

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAMILA PEREIRA VIANNA

**PAPEL DA PROTEÍNA ST11 NA VIA DE SINALIZAÇÃO Rnd1 -  
p190RhoGAP**

CURITIBA  
2017

CAMILA PEREIRA VIANNA

**PAPEL DA PROTEÍNA STI1 NA VIA DE SINALIZAÇÃO Rnd1 -  
p190RhoGAP**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Marques Zanata

CURITIBA  
2017

**Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas**

Vianna, Camila Pereira  
Papel da proteína STI1 na via de sinalização Rnd1 - p190RhoGAP. /  
Camila Pereira Vianna. – Curitiba, 2017.  
61 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Silvio Marques Zanata

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de  
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia,  
Parasitologia e Patologia.

1. Proteínas 2. Citologia 3. Moléculas I. Título II. Zanata, Silvio  
Marques III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências  
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e  
Patologia.

CDD (20. ed.) 574.872



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
Departamento de Patologia Básica  
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

## TERMO DE APROVAÇÃO

**“Papel da proteína ST11 na via de sinalização Rnd1-  
p190RhoGAP”**

por

**Camila Pereira Vianna**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos professores:

**Prof. Dr. Silvio Marques Zanata – Presidente**

**Profa. Dra. Sheila Maria Brochado Winnischofer**

**Dr. Marcel Ivan Ramirez Aloya**

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, fonte de vida, força e esperança, sem o qual nada sou e nada posso.

À meus pais Edison e Luciane, e meu irmão Bruno, por todo apoio e dedicação, sempre acreditando em mim, e também pela companhia em “horários alternativos” de laboratório.

Ao meu orientador Silvio Marques Zanata pela oportunidade e por confiar a mim este projeto, pelos ensinamentos e discussões científicas que me fizeram chegar até aqui.

Ao Luiz Eduardo Rizzo de Souza, que com muita paciência me ensinou tudo o que precisava para iniciar este projeto compartilhando comigo sua experiência no mundo das GTPases, e esteve sempre disponível para me ajudar e tirar dúvidas.

À Roberta Schroder por toda ajuda, principalmente na imunização dos animais e procedimento de fusão

À todos os meus colegas de laboratório pela companhia, ensinamentos e apoio destes anos.

Aos colegas de trabalho que se tornaram amigos, sempre disponíveis para me ensinar e ajudar, além de terem tornado esta caminhada mais leve e divertida.

Aos membros da banca pela disponibilidade em aceitar o convite.

À CAPES/CNPq pelo financiamento do projeto e ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia pela bolsa de estudos.

À todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, tornaram possível este trabalho.

## RESUMO

A proteína STI1 foi descrita como uma molécula relacionada ao estresse térmico de leveduras, e por isso é denominada Stress-Inducible Protein 1. Sua homóloga humana é a Hop (Heat-shock organizing protein). Ela tem expressão praticamente ubíqua e é encontrada em vesículas intracelulares, complexo de Golgi ou dispersa no citoplasma. Estudos indicam que esta proteína participa de vários eventos celulares como desenvolvimento de astrócitos, diferenciação de neurônios, neuroproteção, neuritogênese, formação da memória em ratos e proliferação celular em tumor de ovário. Além disso, a STI1 foi também recentemente caracterizada como ligante da GTPase Rnd1. As GTPases de baixa massa molecular são um grupo de moléculas que ciclam entre as formas ativa e inativa. Aquelas pertencentes à subfamília Rnd possuem pouca atividade GTPásica intrínseca, encontrando-se constitutivamente ativas, sendo desse modo diferentes das outras Rho GTPases. A proteína Rnd1 é encontrada principalmente no cérebro, e está envolvida em vários mecanismos celulares, como a inibição de fibras de estresse e a indução da desorganização do citoesqueleto de actina e adesão focal. Além disso, Rnd1 está presente na extensão inicial de neuritos em células PC-12, e no desenvolvimento de dendritos em neurônios hipocámpais de ratos. Foi demonstrada que a interação da STI1 com a Rnd1 pode interferir na fenomenologia (colapso do cone de crescimento) desencadeada pelo eixo Sema3A/Plexina-A1. Por outro lado ainda não foi determinado quais são as vias de sinalização que estão a jusante da interação STI1-Rnd1, responsáveis por esta interferência. Desse modo, as proteínas recombinantes GST, GST-RhoA G14V e GST-RBD foram expressas para a realização de ensaios de pulldown visando elucidar o papel de STI1 na atividade de p190RhoGAP e seu substrato RhoA. Primeiramente foi possível detectar que a presença de STI1 ao inativar Rnd1, leva também a inativação de sua ligante p190RhoGAP. Porém, não foi possível esclarecer o papel desta proteína na atividade de RhoA bem como sua atuação na atividade de cofilina. A produção de anticorpo monoclonal anti-Rnd1 também foi um objetivo do presente trabalho, porém apesar da indicação da presença de anticorpos anti-Rnd1 em soro policlonal, não foi possível detectar a clone positivo para este anticorpo na produção de hibridomas.

Palavras-chave: GTPases, Rnd1, STI1, atividade.

## ABSTRACT

STI1 protein has been described as a yeast thermal stress-related molecule, and therefore called Stress-Inducible Protein 1. Its human counterpart is Hop (Heat-shock organizing protein). It has virtually ubiquitous expression and is found in intracellular vesicles, Golgi complex or dispersed in the cytoplasm. Studies indicate that this protein participates in several cellular events such as astrocyte development, differentiation of neurons, neuroprotection, neuritogenesis, memory formation in rats and cell proliferation in ovarian tumor. In addition, STI1 has also recently been characterized as GTPase Rnd1 linker. Low molecular weight GTPases are a group of molecules that cycle between active and inactive forms. Those belonging to the subfamily Rnd have little intrinsic GTPase activity, being constitutively active, thus being different from the other Rho GTPases. Rnd1 protein is found primarily in the brain, and it is involved in several cellular mechanisms, such as inhibition of stress fibers and induction of actin cytoskeleton disorganization and focal adhesion. In addition, Rnd1 is present in the initial extension of neurites in PC-12 cells, and in the development of dendrites in hippocampal neurons of rats. It has been shown that the interaction of STI1 with Rnd1 can interfere in the phenomenology (growth cone collapse) triggered by the Sema3A / Plexin-A1 axis. On the other hand, it has not yet been determined which are the signaling pathways that are downstream of the STI1-Rnd1 interaction, responsible for this interference. Thus, the recombinant GST, GST-RhoA G14V and GST-RBD proteins were expressed for pulldown assays to elucidate the role of STI1 in p190RhoGAP activity and its RhoA substrate. First, it was possible to detect that the presence of STI1 when inactivating Rnd1 also leads to the inactivation of its p190RhoGAP ligand. However, it was not possible to clarify the role of this protein in RhoA activity as well in cofilin activity. The production of anti-Rnd1 monoclonal antibody was also an objective of the present work, but despite the presence of anti-Rnd1 antibodies in polyclonal serum, it was not possible to detect the positive clone for this antibody in the production of hybridomas.

