidade do anticorpo. Estes controles consistiram na incubação das membranas com IgG normal purificada e incubação das membranas com a IgG anti-QSOX previamente bloqueada com a proteína QSOXrec (figura 20).

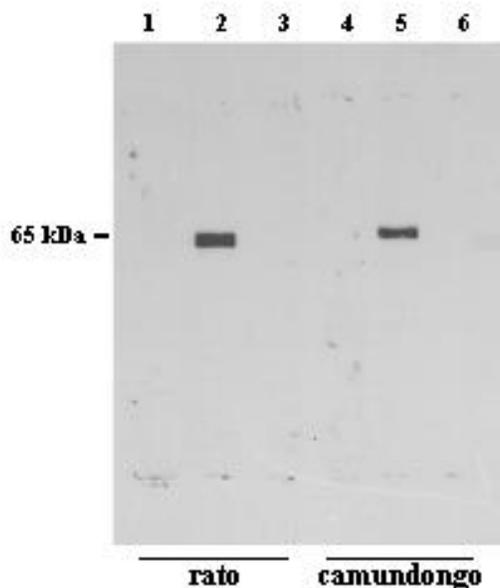


Figura 20: Reação de *western blot* demonstrando que IgG anti-QSOX é capaz de reconhecer a proteína QSOX presente no líquido seminal de ratos e camundongos. Preparação de vesícula seminal de rato (linhas 1,2,3) e de camundongo (4, 5, 6) foram reagidas com IgG anti-QSOX (linha 2 e 5). O controle negativo, ou seja, QSOX de camundongo e de rato incubados com o soro pré-imune de coelho, não apresentou nenhuma reatividade (linhas 1 e 4); evidência adicional da especificidade do anticorpo anti-QSOX é a incapacidade deste anticorpo em reconhecer QSOX de rato e camundongo após incubação com a proteína QSOXrec (50 µg) – linhas 3 e 6.

A massa molecular da proteína reconhecida pelo anticorpo anti-QSOX gerado em coelhos corresponde à descrita na literatura para a sulfidril oxidase ligada à FAD caracterizada no trato reprodutivo e secreções em ratos por OSTROWSKI & KISTLER, 1980 e BENAYOUN *et al.*, 2001.

QSOX1 é uma proteína secretada, ou presente no citoplasma celular em vesículas, em cisternas ou grânulos densos que brotam a partir do complexo de Golgi (MAIRET-COELLO *et al.*, 2004). Também foi reportado por Thorpe & col (2002) a presença de QSOX tanto no retículo endoplasmático quanto complexo de Golgi.

4.2.5.3 Presença de QSOX em soro fetal bovino (SFB): emprego de QSOXrec para demonstrar a especificidade do anticorpo anti-pep 14

O trabalho publicado recentemente pelo nosso grupo (ZANATA *et al.*, 2005) demonstrou a presença de QSOX ativa em soro fetal bovino (SFB) e o seu decréscimo após o nascimento, até o completo desaparecimento próximo a P60 (60 dias após o nascimento). A demonstração da presença de QSOX no soro foi detectada pela realização de ensaios de *western blot*.

O soro imobilizado em membranas de nitrocelulose foi reconhecido pelo anticorpo gerado contra a seqüência peptídica humana (anti-pep 14). A escolha deste peptídeo para a produção dos anticorpos foi baseada no trabalho de Thorpe e col. (HOOBER *et al.*, 1999), que demonstraram que Quiescina Q6 (QSOX humana) e sulfidril oxidase encontrada na clara do ovo pertenciam a uma mesma classe de proteínas. Este grupo demonstrou que o anticorpo era capaz de reconhecer, em ensaios de Western, QSOX de fibroblasto humano, da clara do ovo e de QSOX presente em sêmen bovino. Demonstrou-se também que essas reações eram completamente bloqueadas pela adição de um peptídeo - correspondente aos resíduos 494 – 507 aa de QSOX humana (mesmo peptídeo utilizado na geração do anticorpo anti-pep14).

Logo para demonstrar a especificidade do anticorpo, isto é, demonstrar que a proteína reconhecida no soro era QSOX bovina, incubou-se o anticorpo anti-pep 14 com a proteína QSOXrec de camundongo previamente à reação de Western (figura 21). Este ensaio confirmou que a proteína reconhecida no soro era QSOX, pois a incubação de anti-pep 14 com QSOXrec bloqueia completamente a reação.



Figura 21: A proteína QSOX está presente em soro fetal bovino. A presença de QSOX em soro fetal bovino é evidenciada pela reação de Western utilizando o anticorpo anti-pep 14 (linha 2). O reconhecimento de QSOX de SFB é bloqueado pela pré incubação do anticorpo anti-pep 14 com QSOXrec (linha 1)

Como anteriormente descrito para outro anticorpo produzido da mesma maneira (HOOBER *et al.*, 1999), o anticorpo anti-pep 14 se liga especificamente à QSOX de *Bos taurus*. Assim baseado nos resultados descritos o epítipo reconhecido por anti-pep 14 está presente em diferentes QSOX, ou pelo menos em QSOX de camundongos, ratos, humanos e bovinos.

Os membros da família QSOX parecem estar envolvidos no dobramento oxidativo de proteínas secretadas, e possivelmente no modelamento da matriz extracelular, no controle do ciclo e adesão celulares e no direcionamento de células em migração durante a maturação neuronal (THORPE *et al.*, 2002).

A presença de QSOX neste modelo (SFB) provavelmente está relacionada à elaboração de componentes da matriz extracelular. Esta é crucial nos processos de proliferação, migração e diferenciação celulares. Também deve-se considerar que o balanço tiol/dissulfeto altera o ambiente redox podendo afetar a funcionalidade de vários receptores de superfície celular e moléculas extracelulares. Portanto QSOX poderia ser um dos fatores que contribui para a regulação de processos celulares pela modulação do ambiente redox.

5. Perspectivas para os projetos de Semaforina 5B e QSOX

5.1 Uso das construções para Semaforina 5B e anticorpos produzidos

5.1.1 Semaforina 5B recombinante

A geração de partes da semaforina 5B recombinante está em andamento com a realização de novas subclonagens. Pretende-se produzir outras construções de Sema5B para expressão em sistema procariótico não citados neste trabalho: Sema + PSI + 4 primeiras repetições TSP; e as 4 primeiras repetições TSP. Também pretende-se produzir estes domínios em células eucarióticas.

A geração destas moléculas é baseada em dados obtidos por Kolodkin & col (KANTOR *et al.*, 2004) e OSTER *et al.*(2003). Estes grupos demonstraram que o domínio Sema isolado de Sema5A leva os cones de crescimento dos neurônios do núcleo da Habénula e dos neurônios retiniais ao colapso. Porém a habilidade do domínio Sema isolado em disparar o colapso é menor do que o domínio extracelular intacto, isto é, contendo as repetições TSP. Ainda Kolodkin & col (KANTOR *et al.*, 2004) demonstraram que o perfil de ligação de Sema5A contendo o domínio extracelular intacto às secções cerebrais é idêntico ao da ligação da construção consistindo do domínio Sema + 4 primeiras repetições TSP de Sema5A. Este resultado demonstra que provavelmente os 4 primeiros domínios TSP de Sema5A medeiam a interação entre Sema5A e PGHSs (proteoglicanas do tipo heparan sulfato) dos axônios oriundos do Fasciculus retroflexus. Esta pode ser uma característica abrangente de semas classe 5; ou seja, as 4 primeiras repetições de TSP seriam suficientes para que haja a interação entre Sema 5 e seus parceiros moleculares/receptores.