Key words: GTPases, Rnd1, STI1, activity.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESQUEMA DO FUNCIONAMENTO DAS GTPASES.....	19
FIGURA 2 - ESQUEMA DE ATUAÇÃO DA GTPASE RND1 NA ACTINA.....	21
FIGURA 3 - EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES GST (A), GST-RHOA G14V (B) E GST-RBD (C) EM PEQUENA ESCALA.....	29
FIGURA 4 - EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS GST, GST-RHOA E GST-RBD EM LARGA ESCALA.....	30
FIGURA 5 – ENSAIO DE PULLDOWN PARA AVALIAÇÃO DO PAPEL DE STI1 NA ATIVIDADE DE p190RhoGAP.....	31
FIGURA 6 - ANÁLISE DO PAPEL DA PROTEÍNA STI1 NA ATIVIDADE DE p190RhoGAP EM CELULAS COS-7 ATRAVÉS DE ENSAIO DE PULLDOWN.....	33
FIGURA 7 – EXPRESSÃO DE RhoA EM CELULAS HEK293T.....	34
FIGURA 8 – ESTIMATIVA DA MASSA DE GST-RBD EM VOLUME DE EXTRATO TOTAL BACTERIANO A PARTIR DA COMPARAÇÃO COM DIFERENTES MASSAS CONHECIDAS DE BSA .....	35
FIGURA 9 – PADRONIZAÇÃO DO VOLUME ADEQUADO DE LISADO BACTERIANO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE GST-RBD PARA ENSAIO DE PULLDOWN.....	36
FIGURA 10 – PADRONIZAÇÃO DO TEMPO DE TRANSFEÇÃO DE HA-Rnd1 PARA MELHOR DETECÇÃO DE RhoA ATIVA.....	37
FIGURA 11 - ANÁLISE DA ATIVIDADE DE RhoA NA PRESENÇA DA GTPase Rnd1 SELVAGEM.....	38
FIGURA 12 – PADRONIZAÇÃO DO TEMPO IDEAL DO TRATAMENTO DAS CELULAS HEK293T PARA DETECÇÃO DE RhoA ATIVA.....	38
FIGURA 13 – ANÁLISE DO PAPEL DA PROTEÍNA STI1 NA ATIVIDADE DE RhoA EM CELULAS 293T ATRAVÉS DE ENSAIO DE PD.....	39
FIGURA 14 – MINI-EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE GST-Rnd1 .....	40
FIGURA 15 – PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE GST-Rnd1 COM RESINA DE GLUTATIONA-SEPHAROSE.....	41
FIGURA 16 – MINI-EXPRESSÃO DA RECOMBINANTE 6His-Rnd1.....	42

FIGURA 17 - PURIFICAÇÃO DA RECOMBINANTE 6His-Rnd1 COM COLUNA DE NIQUEL .....	42
FIGURA 18 - REAÇÃO DE WESTERN BLOT PARA TESTE DE SORO POLICLONAL ANTI-Rnd1 DOS ANIMAIS 01 E 02.....	43
FIGURA 19 - REAÇÃO DE WB PARA TESTE DE SORO POLICLONAL ANTI-Rnd1 DOS ANIMAIS 03 E 04.....	44
FIGURA 20 - CONFIRMAÇÃO DA PRESENÇA DE ANTICORPOS ANTI-Rnd1 NO SORO DO ANIMAL 03 EM REAÇÃO DE WB.....	44
FIGURA 21 - REAÇÃO DE WB PARA TESTE DE SORO POLICLONAL ANTI-Rnd1 DOS ANIMAIS 05 A 08.....	46
FIGURA 22 - VARREDURA DOS HIBRIDOMAS POR WB .....	47

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CONDIÇÕES DE INDUÇÃO DAS RECOMBINANTES UTILIZADAS NO PULLDOWN .....	23
TABELA 2 - CONDIÇÕES DE INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DAS RECOMBINANTES UTILIZADAS NA IMUNIZAÇÃO DOS ANIMAIS. ....	24
TABELA 3 - VARREDURA DOS HIBRIDOMAS POR WB .....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS

BSA – albumina de soro bovino  
COS-7 – células de rim de macaco semelhantes a fibroblasto  
GEF - Guaninenucleotide Exchange Factors  
GAP – GTPase Activating Proteins  
DTT - Ditioneitol  
DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium  
EDTA – Ácido etilenodiamno tetra-acético  
HEK 293T – células de rim embrionário humano 293T  
Hsp – Heat shock protein  
Hop – proteína organizadora de Hsp 70/90  
IPTG – isopropil-beta-D- iogalactopiranósido  
LPA – ácido lisofosfatídico  
LIMK – LIM-kinases  
MEM – Minimal essencial medium  
Nrp 1 – neuropilina 1  
PEG - polietilenoglicol  
PKA – protein kinase A  
PrPc – Proteína príon celular  
PBS – tampão salina fosfato  
PMSF – fluoreto de fenilmetilsulfonil  
RPMI – Roswell Park Memorial Institute Medium  
HAT – suplemento composto por hipoxantina, aminopterina e timidina  
HT – suplemento composto por hipoxantina e timidina  
SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sódio  
SFB – soro fetal bovino  
STI1 – stress inducible protein 1  
STIP1 – stress inducible phospho protein 1  
TMB - 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina  
TBST – tampão salino Tris adicionado de Tween 20  
TRP – domínios repetidos de tetratricopeptídeos

VSMC – vascular smooth muscle cells

WB – *Western blotting*

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
1.1. OBJETIVO GERAL.....	13
1.1.1. Objetivos específicos.....	13
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>14</b>
2.1. PROTEÍNA STI1 (STRESS-INDUCIBLE PROTEIN-1).....	14
2.1.1. Estrutura da STI1.....	14
2.1.2. Funções da STI1.....	14
2.1.3. STI1 e o citoesqueleto de actina.....	16
2.2. GTPASES DE BAIXA MASSA MOLECULAR E RND1.....	16
2.2.1. Funções das GTPases.....	17
2.3. RND1, STI1, VIA DA SEMAFORINA 3A E ATIVIDADE DE RhoA... 19	
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	<b>22</b>
3.1. OBTENÇÃO DOS VETORES DE INTERESSE.....	22
3.2. EXPRESSÃO DAS RECOMBINANTES GST, GST-RBD, GST-RhoA G14V, GST-Rnd1 E 6His-Rnd1.....	22
3.2.1. Transformação bacteriana.....	22
3.2.2. Produção das proteínas recombinantes.....	23
3.2.3. Obtenção dos lisados bacterianos.....	24
3.3. ENSAIOS DE PULLDOWN.....	24
3.3.1. Transfecção de células HEK 293T pelo método de co-precipitação de fosfato de cálcio e obtenção de extrato celular.....	24
3.3.2. Transfecção de células COS-7 com o Lipofectamina 2000 para ensaio de <i>pulldown</i> com GST-RhoA.....	25
3.3.3. <i>Pulldown</i> com GST-RBD e GST-RhoA G14V.....	25