Há pretensões de se realizar construções adicionais de Sema5B – para expressão em células eucarióticas. Subclonagem da molécula inteira para ensaios com uso de agregados de células transfectadas com vetores contendo Sema5B *full-*

length (inteira). Estes agregados podem ser usados em co-cultivo com explantes de determinadas regiões do sistema nervoso a fim de se verificar se Sema5B exerce atividade repulsiva, inibitória ou modulatória sobre o crescimento de neuritos. Construções de Sema5B fusionada à fosfatase alcalina (Sema 5B-AP) para uso em ensaios de *binding* ou ligação também poderão ser feitas e são baseadas em trabalhos prévios de JULIEN *et al.* (2005), ARTIGIANI *et al.*(2004) e KANTOR *et al.* (2004).

As construções produzidas podem ser utilizadas em *stripe assays in vitro* similarmente ao trabalho realizado pelo grupo de Kolodkin (KANTOR *et al.*, 2004). Nestes ensaios grupos de neurônios (normalmente explantes) são cultivados em substratos que consistem de raias experimentais e controle alternadas. As raias experimentais contem proteínas recombinantes correspondentes às construções de Sema5B. Verifica-se se os axônios dos explantes exibem crescimento preferencial sobre as raias experimentais; sobre as raias controle, ou não exibem preferência de crescimento. Baseado no perfil de crescimento pode-se inferir se Sema5B é inibitória, atrativa, ou não atua sobre este grupo de neurônios.

Também podem ser realizados ensaios de *pull down* com as construções de Sema5B de forma análoga aos experimentos do grupo de Cooper (BALLIF *et al.*, 2004) que descobriu algumas das proteínas atuantes nas vias de sinalização pelo estímulo de Reelina no sistema nervoso.

As construções de Sema5B fusionadas à etiqueta de GST ou 6His serão imobilizadas em resina (glutathiona sepharose ou NiNTA agarose, respectivamente) e incubadas com extrato de cérebro ou extrato de linhagens celulares (e.g. A2058). Após etapas de lavagens da resina, as proteínas ligadas à Sema5B serão eluídas e analisadas por SDS-PAGE. As proteínas dos géis serão excisadas e identificadas por espectrometria de massa. A confirmação da identidade destas proteínas pode ser mostrada paralelamente com ensaios de *western blot*. Com esta técnica é possível identificar parceiros moleculares de Sema5B.

5.1.2 Anticorpos α -Sema5B

Liotta & col (WITTKE *et al.*, 2003) demonstraram a presença de Sema5A e Sema5D em preparações de membrana de células A2058 e MDA435. Logo pretende-se verificar se a linhagem A2058 expressa a proteína Sema5B por Western blotting e imunofluorescência para visualização em microscopia confocal – a fim de se determinar a localização de Sema5B; e.g. presença apenas na membrana plasmática; ou a presença adicional na membrana nuclear; Sema5B secretada caso esta seja submetida à clivagem proteolítica.

Os anticorpos gerados contra Sema5B podem ser utilizados para bloquear a atividade de Sema5B, ou seja bloquear o reconhecimento de Sema5B pelo seu receptor.

Kolodkin & col (KANTOR *et al.*, 2004) mostraram que axônios do núcleo da Habénula evitavam substratos contendo Sema5A; contudo esta inibição era reduzida quando se incubava o substrato com anticorpo α -Sema5A.

Ou alternativamente, o anticorpo α -Sema5B pode ser capaz de mimetizar o receptor de Sema5B e desencadear a sinalização intracelular de Sema5B, se houver sinalização bidirecional para Sema5B. Levando em consideração a prévia demonstração da existência de sinalização bidirecional para semaforinas transmembrânicas. A sinalização de Sema6D sobre plexina induz a expansão ventricular cardíaca, enquanto a sinalização reversa de plexina sobre Sema6D é necessária para a migração de células miocárdicas que forma a trabeculação cardíaca em embriões de galinha (TOYOFUKU *et al.*, a,b). A expressão de Sema6D-EC em animais nulos para Sema6D é capaz de induzir a expansão ventricular, mas não forma a trabeculação cardíaca normal.

Também deve-se considerar uma possível atuação de sema5B em sinapses, a exemplo de Sema1a (GODENSCHWEGE *et al.*, 2002). Essa funcionalidade plausível de Sema5B é baseada nos resultados obtidos por Püschel & col. (Adams *et al.*, 1996), que verificou que o domínio Sema de Sema5A e 5B são 64 % idênticos

entre si e muito similares aos de semaforina de invertebrados – semala – que apresenta 60-66 % de similaridade com semas classe 5.

Para verificar se Sema5B está presente em sinapses, pode-se proceder a preparação de frações de membrana, especificamente preparação de sinaptosoma com as densidades pós sinápticas. A separação dessas últimas se dá com a ultracentrifugação de preparações de membrana em gradientes de sacarose.

Os anticorpos α -Sema5B gerados poderão ser usados em ensaios de imunoprecipitação, que assim como o ensaio de *pull down* é uma técnica que visa a identificação de moléculas que interagem com Sema5B.

Um dos parceiros moleculares específicos de Sema5A é o PGHS (proteoglicano contendo heparan sulfato) sindecan-3. Ambas moléculas são expressas nas membranas do prosomero 2 e axônios dos neurônios do núcleo da Habénula. A confirmação da interação entre Sema5A e sindecan-3 foi realizada com ensaio de co-imunoprecipitação, isto é, Sema5A co-imunoprecipitava com os anticorpos anti-sindecan 3, mas não com IgG controle (KANTOR *et al.*, 2004).

Similarmente, usando os anticorpos anti-sema5B citoplasmático ou extracelular pretende-se imunoprecipitar sema5B e moléculas que com ela interagem.

No entanto, os ensaios de *pull down* e de imunoprecipitação são viáveis apenas com proteínas solubilizadas. E como descrito em resultados (item 4.5.2.1) Sema5B endogenamente expressa está presente na membrana plasmática e é detectada apenas em preparação de membrana de cérebro. Logo, deve-se otimizar condições de extração de Sema5B para que esta se torne solúvel e possa ser imunoprecipitada.

As condições de expressão e purificação de Sema5B recombinante também devem ser padronizadas para obtenção de Sema5B recombinante solúvel para os ensaios de *pull down*. Como demonstrado no item 4.5, o produto gerado da construção em pQE30-Sema5B é insolúvel. Portanto novas subclonagens em vetores de expressão procarióticos e eucarióticos serão efetivadas.

5.2 Experimentos que envolvem QSOX

5.2.1 QSOXrec de camundongo

Pretende-se verificar se QSOXrec de camundongo apresenta atividade enzimática sobre substratos distintos; e.g. DTT, lisozima, insulina, RNase com o método de fluorescência descrito por RAJE *et al.*, 2000.

Aparentemente, QSOXrec purificada com uso de uréia (método desnaturante) possui atividade enzimática e oxida DTT. No entanto estes ensaios serão repetidos com a proteína recém purificada, pois QSOXrec de camundongo se apresentou lábil e perde a atividade funcional quando estocada.

As condições de expressão e purificação serão otimizadas para se obter QSOXrec sem degradação. Já que enzimas íntegras são requeridas para uma atividade ótima. E experimentos usando fragmentos de QSOX (TRX e ERV1) mostraram que o domínio contendo TRX reduzida é um substrato do fragmento ERV1/ALR (COPPOCK & THORPE, revisão não publicada). Portanto espera-se que a atividade de QSOX possa ser acentuada com a obtenção da molécula íntegra.

5.2.2 Anticorpos anti-QSOX

Ensaio de imunohistoquímica e Western blotting já estão em andamento com o intuito de verificar-se a expressão de QSOX em diferentes tipos celulares, a ontogenia dessa expressão, bem como se esta expressão oscila com interferências no ambiente extracelular.

Mairet-Coello e col (2004) haviam sugerido que a enzima QSOX em ratos poderia intervir no dobramento de hormônios neurohipofisais – ocitocina, vasopressina e neurofisinas associadas – pois além do fato destas proteínas conterem pontes dissulfeto, ensaios de imunohistoquímica em cérebros de ratos adultos revelaram altos níveis de QSOX em populações neuronais produtoras de

neuropeptídeos. Todavia, estudos posteriores em que se mapeou a expressão de QSOX durante o período compreendido entre E10 e P30 em ratos, revelou que o início da expressão dos neuropeptídeos antecede a expressão de QSOX. Assim essa enzima não está diretamente envolvida no dobramento/maturação de hormônios neurohipofiseais e neurofisinas.

Similarmente estamos verificando a expressão de QSOX em embriões de camundongos E13.5, correlacionando a presença de QSOX em determinados conjuntos de células e supostas funcionalidades. Alguns resultados preliminares obtidos até o momento corroboram o padrão de expressão visto em embriões de ratos, e outros revelam que a expressão de QSOX em camundongos pode ser distinta e, portanto pode acarretar funcionalidades não redundantes nessas duas espécies.

Shiota e col (KOBAYASHI *et al.*, 2001) verificaram que o miocárdio de embriões de camundongo expressam intensamente tioredoxina (TRX) e glutaredoxina (GRX) a partir de E8.5. O miocárdio expressa estas proteínas continuamente durante o período pré-natal e em períodos mais tardios do desenvolvimento, isto é, no camundongo adulto, embora a expressão torne-se menos intensa. Estes resultados são opostos ao obtido por outro grupo de pesquisadores que examinaram tecido de rato adulto e verificaram que o músculo cardíaco não apresenta TRX. A diferença dessa expressão entre as espécies em questão provavelmente está relacionada à expressão diferencial de QSOX em espécies distintas.

Também está se observando a variação na expressão de QSOX durante períodos distintos do desenvolvimento, e se a expressão de QSOX pode ser regulada em linhagens celulares mantidas em cultivo submetidas à estresse oxidativo. O acompanhamento da oscilação da expressão desta enzima é realizada com ensaios de *western blot* e verificação dos níveis de RNAm codificantes para QSOX por RT-PCR.

LI *et al.* (2005) demonstrou que hepatopoetina (HPO) - ALR humano - e tioredoxina (TRX) estão envolvidos na mesma via de transdução de sinal. HPO é

sensível ao estado redox celular; quando agentes oxidantes (H_2O_2 e diamida) são adicionados à células COS7 expressando HPO e TRX recombinantes, HPO forma dímeros. Este dímero HPO transfere equivalentes oxidativos para TRX via uma troca direta tiol dissulfeto. O produto dessa transferência é TRX oxidada, que por sua vez, ativa fatores de transcrição redox sensíveis.

Este grupo adicionou agentes oxidantes e redutores ao meio de cultivo de células COS transfectadas com HPO e verificou que a razão monômero/dímero de HPO é alterada (LI *et al.*, 2005)

Adicionalmente, estes pesquisadores co-imunoprecipitaram HPO e TRX demonstrando que estas interagem *in vitro* e *in vivo*.

Também há intenções de se proceder ensaios de imunoprecipitação com os anticorpos anti-QSOX e *pull-down* com QSOXrec imobilizada em resina. Os anticorpos e a proteína recombinante serão incubados com extratos de cérebro e de líquido seminal.

Espera-se encontrar substratos específicos de QSOX de camundongo que provavelmente constituem os substratos preferenciais desta enzima. Essa hipótese é baseada em observações feitas por Hooper e col (1999) que demonstraram que o homólogo de aves, apresenta atividade sobre uma variedade substratos, oxida proteína e peptídeos (em especial as proteínas encontradas na clara do ovo – Km entre 110 a 330 μ M/tiol) de forma mais eficaz em relação a monotíois (como GSH e β -mercaptoetanol – Km de 20 a 50 mM).

Pretende-se verificar se há diferenças de expressão de QSOX entre indivíduos novos e velhos. Uma das estratégias é determinar se há QSOX no líquido cefaloraquidiano e se a concentração desta varia com a idade. Pode-se verificar diferenças da expressão de QSOX entre animais jovens e velhos – camundongos e ratos – em ensaios de imunohistoquímica e *western blot* com tecido cerebral, por exemplo. Pode-se inferir assim uma possível atuação de QSOX nos processos oxidativos da senescência ou inversamente se a expressão de QSOX é afetada por esses processos. Justifica-se o estudo de QSOX na senescência, pois há vários

estudos que mostram que o estado redox extracelular tiol/dissulfeto se torna mais oxidante com a idade. Entre as mudanças verificadas estão a diminuição de GSH, elevação de CySS e de homocisteína total que está predominantemente presente nas formas dissulfeto. A origem destas mudanças é desconhecida; bem como não se sabe se elas representam um declínio das defesas antioxidantes ou se há produção de ROS excessiva, que acarretam no envelhecimento e doenças associadas (SCHAFER & BUTTNER, 2001; MORIARTY-CRAIGE & JONES, 2004).

6. Conclusões

Obteve-se Sema5B e QSOX recombinantes a partir das construções pQE30-Sema5B e pET32a-QSOX, assim como produziu-se anticorpos específicos contra estas proteínas.

Com essas ferramentas produzidas demonstrou-se que: 1) A proteína QSOX está presente no soro fetal bovino; 2) Semaforina 5B aparentemente é expressa no sistema nervoso central na forma de um zimogênio com 70 kDa.

6 Referências Bibliográficas

ADAMS, J.C., TUCKER, R.P. The thrombospondin type 1 repeat (TSR) superfamily: diverse proteins with related roles in neuronal development. **Dev Dyn**, v. 218, p. 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**, v. 57, p. 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**. v.16, p. 6077-6086, 1997.