3.3.4.	<i>Pulldown</i> GST-RBD com estímulo de ácido lisofosfatídico .....	26
3.4.	PRODUÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-Rnd1 .....	26
3.4.1.	Imunização dos animais.....	26
3.4.2.	Fusão de células mielóides e esplenócitos de camundongos imunizados contra Rnd1.....	27
3.4.3.	Varredura dos hibridomas para detecção de anticorpos anti-Rnd1 pelo método de ELISA .....	28
3.4.4.	Varredura dos hibridomas para detecção de anticorpos anti-Rnd1 por <i>Western Blot</i> .....	28
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>29</b>
4.1.	EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES PARA ENSAIO DE <i>PULLDOWN</i> .....	29
4.2.	ANÁLISE DO PAPEL DE STI1 NA ATIVIDADE DE p190RhoGAP ATRAVÉS DE ENSAIO DE <i>PULLDOWN</i> COM GST-RhoA G14V.....	30
4.3.	ANÁLISE DO PAPEL DA PROTEÍNA STI1 NA ATIVIDADE DE RhoA ATRAVÉS DE ENSAIO DE <i>PULLDOWN</i> .....	33
4.3.1.	Padronização dos ensaios .....	33
4.3.2.	<i>Pulldown</i> GST-RBD .....	37
4.4.	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE GST-Rnd1 PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL.....	40
4.5.	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE 6His-Rnd1 PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL.....	41
4.6.	TESTE DE SORO POLICLONAL GST-Rnd1.....	42
4.7.	TESTE DE SORO POLICLONAL ANTI-6His-Rnd.....	45
4.8.	VARREDURA DOS HIBRIDOMAS.....	46
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>48</b>
5.1.	STI1 E A ATIVIDADE DE p190RhoGAP.....	48
5.2.	STI1 E A ATIVIDADE DE RhoA .....	49
5.3.	PRODUÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-Rnd1.....	51

6.	CONCLUSÃO.....	54
7.	REFERÊNCIAS.....	55

## 1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento do sistema nervoso depende de uma arquitetura complexa de redes neuronais. O surgimento e alongamento de neurônios no tempo e lugar certo são essenciais para a correta conexão neural e perfeito funcionamento cerebral (DA SILVA e DOTTI, 2002). A proteína STI1 e a GTPase de baixa massa molecular Rnd1 são expressas no sistema nervoso central e ambas estão envolvidas no crescimento de neuritos e na plasticidade do citoesqueleto (NOBES et al., 1998; LOPES et al., 2005; ZANATA et al., 2002b; DE SOUZA et al., 2014).

STI1, também conhecida como *stress inducible protein 1*, HOP ou STIP1, foi descrita como uma co-chaperona que regula as atividades de Hsp70 e Hsp90 (ROHL et al., 2015; revisado por BAINBUR-HUDSON et al., 2015) e posteriormente como um ligante da proteína príon celular, PrPc (ZANATA et al., 2002a LOPES et al., 2005). Ela possui como importante característica a presença de três domínios TRP que são responsáveis pela sua interação com as chaperonas e é expressa em neurônios e células da glia no desenvolvimento do sistema nervoso (NICOLET e CRAIG, 1989).

A GTPase Rnd1 pertence a família Rho e assim como as outras proteínas deste grupo participa na regulação da polaridade celular, transcrição gênica, progressão da fase G1 do ciclo celular, dinâmica dos microtúbulos, vias de transporte vesicular e uma variedade de atividades enzimáticas (ETIENNE-MANNEVILLE e HALL, 2002) Além disso, quando superexpressa atua regulando a formação de fibras de estresse e a plasticidade do citoesqueleto de células COS-7 (CHARDIN, 2006; ZANATA et al., 2002).

Tendo em vista os mecanismos das proteínas STI1 e Rnd1 descritos em diversos processos biológicos, surgiu o questionamento da possibilidade destas atuarem de forma conjunta. De fato nosso grupo recentemente demonstrou (DE SOUZA et al., 2014) que STI1 interage fisicamente com Rnd1, podendo interferir na sinalização mediada pelo eixo Sema-3A/plexina-A1/Rnd1 (ZANATA et al., 2002b). Por outro lado ainda não está claro como a interação STI1-Rnd1 pode modular o colapso do citoesqueleto. Desse modo, compreender como os diferentes sinais bioquímicos são integrados durante eventos relacionados ao desenvolvimento do sistema nervoso e mecanismos moleculares pelos quais estes sinais determinam o comportamento celular em diferentes

condições fisiológicas tornam esse tema relevante. Por este motivo, investigar a regulação da proteína Rnd1 pela STI1 no contexto da sinalização desencadeada pela interação Sema-3A/plexina-A1/Rnd1 justifica a execução deste trabalho.

## 1.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar a via de transdução de sinal a jusante da interação Rnd1-STI1 e desencadeada pelo eixo Sema-3A/plexina-A1/Rnd1.

### 1.1.1. Objetivos específicos

- Analisar a atividade da GTPase RhoA, sob condições de superexpressão de Rnd1 e STI1, através de ensaios de *pulldown* com a proteína GST-RBD (domínio de ligação da proteína Rhotekin a RhoA ativa).
- Analisar a atividade funcional de p190RhoGAP, por ensaios de *pulldown* com a proteína GST-RhoA-G14V (mutante constitutivamente ativa da proteína RhoA), sob condições de superexpressão de Rnd1 e STI1.
- Produzir anticorpo monoclonal anti-Rnd1 para uso nos ensaios de *pulldown*.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. PROTEÍNA STI1 (STRESS-INDUCIBLE PROTEIN-1)

#### 2.1.1. Estrutura da STI1

A proteína STI1 foi descrita pela primeira vez por Nicolet e colaboradores em 1989 a partir do isolamento e caracterização de um gene do fungo *Saccharomyces cerevisiae*. Verificou-se neste estudo que ela possui massa molecular de 66 kDa e atividade relacionada à chaperona Hsp70 em resposta a estresse térmico, sem apresentar entretanto nenhum homólogo em mamíferos (NICOLET e CRAIG, 1989). Mais tarde, porém, constatou-se que esta proteína é homóloga a STI1 humana (hSTI1), também conhecida como Hop, que possui 42% de sua sequência de aminoácidos idêntica a da STI1. Ela é encontrada no citoplasma, complexo de Golgi, vesículas citoplasmáticas e uma pequena fração na superfície celular (HONORE *et al.*, 1992).