ALLEN, R.G.; BALIN, A.K. Oxidative influence on development and differentiation: an overview of a free radical theory of development. **Free Radic Biol Med**, v. 6, p. 631-61, 1989.

AMIOT, C.; MUSARD, J.F.; HADJIYIASSEMIS, M.; JOUVENOT, M.; FELLMANN, D.; RISOLD, P.Y.; ADAMI, P. Expression of the secreted FAD-dependent sulfhydryl oxidase (QSOX) in the guinea pig central nervous system. **Mol Brain Res**, v. 125, p. 13-21, 2003.

ARTIGIANI, S.; CONROTTO, P.; FAZZARI, P.; GILESTRO, G.F.; BARBERIS, D.; GIORDANO, S.; COMOGLIO, P.M.; TAMAGNONE, L. Plexin-B3 is a functional receptor for semaphorin 5A. **EMBO Rep**. v. 5(7), 710-4, 2004.

AURANDT, J.; WELQUAN, L; GUAN, K.L; Semaphorin 4D activates the MAPK pathway downstream of Plexin-B1 *Biochem J*, v. 394(Pt2), 459-64, 2005

BAGNARD, D. LOHRUM, M., UZIEL, D. PÜSCHEL, A.W., & BOLZ, J. Semaphorins act as attractive and repulsive guidance signals during the development of cortical projections. **Development**, v. 125, p. 5043-5053, 1998.

BALLIF, B.A.; ARNAUD, L.; ARTHUR, W.T.; GURIS, D.; IMAMOTO, A.; COPPER, J.A. Activation of Dab1/CrKL/C3G/Rap1 pathway in Reelin stimulated neurons. **Curr Biol**, v.14 (7), 606-10, 2004

BENAYOUN, B., ESNARD-FÉVE, A., CASTELLA, S. COURTY, Y., ESNARD, F. J. Rat Seminal Vesicle FAD-dependent Sulfhydryl Oxidase. **Biol. Chem**, v. 276, p. 13830-37, 2001.

BORK P., DOERKS T., SPRINGER T.A., SNEL B. Domains in plexins: links to

integrins and transcription factors. **Trends Biochem Sci**, v. 24, p. 261-3, 1999.

BRADFORD, M. M. A rapid sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, 1976.

CASTAGNE, V.; GAUTSCHI, M.; LEFEVRE, K.; POSADA, A.; CLARKE, P.G.H. Relationships between neuronal death and the cellular redox status. Focus on the developing nervous system. **Prog Neurobiol**, v. 59, p. 397-423, 1999.

CASTELLANI, C.; CHEDOTAL, A.; SCHACHNER, M.; FAIVRE-SARRAILH, C.; ROUGON, G. Analysis of the L1-deficient mouse phenotype reveals cross-talk between Sema 3A and L1 signaling pathways in axonal guidance. **Neuron**, v. 21, p. 237-349, 2000.

CASTELLANI, C., ROUGON, G. Control of semaphoring signaling. **Curr Opin Neurobiol**, v. 12, p. 532-541, 2002.

CASTRO, F. Chemotropic Molecules: Guides for axonal Pathfinding and Cell Migration During CNS Development. **News Physiol Sci**, v. 18, p. 130-136, 2003.

COPPOCK, D.L., KOPMAN, C., SCANDALIS, S., GILLERMAN, S. Preferential gene expression in quiescent human lung fibroblasts. **Cell Growth Differ**, v. 4, p. 483-493, 1993.

COPPOCK, D.L.; CINA-POPPE, D.; GILLERAN, S. The quiescin Q6 gene (QSCN6) is a fusion of two ancient gene families: thioredoxin and ERV1. **Genomics**, v. 54, p. 460-468, 1998.

ETIENNE-MANNEVILLE, S.; HALL, A. Rho GTPases in cell biology. **Nature**, v. 420, p. 629-635, 2002

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**, v. 25(6), 2310-19, 2005

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

GIORDANO, S.; CORSO, S.; COMOTTO, P.; ARTIGIANI, S.; GIBSTRO, G.; BARBERIS, D.; TAMAGNONE, L.; COMOGLIO, P.M. The semaphorin 4D receptor controls invasive growth by coupling with Met. **Nat Cell Biol**, v. 4, 720-

724, 2003

GODENSCHWEGE, T.A.; HAILAN, H.; SHAN-CROFTS, X.; GOODMAN, C.S.; MURPHEY, R.K. Bi-directional signaling by Semaphorin 1a during central synapse formation in *Drosophila*. **Nat Neurosci.**, v. 5(12), 1294-1301, 2002

HARLOW, E. & LANE, D. **Antibodies, a laboratory manual**, CSH Press, USA., 1988.

HOOBER, K.L., JONEJA, B., WHITE, H.B., THORPE, C. J. A Sulfhydryl Oxidase from Chicken Egg White. **Biol. Chem.**, v. 271, p. 30510-16, 1996

HOOBER, K.L., GLYNN, N.M., BURNSIDE, J., COPPOCK, D.L., THORPE, C. J. Homology between Egg White Sulfhydryl Oxidase and Quescin Q6 Defines a New Class of Flavin-linked Sulfhydryl Oxidases. **Biol. Chem.** v. 274, p. 31759-62, 1999.

HOSHIJIMA, K.; METHERALL, J.E.; GRUNWALD, D.J. A protein disulfide isomerase expressed in the embryonic midline is required for left/right asymmetries. **Genes Dev**, v. 16, p. 2518-29, 2002.

HUBER, A.B.; KOLODKIN, A.L.; GINTY, D.D.; CLOUTIER, J.F. Signaling at the growth cone: ligand-receptor complexes and the control of axon growth and guidance. **Annu. Rev. Neurosci.** v. 26, 509-63, 2003

KAMIGUCHI, H., LEMMON, V. IgCAMs: bidirectional signals underlying neurite growth. **Curr Opin Cell Biol**, v. 12, p. 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**. v. 44, 961-975, 2004

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

KOBAYASHI, M.; NAKAMURA, H.; YODOI, J.; SHIOTA, K. Immunohistochemical localization of thioredoxin and glutaredoxin in mouse embryos and fetuses. **Antioxid Redox Signal.**, v. 2(4), p. 653-663, 2000.

KOBAYASHI, M.; NAKAMURA, H.; YODOI, J.; SHIOTA, K. Ontogenesis of anti-oxidative enzymes in mouse embryos and fetuses: An immunohistochemical study. **It. J. Anat. Embryol.**, v. 106(2), 137-142, 2001

KOBAYASHI, M.; NAKAMURA, H.; YODOI, J.; SHIOTA, K. Thioredoxin, an anti-oxidant protein, protects mouse embryos from oxidative stress-induced developmental anomalies. **Free Rad Res**, v. 36(9), p. 949-56, 2002

KOLODKIN, A.L.; MATTHES, D.J.; O'CONNOR, T.P.; PATEL, N.H.; ADMON, A.; BENTLEY, D.; GOODMAN, C.S. Fasciclin IV: sequence, expression and function during growth cone guidance in the grasshopper embryo. **Neuron**, v. 9(5), 831-45, 1992.