Quanto a sua estrutura, esta proteína apresenta 3 domínios TPR (repetição de tetratricopeptídeos) formados por 34 aminoácidos, tornando-a capaz de ligar as porções C-terminais de Hsp90 e Hsp70 (SMITH, 2004). A atividade da STI1 como uma adaptadora destas proteínas de choque térmico pode ocorrer de forma independente ou simultânea, como descrita por (CHEN E SMITH, 1998). Ao estabelecer a ligação entre Hsp70 e Hsp90, a STI1 possibilita a transferência de peptídeos para dobramento e maturação de proteínas, e desse modo, é tida como uma co-chaperona (ROHL *et al.*, 2015).

#### 2.1.2. Funções da STI1

Em trabalho publicado por Zanata e colaboradores em 2002, a STI1 é apresentada como um ligante de superfície celular da PrPc (proteína príon celular). Esta é uma sialoglicoproteína da membrana plasmática presente em neurônios e outros tipos celulares com funções biológicas ainda sob investigação. Sabe-se, porém, que ela está envolvida em processos de modulação de sobrevivência neural e transdução de sinal. Empregando o princípio da hidropaticidade complementar (BRENTANI, 1988) foi possível caracterizar um domínio de 15 aminoácidos na mSTI1<sub>(230-245)</sub> com um mesmo

perfil hidropático complementar ao do domínio 106-126 da proteína PrPc (MARTINS *et al.*, 1997). A interação STI1-PrPc foi assim caracterizada como responsável pela indução de sinais de sobrevivência em neurônios (ZANATA *et al.*, 2002a, CHIARINI *et al.*, 2002). Além disso, foi demonstrada a super expressão destas proteínas em glioblastoma humano, estando correlacionado com maior taxa de proliferação e crescimento do tumor bem como pior prognóstico (LOPES *et al.*, 2014).

STI1 é expressa em uma variedade de neurônios e células da glia durante o desenvolvimento do sistema nervoso e também sua expressão se mantém no indivíduo adulto. Já foi demonstrado que sua deleção é letal para embriões e que animais heterozigóticos que expressam metade dos níveis normais para esta proteína apresentam maior sensibilidade a injúrias cerebrais (SANTOS *et al.*, 2015). Desse modo, também já foi descrita a sua participação em diversos eventos celulares tais como: desenvolvimento de astrócitos, diferenciação de neurônios, neuroproteção por prevenir apoptose via ativação de PKA em neurônios da retina de ratos, neuritogênese, formação da memória em ratos e proliferação celular em tumor de ovário (WANG *et al.*, 2010; HAJJ *et al.*, 2013; ARANTES *et al.*, 2009; CAETANO *et al.*, 2009; CHIARINI *et al.*, 2002; LOPES *et al.*, 2005; ZANATA *et al.*, 2002b).

Recentemente foi caracterizada a presença de um sinal de direcionamento de STI1 para o núcleo (DANIEL *et al.*, 2008; LONGSHAW *et al.*, 2004). Foi demonstrada também sua secreção por astrócitos, em condições de estresse, em co-cultivo com neurônios disparando nestes últimos uma cascata de sinalização neuroprotetora. Em 2013, Hajj e colaboradores demonstraram a secreção de STI1 via vesículas extracelulares mesmo sem a presença de nenhum sinal de secreção (LIMA *et al.*, 2007; ARANTES *et al.*, 2009; CAETANO *et al.*, 2009). Seu direcionamento para a porção extracelular da membrana plasmática se dá provavelmente por associação com proteínas de membrana (HONORE *et al.*, 1992) ou devido a sua secreção não convencional em vesículas extracelulares, em associação com as proteínas Hsp70 ou Hsp90 (CALDERWOOD *et al.*, 2007; GASTPAR *et al.*, 2005). Caetano e colaboradores (2009) propõem um mecanismo de internalização da STI1 independente da presença de PrPc, via *lipid rafts*. Estes são micro domínios de membrana ricos em colesterol, que podem incluir ou excluir várias proteínas, e desse modo, participam da ativação de sinais

de neuritogênese e diferenciação (SIMONS e SAMPAIO, 2011; GRIDER *et al.*, 2009; DANG *et al.*, 2012; ZHAO *et al.*, 2009).

Por fim, a mais recente revisão sobre a STI1 destacou que apesar de sua função biológica não estar totalmente clara, sua participação em eventos do desenvolvimento embriológico é evidente e consistente com a relação desta com o câncer. Além disso, a variação de sua sequência e domínios sugere que esta proteína é resultado de sua evolução em diferentes papéis biológicos (BAINDUR-HUDSON *et al.*, 2015).

### 2.1.3. STI1 e o citoesqueleto de actina

A proteína STI1 é amplamente expressa no citoplasma e em trabalho publicado por Willmer e colaboradores (2013) mostrou ter importante papel na regulação da dinâmica do citoesqueleto e formação de pseudopodia durante a migração de células endoteliais. Isso ocorre pois esta proteína liga-se diretamente a tubulina e se localiza com microtúbulos.

Em 2014, nosso grupo mostrou que a STI1 liga-se de forma específica a GTPase Rnd1 levando ao bloqueio do colapso do citoesqueleto induzido pela interação entre Rnd1 e Plaxina-A1. Além disso, foi mostrado também que na co-expressão de STI1 e Rnd1 em células PC-12 ocorre a inibição da formação de novos processos e aumenta o estabelecimento de neuritos maiores.

## 2.2. GTPASES DE BAIXA MASSA MOLECULAR E RND1

GTPases são interruptores moleculares que ciclam entre dois estados conformacionais: um estado ativo, ligado a GTP, e outro inativo, ligado a GDP, sendo responsáveis pela hidrólise de GTP para GDP. Quando em seu estado ativo, essas moléculas reconhecem proteínas alvo, geram resposta até que a GTP seja hidrolisada, ou seja, passe para a forma inativa. Esta troca de estados é facilitada por duas classes de proteínas: GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factors) e GAPs (GTPase Activating Proteins). A primeira atuando na troca de GDP por GTP, e a segunda, GTP por GDP (revisado por LUO, 2000).

Dentro das GTPases, a superfamília Ras têm se destacado visto que seus membros regulam várias atividades celulares. Esta é subdividida em cinco grandes grupos: Ras, Rab, Arf, Ran e Rho (revisado por ETIENNE-MANNEVILLE e HALL, 2002). As RhoGTPases, assim como os outros membros da superfamília Ras, também atuam como interruptores moleculares, e além disso, são cruciais em vários eventos celulares como transporte de membrana, regulação transcricional, controle do crescimento celular e desenvolvimento (VAN AELST e D'SOUZA-SCHOREY, 1997).

As moléculas Rho possuem também papel importante na regulação da actina do citoesqueleto de células eucarióticas e medeiam as mudanças morfológicas vistas durante o desenvolvimento neural como a formação de fibras de estresse e adesões focais (revisado por LUO, 2000).

A família de GTPases Rnd (Rnd1/Rho6, Rnd2 e Rnd3/RhoE) foi caracterizada por Nobes e colaboradores em 1998. Este grupo mostrou que as Rnds não possuem afinidade por GDP e estão constitutivamente ativas. Estas têm expressões diferenciadas, Rnd1 é expressa em diversos tecidos, como cérebro, ovário de ratas prenhas, miométrio de mulheres durante a gravidez, pulmão, fígado e células endoteliais (Kim *et al.*, 2005; NOBES *et al.*, 1998). Rnd2 é muito expressa em espermátides e espermatócitos, localizando-se na vesícula acrossômica, endossomos primários em células HeLa e cérebro (FUJITA *et al.*, 2002; NOBES *et al.*, 1998). Rnd3 é ubiquamente expressa, entretanto o seu nível de expressão varia muito dependendo do tecido analisado (ISHIKAWA *et al.* 2003; NOBES *et al.* 1998). Em 2012 Oinuma e colaboradores demonstraram que uma sequência de cinco aminoácidos KERRA (Lys-Glu-Arg-Arg-Ala) na porção N-terminal é responsável por ancorar Rnd1 e Rnd3 nos *lipid rafts*, sendo este o local de atividade destas proteínas nas células estudadas.

### 2.2.1. Funções das GTPases

Estudos biológicos iniciais têm sugerido que as proteínas Rnd têm papel fundamental na regulação celular por neutralizar as funções biológicas da GTPase RhoA, mas a base molecular deste antagonismo é desconhecido. Possíveis mecanismos através dos quais as proteínas Rnd podem funcionar como antagonistas da RhoA

incluem sequestro de efetores moleculares da RhoA, inibição de GEFs e ativação de GAPs para RhoA - como a p190RhoGAP, quando Rnd1 e Rnd3 estão localizadas nos *lipid rafts* (microdomínios da membrana ricos em colesterol e esfingolipídios). Isso ocorre pois esta estimula a hidrólise de GTP, levando a inativação de RhoA. Foi visto também que em células COS-7 sua atividade aumenta quando há superexpressão de Rnd1 e Rnd3. Desse modo, a p190RhoGAP possui papel importante no crescimento axonal e desenvolvimento neural, além disso, mais recentemente a superexpressão de seu gene codificante foi associada a 2% dos tumores em geral. (OINUMA *et al.*, 2004; RUSHTON, 2003; CHARDIN, 2006; BINAMÉ *et al.*, 2016)

Em precursores neurais, a superexpressão da GTPase Rnd1 inibe a formação das fibras de estresse e induz a desorganização do citoesqueleto de actina e adesões focais, causando a perda de adesão à matriz extracelular (VAYSSIÈRE *et al.*, 2000). No contexto do desenvolvimento do sistema nervoso foi demonstrado que Rnd1 possui alta expressão no córtex cerebral e no hipocampo durante a formação de sinapses e possui também papel na formação espinhal (ISHIKAWA *et al.*, 2003). Além disso, Zanata e colaboradores (2002b) demonstraram também que Rnd1 interage com o domínio citoplasmático da proteína plexina-A1, um receptor para a semaforina-3A (Sema3A). Esta interação induz o colapso do citoesqueleto em células COS-7 e o rearranjo dos cones de crescimento de neurônios da raiz ganglionar de embriões de aves.

De acordo com Xiang e colaboradores (2016), a desregulação de Rnd1 chama atenção na tumorigênese. Enquanto sua superexpressão está associada a metástase em cânceres mamários, estudos mostram que ela também inibe a tumorigênese mamária ao restringir o sinal Ras-MAPK. Já em carcinoma de células esofágicas esta proteína está superexpressa. Desse modo, fica claro sua importância no contexto de migração e crescimento celular.

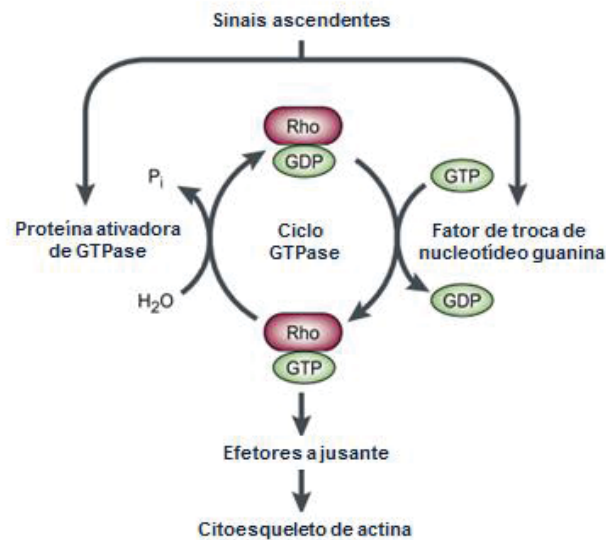


FIGURA 1 - ESQUEMA DO FUNCIONAMENTO DAS GTPASES. FONTE: LUO (2000). Traduzido pela autora.

### 2.3. RND1, STI1 , VIA DA SEMAFORINA 3A E ATIVIDADE DE RhoA

As semaforinas constituem uma grande família de proteínas secretadas ou de membrana plasmática que têm papel importante no direcionamento de axônios durante o desenvolvimento do sistema nervoso. A função das semaforinas (Sema) no sistema nervoso é mediada pelas plexinas, as quais podem ser classificadas em quatro subfamílias: plexina-A1-4, plexina-B1-3, plexina-C1 e plexina-D1. O membro melhor caracterizado da família das semaforinas é a Sema-3A, a única representante da família que é secretada e atua como molécula quimiorrepelente em cones de crescimento de neurônios migratórios, e uma grande variedade de moléculas está envolvida na via de sinalização desencadeada pela Sema-3A. Embora a maioria das semaforinas se ligue diretamente a plexinas, Sema-3A requer um complexo de receptor formado por plexina-A1/2 e a neuropilina (LUO *et al.*, 1993; OINUMA *et al.*, 2004; TAKAHASHI *et al.*, 1999).

Algumas semaforinas atuam como sinais repulsores, que induzem o colapso de cones de crescimento ou induzem a mudança de direção migratória de axônios, em relação às células que expressam tanto as formas ligadas à membrana quanto às secretadas (PUSCHEL, 2007).