LI, L.; TRIMARCHI, J.R.; KEEFE, D.L. Thiol oxidation-induced embryonic cell death in mice is prevented by the antioxidant dithiothreitol. **Biol Reprod**, v. 61, p. 1162-69, 1999.

LI, Y.; LIU W.; XING, G.; TIAN, C.; ZHU, Y.; HE, F. Direct association of hepatopoetin with thioredoxin constitutes a redox signal transduction in activation of AP-1/NF- κ B. **Cell. Signal**, v. 17(8), 985-96, 2005.

MAESTRINI, E., TAMAGNONE, L., LONGATI, P., CREMONA, O., GULISANO, M., BIONE, S., TAMANINI, F., NEEL, B.G., TONIOLO, D., COMOGLIO, P.M. A family of transmembrane proteins with homology to the MET-hepatocyte growth factor receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, p. 674-8, 1996.

MAIRET-COELLO, G.; TURY, A.; ESNARD-FEVE, A.; FELLMANN, D.; RISOLDY, P.Y.; GRIFFOND, B. FAD-linked sulfhydryl oxidase QSOX: topographic, cellular, and subcellular immunolocalization in adult rat central nervous system. **J Comp Neurol**, v. 437(3), p. 334-63, 2004.

MAIRET-COELLO, G.; TURY, A.; ESNARD-FEVE, A.; FELLMANN, D.; RISOLDY, P.Y.; GRIFFOND, B. Ontogenesis of the sulfhydryl oxidase QSOX expression in rat brain. **J Comp Neurol**, v. 484(4), p. 403-17, 2005.

MATSUBA, S.; SUGA, Y.; ISHIDOH, K.; HASHIMOTO, Y.; TAKAMORI, K.; KOMINAMI, E.; WILHELM, B.; SEITZ, J.; OGAWA, H. Sulfhydryl oxidase (SOx) from mouse epidermis: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of recombinant protein in the cultured cells. **J. Dermatol. Sci.**, v.30, p. 50-62, 2002

MATTHES, D.J.; SINK, H; KOLODKIN, A.L.; GOODMAN, C.S. Semaphorin II can function as a selective inhibitor of specific synaptic arborization. **Cell**, v. 81(4), p.631-9, 1995.

MORIARTY-CRAIGE, S.; JONES, D.P. Extracellular thiols and thiol/disulfide

redox in metabolism. **Annu. Rev. Nutr**, v. 24, p. 481-509, 2004.

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

NIKOLIC, M The role of Rho GTPases and associated kinases in regulating neurite outgrowth. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 34, p. 731-45, 2002.

OSTER, S.F.; BODEKER, M.O.; FENGLING, H.; SRETAVAN, D.W. Invariant Sema5A inhibition server as ensheathing function during optic nerve development. **Development**. v. 130, p. 775-784, 2003.

OSTROWSKI, W.S., KISTLER, W.S. Properties of a Flavoprotein Sulphydryl oxidase from rat seminal vesicle secretion **Biochemistry**, v. 19, p. 2639-45, 1980

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

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

POLLEUX, F.; MORROW, T. GHOSH, A. Semaphorin 3A is a chemoattractant for cortical apical dendrites. **Nature**, v. 404, 567-573, 2000.

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

RANSCHT, B. Cadherins: molecular codes for axonal guidance and synapse formation. **Int J Dev Neurosci**. v. 18(7), p. 543-51, Nov. 2000

RAPER, J.A. Semaphorins and their receptors in vertebrates and invertebrates. **Cur Opin Neurobiol**. v. 10(1), p. 88-94, 2000

ROHM, B., OTTEMEYER, A., LOHRUM, M. & PÜSCHEL, A. W. Plexin/neuropilin complexes mediate repulsion by the axonal guidance signal semaphorin 3A. **Mech. Dev.**, v. 93, p. 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 Lett**, v. 486, p. 68-72, 2000b.

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

SANGER, N.; NICKLEN, J.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain termination inhibitors. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 74, p. 5463-67, 1977.

SCHAFFER, F.Q.; BUETTNER, G.R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radic Biol Med**, v. 30(11), p. 1191-1212, 2001.

SCHELESSINGER, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. **Cell**, v. 103, p. 211-25, 2000.

SKALIORA, I., SINGER, W., BETZ, H., PÜSCHEL, A.W. Differential patterns of semaphorin expression in the developing rat brain. **Eur J Neurosci**, v. 10, p. 1215-29, 1998.

STOKER, A.W. Receptor tyrosine phosphatases in axon growth and guidance. **Curr Opin Neurobiol**, v. 11, p. 95-102, 2001.

SWIERCZ, J.M.; KUNER, R.; BEHRENS, J.; OFFERMANN, S. Plexin B1 directly interacts with PDZ-RhoGEF/LARG to regulate RhoA and growth cone morphology. **Neuron**, v. 35(1), p. 51-63, 2002.

TANIGUCHI, M.; SHIMIZU, T. Characterization of a novel member of murine semaphorin family. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 314 (1), p. 242-8, 2004.

TAKAHASHI, T.; FOURNIER, A., NAKAMURA, F., WANG, L.H., MURAKAMI, Y., KALB, R.G., FUJISAWA, H., STRITTMATTER, S.M. Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors. **Cell**, v. 99, p. 59-69, 1999

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

TAMAGNONE, L., ARTIGIANI, S., CHEN, H., HE, Z., MING G.I., SONG, H., CHEDOTAL, A., WINBERG, M.L., GOODMAN, C.S., POO, M., TESSIER-LAVIGNE, M., COMOGLIO, P.M. Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. **Cell**, v. 99, p. 71-80, 1999.

TERMAN, J.R.; MAO, T.; PASTERKAMP, R.J.; HUNG-HSIANG, Y. KOLODKIN, A.L. MICALSs, A Family of Conserved Flavoprotein Oxidoreductases, Function in Plexin-Mediated Axonal repulsion. **Cell**, v. 109, 887-900, 2002

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

THORPE, C.; HOOBER, K.L.; RAJE, S.; GLYNN, N.M.; BURNSIDE, J.; TURI, G.K.; COPPOCK, D.L. Sulfhydryl oxidases: emerging catalysts of protein disulfide bond formation in eukaryotes. **Arch Biochem Biophys**, v. 405, p. 1-12, 2002.

TOYOFUKU, T.; ZHANG, H.; KUMANOGOH, A.; TAKEGAHARA, N.; YABUKI, M.; HARADA, K.; HORI, M.; KIKUTANI, H. Guidance of myocardial patterning in cardiac development by Sema6D reverse signaling. **Nat Cell Biol** v. 6 (12), 1204-1211, 2004 (a)

TOYOFUKU, T.; ZHANG, H.; KUMANOGOH, A.; TAKEGAHARA, N.; SUTO, F.; KAMEI, J.; AOKI, K.; YABUKI, M.; HORI, M.; FUJISAWA, H.; KIKUTANI, H. Dual roles of Sema6D in cardiac morphogenesis through region-specific association of its receptor, Plexin-A1, with off-track and vascular endothelial growth factor receptor type 2. **Genes Dev.**, v. 18, 435-447, 2004 (b)

Semaphorin Nomenclature Committee. Unified Nomenclature for the semaphorins; collapsins.. **Cell**, v. 97(5), p. 551-2, 1999.

VIKIS, H.G., LI, W., HE, Z. & GUAN, K.L. The semaphorin receptor plexin-B1 specifically interacts with active Rac in a ligand-dependent manner. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 97, p. 12457-62, 2000

WINBERG, M.L., NOORDERMEER, J.N., TAMAGNONE, 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**, v. 95, p. 903-16, 1998

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

WITTKE, I.; WIEDEMAYER, R.; PILLMANN, A.; SAVELYEVA, L.; WESTERMANN, F.; SCHWAB, M. Neuroblastoma-derived sulfhydryl oxidase, a new member of the sulfhydryl oxidase/Quiescin6 family, regulates sensitization to interferon gamma-induced cell death in human neuroblastoma cells. **Cancer Res.**, v. 15, p.7742-7752, 2003

WONG, J.T.W.; WONG, S.T.M.; O'CONNOR, P. Ectopic semaphorin-1a functions as an attractive guidance cue for developing peripheral neurons. **Nature Neurosci.**, v. 2 (9), 798-803. 1999.

WOODHOUSE, E.C., FISHER, A., BUNDLE, R.W., BRYANT-GREENWOOD, B., CHARBONEAU, L., PETRICOIN, E.F., LIOTTA L.A. *Drosophila* screenin model for metastasis: Semaphorin 5c is required for l(2)gl cancer phenotype. **Proc Natl Acad Sci**. v. 100(20), p. 11463-68, 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**, v. 22, p. 471-7, 2002.

ANEXO 1: Seqüência de nucleotídeos e aminoácidos da proteína Sema5B e figura do vetor plasmidial (pQE30) utilizado na subclonagem.

Organização do cDNA e seqüência de aminoácidos obtidos a partir do mRNA de Semaforina 5B depositado no programa BLAST . A seqüência codificante para Sema 5B foi clonada de uma biblioteca de cDNA de cérebro e coluna vertebral de camundongos E12 por Adams et al., 1996. A seqüência de aminoácidos de semaforina 5B está apresentada abaixo de cada trinca de nucleotídeos. A seqüência de aminoácidos dos diferentes domínios de Sema 5B foi representada com cores diferentes para facilitar a visualização.



```

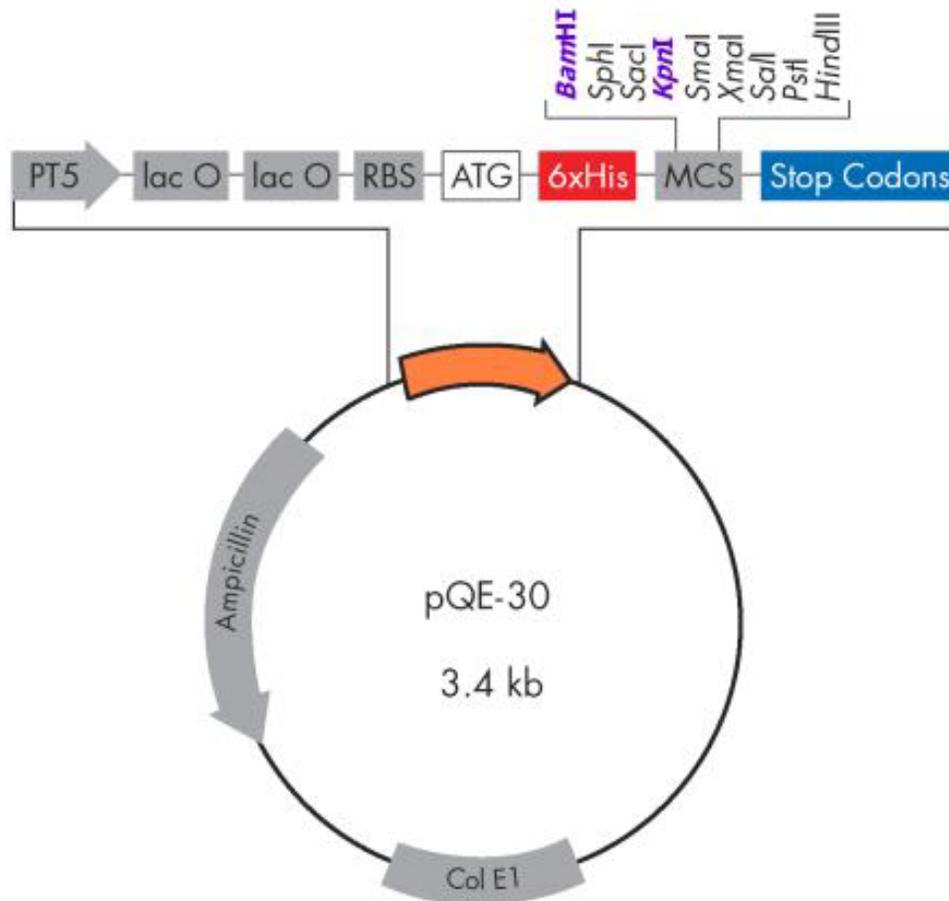
5' 1 bp  |atggtagtcccaggaccctggctctctcgctggttgctgtccagc      3'
          |M V V P G P L A L S L L L S S 15 aa
          |
          |ctcaccctgctggtg|cccacctctccagctcccaggacattgcc
          |L T L L V S H L S S S Q D I A 30
          |
          |agtgagtccagcagtgagcaacagatgtgacgcgaggagg|cac
          |S E S S S E Q Q M C T R R E H 45
          |
          |cccatcgtagcctttgaagatctgaagccgtgggtctttaacttc
          |P I V A F E D L K P W V F N F 60
          |
          |acctaccctggagtcggtgatttctcccagcttgctcttgatccc
          |T Y P G V R D F S Q L A L D P 75
          |
          |tcgaggaatcagctcatcgtagggaggcaggaactacctcttcaga
          |S R N Q L I V G G R N Y L F R 90
          |
          |ctcagcctcgccaatgtctccctccttcaggctacagagtgggcc
          |L S L A N V S L L Q A T E W A 105
          |
          |tccagtgaggacacgcgcccgtcctgcccagagcaaagggaaaacg
          |S S E D T R R S C Q S K G K T 120
          |
          |gaggaggagtgtcagaactatgtacgagtcctgattgtttccggc
          |E E E C Q N Y V R V L I V S G 135
          |
          |cggaagggtgttcatgtgcggtaccaatgccttttccccagtggtgc
          |R K V F M C G T N A F S P V C 150
          |
          |tccagcagacaggtagggaaacctcagccggactattgagaagatc
          |S S R Q V G N L S R T I E K I 165
          |
          |aacggtgtggccccggtgcccctatgaccacgcccacaactctaca
          |N G V A R C P Y D P R H N S T 180
  