Na ausência de um sinal extracelular, as plexinas assumem uma conformação estrutural em que a sua porção citoplasmática torna-se inativa (Takahashi *et al.*, 1999). A ligação direta, por exemplo, a SEMA-4D, ou indiretamente via um co-receptor de membrana Nrp1 (Neuropilina-1 para a SEMA-3A) promove a ativação das plexinas (OINUMA *et al.*, 2004 e TAKAHASHI *et al.*, 1999)

Curiosamente, a deleção da porção extracelular das plexinas resulta na ativação constitutiva dessas proteínas (OINUMA *et al.*, 2004). Dessa forma foi que Zanata e colaboradores (2002b) mostraram que a co-expressão da porção citoplasmática da plexina-A1 e da GTPase Rnd1 em células COS7 seria suficiente para induzir o colapso do citoesqueleto nestas células. Neste mesmo trabalho os autores sugerem a participação da via de sinalização que envolve a proteína LIMK1 e a proteína cofilina-1 na despolimerização (colapso) do citoesqueleto nos ensaios de colapso de cones de crescimento induzidos pela interação Rnd1/plexina-A1 citoplasmática.

Os efeitos das proteínas Rnd1 e Rnd3 estão diretamente associados à inibição da proteína RhoA, através da ativação da proteína p190RhoGAP, que funciona como a GAP mais abundante de RhoA em células (Wennerberg *et al.*, 2003). A proteína p190RhoGAP deve ser translocada para os *lipid rafts* para então promover a inativação de RhoA. Esse papel de recrutador da p190RhoGAP para os *lipid rafts* é desempenhado pela Rnd1 (OINUMA *et al.*, 2012). Interessantemente, Carcea e colaboradores (2010) sugeriram que via de sinalização Sema3A/plexina-A seria regulada pela internalização de Sema-3A via *lipid rafts*, dando as primeiras pistas para um provável envolvimento destes microdomínios de membrana na sinalização desencadeada pela Rnd1 via plexina-A1 e indo ao encontro dos resultados posteriormente obtidos por Oinuma e colaboradores (2012).

Mais recentemente, nosso grupo caracterizou a proteína STI1 como uma parceira molecular da Rnd1 e que esta interação reverte parcialmente o colapso do citoesqueleto de células COS-7, induzido pela interação de Rnd1/plexina-A1 (DE SOUZA *et al.*, 2014). Além disso, foi observada uma redução na extensão de prolongamentos dos neuritos em diversas linhagens celulares de origens neuronais (DE SOUZA *et al.*, 2014). Entretanto os mecanismos bioquímicos que estão envolvidos nesta regulação da Rnd1 pela

interação com a proteína STI1 ainda precisam ser estudados, uma vez que somente mudanças morfológicas foram evidenciadas.

Portanto, a partir de dados publicados pelo nosso grupo (DE SOUZA *et al.*, 2014), levantamos a hipótese de que a regulação da Rnd1 pela STI1 poderia envolver o deslocamento de Rnd1 para fora dos *lipid rafts* e concomitante inativação da p190RhoGAP e ativação da GTPase RhoA. Como consequência, haveria reversão no estado de fosforilação da proteína cofilina-1 e levando a inibição do colapso do citoesqueleto. Assim, tivemos como foco principal deste trabalho a compreensão dos mecanismos moleculares desencadeados pela interação Rnd1-STI1.

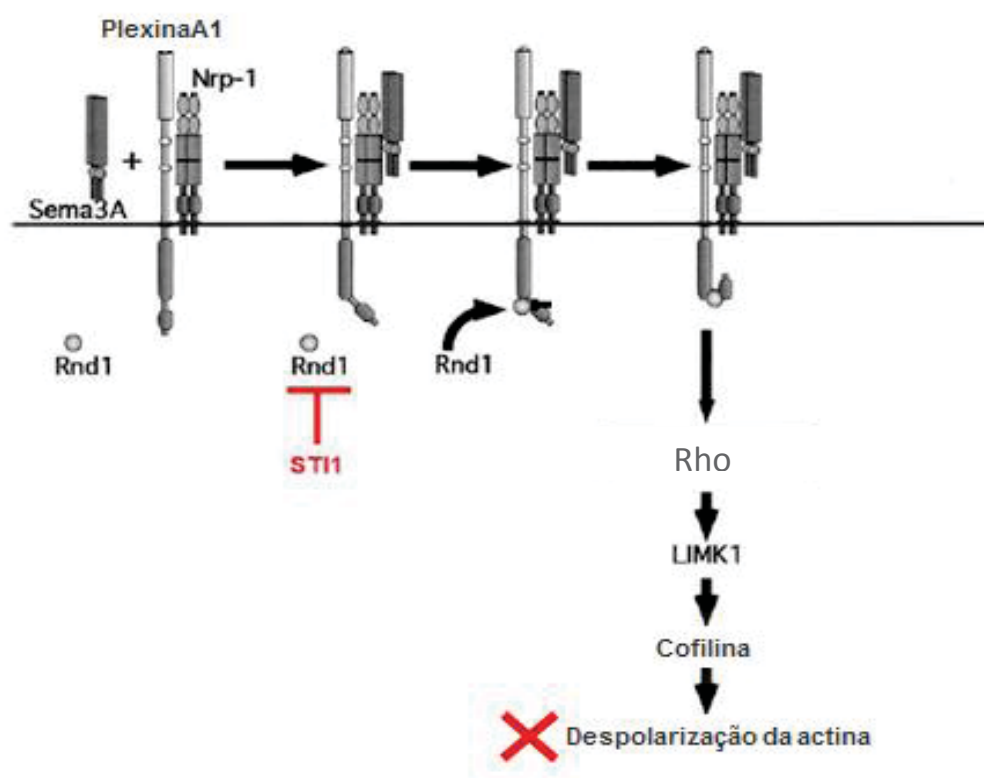


FIGURA 2 - ESQUEMA DE ATUAÇÃO DA GTPASE Rnd1 NA ACTINA. Sema3A: semaphorina-3A; Nrp-1: neuropilina-1; Rnd, Rac e Rho: GTPases; LIMK e cofilina: mensageiros na cascata de sinalização. FONTE: em escala de cinza: ZANATA *et al.* (2002b); em vermelho: adição da autora.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. OBTENÇÃO DOS VETORES DE INTERESSE

O plasmídeo para a expressão da proteína pcDNA3/HA-Rnd1 foi cedido por Dra. Izumi Oinuma (Laboratory of Molecular Neurobiology, Graduate School of Biostudies – Kyoto University). Os plasmídeos pGEX-4T-2/RBD (Rho Binding Domain da proteína Rhotekin efetora de RhoA), pGEX-4T-4/RhoA (G14V), GFP-p190RhoGAP e pcDNA3/HA-Rnd1 $\Delta$ N (Com a seqüência de aminoácidos KERRA para localização da proteína nos *lipid rafts* deletada) foram cedidos por Dr. Hironori Katoh do mesmo laboratório.

Fonte dos demais plasmídeos utilizados neste trabalho: pBK-myr-myc-plexina-A1 (Porção citoplasmática) (RHOM *et al.*, 2000), pEGFP-Rnd1 (RHOM *et al.*, 2000) e pEGFP-STI1 (ZANATA *et al.*, 2002a)

#### 3.2. EXPRESSÃO DAS RECOMBINANTES GST, GST-RBD, GST-RhoA G14V, GST-Rnd1 E 6His-Rnd1

##### 3.2.1. Transformação bacteriana

A transformação para expressão das recombinantes GST-RBD, GST-RhoA e GST-Rnd1 foi realizada em *E. coli* BL21 (DE3) STAR eletrocompetente. Em seguida, as bactérias foram plaqueadas em meio ágar 2xYT (16g/L de triptona, 10/L de extrato de levedura, 5g/L de NaCl e 15g/L de ágar) adicionado de ampicilina 50 $\mu$ g/ $\mu$ L e incubadas à 37°C durante a noite.

Já para a expressão de 6His-Rnd1, a transformação foi realizada em bactéria eletrocompetente *E. coli* M15 que foi plaqueada em meio LB (10g/L de triptona, 5g/L de extrato de levedura, 10g/L de NaCl e 15g/L de ágar) com os antibióticos ampicilina (50 $\mu$ g/ $\mu$ L) e canamicina (30 $\mu$ g/ $\mu$ L) devido a resistência da bactéria e do vetor.

### 3.2.2. Produção das proteínas recombinantes

Foram selecionadas 4 colônias que cresceram na placa após a transformação e fez-se uma expressão em pequena escala (mini-expressão) para escolher a colônia com melhor expressão para posteriormente utilizar esta para larga escala, como descrito por Sambrook e Russel (2001). Estas foram inoculadas em 3mL de meio 2xYT com 50µg/µL de ampicilina por 16 horas no agitador a 37°C. A partir destes pré-inóculos foram realizados os inóculos na diluição 1:50 em 10mL de meio adicionado de antibiótico e mantidos a 37°C sob agitação até que atingissem D.O entre 5,0 e 6,0 quando medidas em 600nm. Nesse momento foi adicionado 0,1mM de IPTG e a indução da expressão das recombinantes GST, GST-RhoA G14V e GST-RBD seguiu-se inicialmente de forma igual, por 2h a 37°C. Porém, após verificar a formação de corpúsculos de inclusão na expressão de GST-RBD, esta passou a ser induzida a 30°C, pelo mesmo tempo (tabela 1). Os sedimentos das culturas induzidas e não induzidas foram então submetidos a uma separação eletroforética por SDS-PAGE (12% de poliacrilamida) e corada com azul de Coomassie para verificação do clone com melhor taxa de expressão (SHAPIRO *et al.*, 1967). Para expressão em larga escala, utilizou-se processo análogo ao de pequena escala, aumentando-se apenas os volumes dos pré-inóculos (20mL) e inóculos (500mL).

<b>BL21 Star (DE3)</b>	<b>IPTG</b>	<b>Temperatura de indução</b>	<b>Tempo de expressão</b>
GST	0,1mM	37°C	2h
GST-RhoA	0,1mM	37°C	2h
GST-RBD	0,1mM	30°C	2h

TABELA 1 - CONDIÇÕES DE INDUÇÃO DAS RECOMBINANTES UTILIZADAS NO PULLDOWN PD.

FONTE: A autora (2017).

Quanto a indução das recombinantes GST-Rnd1 e 6His-Rnd1 utilizadas para imunização dos camundongos, os parâmetros utilizados estão descritos em na tabela 2.

Recombinante	Sistema de expressão	IPTG	Temperatura de indução	Tempo de expressão
GST-Rnd1	BL21 Star (DE3)	0,1mM	37°C	2h
6His-Rnd1	M15	1mM	37°C	4h

TABELA 2 - CONDIÇÕES DE INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DAS RECOMBINANTES UTILIZADAS NA IMUNIZAÇÃO DOS ANIMAIS.  
 FONTE: A autora (2017).

### 3.2.3. Obtenção dos lisados bacterianos

Para lise das recombinantes GST, GST-RBD, GST-RhoG14V (forma constitutivamente ativa de RhoA), a serem utilizadas nos ensaios de *pulldown*, e GST-Rnd1 para imunização de animais, os sedimentos de bactéria referentes a 200mL de cultura obtidos na expressão de larga escala foram ressuspensos em 20 de tampão de lise (1xPBS, 2mM DTT, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 10% Glicerol, 1% Triton X-100, 1mM PMSF) e lisados em 4 ciclos na prensa de French. Após a lise centrifugou-se a 15000xg por 10 minutos. O sobrenadante foi então filtrado com filtro de 1,2 µm. Já para obter o lisado da 6His-Rnd1, utilizou 12mL de tampão de lise desnaturante (500mM NaCl, 200mM Tris-HCl pH 8,0, 5% glicerol, 2mM PMSF, 6M ureia e 10mM imidazol) com o qual primeiramente realizou-se uma lise química de 45 minutos em banho de gelo para posterior lise mecânica com quatro ciclos na *French Press*. O lisado foi então centrifugado a 4000xg por 30 minutos a 4°C. Em seguida, este foi filtrado e congelado.

As recombinantes utilizadas para imunização GST-Rnd1 e 6His-Rnd1 seguiram para protocolo de purificação por cromatografia de afinidade à glutationa-sepharose e níquel.

## 3.3. ENSAIOS DE *PULLDOWN*

### 3.3.1. Transfecção de células HEK 293T pelo método de co-precipitação de fosfato de cálcio e obtenção de extrato celular

Células HEK 293T foram cultivadas em meio MEM (meio mínimo essencial, Cultilab) com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab) e 40 mg/ml de antibiótico gentamicina (Garamicina Mantecorp) e mantidas em incubadora úmida a 37°C com tensão de 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24 horas do seu repique, ao atingirem 70% de confluência, as células foram transfectadas pelo método de co-precipitação por cálcio como descrito por Sambrook (1989) com total de 12µg dos plasmídeos de interesse.

Para a obtenção dos extratos celulares realizou-se uma lise rápida. As placas de cultivo (após 10 horas da transfecção) foram lavadas com PBS gelado e as células recuperadas já no tampão de lise PBS (50mM Tris-HCL pH 7,4; 150mM NaCl; 1mM DTT; 1,5mM MgCl<sub>2</sub>; 4mM EDTA; 10% glicerol; 1% Triton X-100 acrescido inibidores de proteases e de fosfatases). Estas centrifugadas por 1 minuto a 4000xg e o sobrenadante foi então coletado e usado nos ensaios de *pulldown*.