```

541 gccgtcatctcctctcagggggagctctatgcagccacagtcatt
 A V I S S Q G E L Y A A T V I **195**
 586 gacttctccgggcgggacccagccatctaccgcagcctgggcagt
 D F S G R D P A I Y R S L G S **210**
 631 gggccaccgcttcgcactgcccagtataactccaaatggctcaat
 G P P L R T A Q Y N S K W L N **225**
 676 gagccaaatdddgtggcagccttgacatcgggctgtdtgcgtat
 E P N F V A A F D I G L F A Y **240**
 721 ttcttccttcgggagaatgccgtggagcatgattgtgggagcact
 F F L R E N A V E H D C G R T **255**
 766 gtgtactctcgggtggcccgggtgtgcaagaatgatgtaggtggc
 V Y S R V A R V C K N D V G G **270**
 811 cgtttcctgctggaggacacgtggaccacattcatgaaggcccgg
 R F L L E D T W T T F M K A R **285**
 856 ctcaactgctcccggcgggagaggtccccttctactataatgag
 L N C S R P G E V P F Y Y N E **300**
 901 ctgcagagtgccctccatctgcccagcaggacctcatctatggc
 L Q S A F H L P E Q D L I Y G **315**
 946 gtcttcaccactaacgtaaacagcattgaggcttctgctgtctgc
 V F T T N V N S I A A S A V C **330**
 991 gccttcaacctcagtgccatctccaaggctttcaatggcccattt
 A F N L S A I S K A F N G P F **345**
 1036 cgttaccaggaacccagggtgctggctcccattcgccaat
 R Y Q E N P R A A W L P I A N **360**
 1081 cccatcccccaattdccagtggtgactctgcccggagactggcccc
 P I P N F Q C G T L P E T G P **375**
 1126 aacgagaacctcacggagcgcagcctgcaggacgcacagcggctc
 N E N L T E R S L Q D A Q R L **390**
 1171 ttctgatgagcgaagctgtgcagccagtgacaccagagccctgt
 F L M S E A V Q P V T P E P C **405**
 1216 gtcaccaggacagcgtccgcttctcacatctcgtggtagacct
 V T Q D S V R F S H L V V D L **420**
 1261 gtgcaagctaaggacacgctctatcacgtactctacatagggcacg
 V Q A K D T L Y H V L Y I G T **435**
 1306 gagtcgggtaccatcctgaaagcgtgtccacggccagccgcagc
 E S G T I L K A L S T A S R S **450**
 1351 ctccgtggctgctacctggaggagctacatgtgctgcctcctggg
 L R G C Y L E E L H V L P P G **465**
 1396 cgcttgaacctctgcggagcctgcccacatcctgcacagcgcgcgt
 R L E P L R S L R I L H S A R **480**
 1441 gcgctcttcgtgggattgagcgcaggggtgctgaggatcccactg
 A L F V G L S D R V L R I P L **495**
 1486 gagagggtgttcggcctatcatagccagggggcatgcctgggagca
 E R C S A Y H S Q G A C L G A **510**

1531 cgggaccataactgcggtggtggatgggaagcggcaactttgcagc
R D P Y C G W D G K R Q L C S 525
 1576 acgcttgaagacagttccaacatgagcctgtggatccagaacatc
T L E D S S N M S L W I Q N I 540
 1621 acaacctgtcctgttacgaaatgtgacacgggatgggggcttcggc
T T C P V R N V T R D G G F G 555
 1666 ccatggtcaccatggaaccgtgtgagcacttagatggagacaac
P W S P W K P C E H L D G D N 570
 1711 tcgggttcttgccctgtgcccgggcccagatcctgtgactccccaagg
S G S C L C R A R S C D S P R 585
 1756 cctcgctgtgggggctcgagtgccctggggccatccatccatatt
P R C G G L E C L G P S I H I 600
 1801 gccaatgctccaggaaatggggcgtggaccgcatgggtcatcgtgg
A N C S R N G A W T A W S S W 615
 1846 gctcagtgacgacgctcctgtgggatcggcttccagggtccgtcag
A Q C S T S C G I G F Q V R Q 630
 1891 cgaagttgcagcaaccggcgccccgccatgggggcccgcatttgc
R S C S N P A P R H G G R I C 645
 1936 gtgggcaagagccgggaggagcggttctgtaatgaaaatacacct
V G K S R E E R F C N E N T P 660
 1981 tgc~~cca~~gtg~~ccc~~atcttctgggcttccctgggggttccctggagcaag
C P V P I F W A S W G S W S K 675
 2026 tgcagcaacaactgtggaggcggcgtgcagtcgacgacgcccgttct
C S N N C G G G V Q S R R R S 690
 2071 tgcgagaatggcaactcgtgcccgggttgccggcgtggagttcaag
C E N G N S C P G C G V E F K 705
 2116 acctgcaaccccagggttgc~~ccg~~gaagtgcgacgcaacacacc
T C N P E A C P E V R R N T P 720
 2161 ~~tgg~~acgccctggctgcccgtgaacgtgaccaggggtggagcgcgc
W T P W L P V N V T Q G G A R 735
 2206 caggagcagcgattccgcttcacctgcccgcgcgcccgtgcccggac
Q E Q R F R F T C R A P L P D 750
 2251 ccgcacgggtctgcagttcggcaagaggaggacagagaccaggact
P H G L Q F G K R R T E T R T 765
 2296 tgcccggcagacggcaccggagcctgacgac~~acc~~gacgcccctggtg
C P A D G T G A C D T D A L V 780
 2341 gaggatctcctgacgacgggagcagtcaccacacactctg~~aac~~
E D L L R S G S T S P H T L N 795
 2386 ggaggctggggccacctggggcccgtgggtcatcctgctcccgggac
G G W A T W G P W S S C S R D 810
 2431 tgcgagctgggcttccgctccgcaagagaacttgtaccaaccgg
C E L G F R V R K R T C T N P 825
 2476 gagcctcgcaacgggggcttgcctgctggtgggagacgctgcccggag
E P R N G G L P C V G D A A E 840

2521 taccaagactgcaaccacagggcttgc**cca**gtg**cg**gggtgcttgg
 Y Q D C N P Q A C P V R G A W **855**
 2566 tcctgctggaccgcatggtcccagtgctcagcatcctgcggtggt
 S C W T A W S Q C S A S C G G **870**
 2611 ggccactatcaacgcaccgcttctctgcaccagccccgccccatcc
 G H Y Q R T R S C T S P A P S **885**
 2656 ccaggtgaggacatctgcctcggcctgcacacggaggaggccta
 P G E D I C L G L H T E E A L **900**
 2701 tgttcaacacaggcctgc**ccagaa**ggctggtcactgtggtctgag
 C S T Q A C P E G W S L W S E **915**
 2746 tgggggtgtctgcactgaggatggggcccagagccggagccggagc
 W G V C T E D G A Q S R S R S **930**
 2791 tgtgaggagcttctcccaggaccaggtgcctgtggttggaacagc
 C E E L L P G P G A C V G N S **945**
 2836 agccagagccggccttgc**ccc**tacagtgagattcctgtcatccta
 S Q S R P C P Y S E I P V I L **960**
 2881 cctgcttccagtggtggaggagaccaccagctgtggagggttcaat
 P A S S V E E T T S C G G F N **975**
 2926 ctcatccac**ctg**atagtcactggtgtgtcctgcttctctggtttct
 L I H L I V T G V S C F L V S **990**
 2971 gggctcttgaccttggcagtgtag**ctg**t**ctt**gcccagcactgcccag
 G L L T L A V Y L S C Q H C Q **1005**
 3016 cgccagtctcaggagtccacgcttgtccatcctgccacacctaac
 R Q S Q E S T L V H P A T P N **1020**
 3061 cacttgactacaagggtgggggcaccccccaagaatgagaagtac
 H L H Y K G G G T P K N E K Y **1035**
 3106 acccctatggaattcaagacactgaacaagaacaacttaatccct
 T P M E F K T L N K N N L I P **1050**
 3151 gatgacagagccaacttctaccactgcagcagaccaatgtgtat
 D D R A N F Y P L Q Q T N V Y **1065**
 3196 acaaccacgtactaccccagcccactgaacaagcccagcttccgg
 T T T Y Y P S P L N K P S F R **1080**
 5' 3241 cctgaggcctcacctggacagcgtgtttccccaac**agctga** 3282 bp 3'
 P E A S P G Q R C F P N S * **1093 aa**

Figura do vetor plasmidial (pQE30 – Qiagen) usado na expressão de Semaforina 5B recombinante. As enzimas usadas na subclonagem foram *Bam*HI e *Kpn*I. Em laranja está denotado a região promotora, reguladora e sítio de policlonagem do vetor



ANEXO 2: Seqüência de nucleotídeos e aminoácidos de QSOX e o respectivo vetor usado na subclonagem de QSOX

Seqüência do cDNA e dos aminoácidos de QSOX obtidos a partir de epiderme de camundongo adulto e depositados no programa BLAST. A clonagem e seqüenciamento de QSOX de camundongo foram realizados pelo grupo de Suga (MATSUBA *et al.*, 2002). A seqüência de aminoácidos correspondentes aos domínios característicos de QSOX foram coloridos para facilitar a visualização



```

5' 1 bp :atgaggaggtgcgccgctctcggggcccgcacatcgctgctgcta 3'
      M R R C G R L S G P P S L L L 15 aa
46 ctactgctgctgctctcgccctctgctcttctcggggcccggcgct
      L L L L L S P L L F S G P G A 30
91 tacgcgcccggtctcagtgctcactcgctcctctgacccgctg
      Y A A R L S V L Y S S S D P L 45
136 acgctgctggatgctgattcggtgctccactgtgctcggtcc
      T L L D A D S V R P T V L G S 60
181 agcagcgctggggcggtggagtcttcgctcctgggtgtggccac
      S S A W A V E F F A S W C G H 75
226 tgcacgcttcgccccgacgtggaaggagcttgctaacgacgtg
      C I A F A P T W K E L A N D V 90
271 aaagactggaggccagcactcaatcttgctgtcctggactgtgct
      K D W R P A L N L A V L D C A 105
316 gaggagaccaacagtgctgtctgcagagagttcaacatcgctggc
      E E T N S A V C R E F N I A G 120
361 ttcccgactgtgaggttttttcaggcctttaccaagaacggttct
      F P T V R F F Q A F T K N G S 135
406 ggagcgacactgccaggtgctggcgctaagtgtgcagactctgcgt
      G A T L P G A G A N V Q T L R 150
451 atgaggctcatcgatgctctggagtcaccacgtgacacatggccc
      M R L I D A L E S H R D T W P 165
496 ccagcctgtccacctctggaacctgccaagctgaatgatatcgac
      P A C P P L E P A K L N D I D 180
541 ggattctttacaagaaataaagcagattacctggccctggtcttt
      G F F T R N K A D Y L A L V F 195
586 gaaaggaagactcctacctgggtagagaggtaactctggacctg
      E R E D S Y L G R E V T L D L 210
631 tcccagttaccatgctgtggcagtgccgagggctcttgaatacagag
      S Q Y H A V A V R R V L N T E 225

```

676 agtgacctggtgaacaagtttggcgtcactgacttcccacatcttgt
 S D L V N K F G V T D F P S C **240**
 721 tacctgctgcttcggaatggctctgtctcccagtgacctgtgctg
 Y L L L R N G S V S R V P V L **255**
 766 gtggagtccaggtctttctatacatcctatcttcgggggctacct
 V E S R S F Y T S Y L R G L P **270**
 811 ggactgaccagggatgctcccccaaccacagccaccccagtcact
 G L T R D A P P T T A T P V T **285**
 856 gctgataagatagcaccacagtggtggaagtttgcagaccgctcc
 A D K I A P T V W K F A D R S **300**
 901 aagatctacatggccgacctggagtcgactccactacatcttg
 K I Y M A D L E S A L H Y I L **315**
 946 cgtgtagaagtggggaagttctcagtgctggagggacagcgctg
 R V E V G K F S V L E G Q R L **330**
 991 gtggccctgaaaaagtttgtggcagtattggccaagtacttcct
 V A L K K F V A V L A K Y F P **345**
 1036 gggcagcctttggtccagaacttcttgcatccataaacgactgg
 G Q P L V Q N F L H S I N D W **360**
 1081 cttcagaagcagcagaagaagaggatcccctacagtttcttcaaa
 L Q K Q Q K K R I P Y S F F K **375**
 1126 gctgctctggacagcaggaaggag**gat**gctgtccttactgagaag
 A A L D S R K E **D A V L T E K 390**
 1171 gtgaactgggtcggctgccagggcagtgagccacacttccggggg
V N W V G C Q G S E P H F R G 405
 1216 tttccctgctcactgtgggtcctcttccacttctgacgggtgcag
F P C S L W V L F H F L T V Q 420
 1261 gcaaaccgatatagtgaggcccaccacaggaaccagctgatggc
A N R Y S E A H P Q E P A D G 435
 1306 caggaggtcctccaagccatgaggagctatgttcagttcttctt
Q E V L Q A M R S Y V Q F F F 450
 1351 gg**ctgctgctgactgt**gcggaccattttgagcagatggctgcagcg
G C R D C A D H F E Q M A A A 465
 1396 tccatgcaccaagtgagaagtcccagtaatgcgattctttggctc
S M H Q V R S P S N A I L W L 480
 1441 tggactagccacaacagggttaacgctcgctctcaggtgctctg
W T S H N R V N A R L S G A L 495
 1486 agtgaggacccccacttcccccaaggtgcagtggcctccccgtgag
S E D P H F P K V Q W P P R E 510
 1531 ctg**tgctctgctgctgc**cataatgaactcaacggacaggtgcctttg
L C S A C H N E L N G Q V P L 525
 1576 tgggaccttggtgccaccctcaactttctcaaggctcacttctcc
 W D L G A T L N F L K A H F S **540**
 1621 ccagcaaacatcgtcatagactcttctgcatctagacacacaggg
 P A N I V I D S S A S R H T G **555**
 5'1666 cggagagggagtcagaagctacccccgagctgctcttgtga 1707 bp 3'
 R R G S P E A T P E L L L * **568 aa**

Figura do vetor de expressão procariótico (pET32a - Novagen) utilizado na subclonagem de QSOX. As enzimas usadas na subclonagem foram Kpn I e Hind III (visualizadas na coloração roxa).