### 3.3.2. Transfecção de células COS-7 com o Lipofectamina 2000 para ensaio de *pulldown* com GST-RhoA

Células COS-7 (5x10<sup>6</sup>) foram cultivadas em meio DMEM (Gibco) com 10% de SFB e 40mg/mL de antibiótico gentamicina em placas p60. Após 24 horas de seu repique as células foram transfectadas com o reagente Lipofectamina 2000 (Invitrogen) na condições de interesse com os plasmídeos pEGFP-Rnd1, pEGFP-STI1 e pEGFP-p190RhoGAP com a mesma massa total de DNA, seguindo protocolo indicado pelo fabricante.

### 3.3.3. *Pulldown* com GST-RBD e GST-RhoA G14V

Os ensaios de *pulldown* foram realizados de acordo com método descrito por Zanata e coladores (2002b), utilizando-se matriz de glutationa-sepharose (Amersham-Biosciences.). previamente equilibrada com tampão de ligação (250mM NaCl, 200mMTris-Hcl pH 7,5). Esta é então incubada com as proteínas recombinantes em volumes previamente padronizados, GST-RBD (90µL) ou GST-RhoA G14V (250µL) por 1h a 4°C. Em seguida, a matriz previamente equilibrada com os lisados bacterianos

contendo as proteínas é lavada com tampão de lavagem (50mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 1mM DTT, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 4mM EDTA, 10% glicerol, 1% Triton X-100, inibidores de protease) e então incubada com os extratos de células HEK293T transfectadas com os vetores de interesse por 2h a 4°C. As amostras são centrifugadas 2 minutos 1000xg e lavadas 2 vezes. Na segunda lavagem o tampão é totalmente retirado e adiciona-se tampão de amostra 2,5x redutor. Estas são fervidas por 10 minutos a 95°C e o sobrenadante é aplicado em SDS-PAGE 12% ou SDS-PAGE gradiente 8% a 12%. Em seguida, faz-se a transferência das amostras para membrana de nitrocelulose e reação de *Western blotting*. No *pulldown* com GST-RBD busca-se a detecção de RhoA ativa com anticorpo primário anti-RhoA (SantaCruz) (1:500), já no ensaio com GST-RhoA G14V a proteína de interesse é a pEGFP-p190RhoGAP e o anticorpo utilizado é anti-GFP (1:1000).

#### 3.3.4. *Pulldown* GST-RBD com estímulo de ácido lisofosfatídico

Visando facilitar a detecção de RhoA ativa, realizou-se também ensaio de *pulldown* em que as células foram tratadas com ácido lisofosfatídico como descrito por Kranenburg e colaboradores (1999). Para isto, células HEK 293T foram transfectadas pelo método de precipitação por fosfato de cálcio com os plasmídeos de interesse e anteriormente a obtenção do extrato celular, as células foram carenciadas por 16 horas com meio MEM sem SFB. Realizou-se então o estímulo com 1µM de LPA por 10 minutos. Em seguida prosseguiu-se para a obtenção do lisado celular como já descrito.

### 3.4. PRODUÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-Rnd1

#### 3.4.1. Imunização dos animais

As imunizações de dois grupos de quatro camundongos Balb/c foram feitas com base no descrito por Harlow e Lane (1998), com algumas adaptações, utilizando 12 µg das proteínas recombinantes previamente purificadas. Foram imunizados oito animais, sendo quatro com GST-Rnd1 e quatro com 6His-Rnd1

Após 7 dias da última imunização os animais foram sangrados via periorbital para coleta do soro para verificação da resposta imune. Os soros dos camundongos foram testados por reações de *Western blotting* contra extratos totais de células HEK transfectadas com o vetor HA-Rnd1, e aquele com melhor resposta passou para o procedimento de fusão para produção do anticorpo monoclonal.

#### 3.4.2. Fusão de células mielóides e esplenócitos de camundongos imunizados contra Rnd1

O animal mØ3, desafiado com GST-Rnd1, que apresentou boa resposta na imunização, verificada por *Western blotting*, foi imunizado mais uma última vez com 20µg de proteína purificada via intravenosa, 72h antes de ser sacrificado para a realização da fusão. O animal foi então anestesiado com quetamina (100mg/Kg), xilazina (20mg/Kg) e acepromazina (3mg/Kg) via intraperitoneal. Fez-se punção cardíaca, sacrifício com KCl e imersão do animal em álcool 70% para retirada cirúrgica do baço em fluxo laminar. Este foi macerado em meio RPMI sem soro, filtrado e centrifugado 600xg por 10 min. O pellet foi ressuscitado no meio residual, e em seguida os eritrócitos foram lisados em tampão de lise (150mM NH<sub>4</sub>Cl, 10mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,1mM EDTA, pH 7,2) por 5 minutos em banho de gelo. Adicionou-se 25mL de SFB e centrifugado novamente nas mesmas condições. Misturou-se célula de mieloma P3X63Ag8.653 (ATCC nº CRL-1580TM) e esplenócitos na razão de 1:5. Centrifugou-se 600xg por 10 minutos. Em seguida foi gotejado 1mL de PEG 50% (pré-aquecido 37°C) na mistura de células durante 1 minutos sob agitação constante. Gotejou-se então 1mL de SFB por 1 minutos nas mesmas condições por duas vezes. Por fim, 7mL de meio RPMI sem soro foram gotejados por 2 minutos também sob agitação e centrifugou-se 600xg por 5 minutos. O pellet foi então ressuscitado no volume de 10 placas em meio sem soro que é calculado de acordo com a seguinte equação (1):

$$(1) \quad n^{\circ} \text{ de placas } (P) = \frac{(n^{\circ} \text{ células mieloma} + \text{esplenócitos})}{(95 \times 5 \times 10^5)}$$

Foram plaqueados 100µL da suspensão de células em cada poço. Após 24h foram adicionados 100µL de meio RPMI HAT em cada poço. Este meio foi utilizado em mais duas trocas e então passou-se a usar meio RPMI HT por três trocas.

A presença ou ausência de anticorpos produzidos contra Rnd1 nos sobrenadantes da cultura foi avaliada pelos métodos de ELISA e *Western blotting*.

#### 3.4.3. Varredura dos hibridomas para detecção de anticorpos anti-Rnd1 pelo método de ELISA

A presença ou ausência de anticorpos produzidos contra antígeno recombinante nos sobrenadantes de cultura foi avaliada através de ensaio imunoenzimático ELISA. As placas para ELISA foram sensibilizadas com 100ng de proteína recombinante 6His-Rnd1 em 50µL de tampão carbonato por poço durante a noite a 4°C. Bloqueou-se as placas com 200µL por poço de PBS+BSA 1% por 1h a 37°C. Incubou-se 100µL dos sobrenadantes dos hibridomas selecionados por 2h a 37°C. Após esse tempo, a placa foi lavada 5 vezes de 2min com água destilada. Incubou-se 100µL de anticorpo secundário anti-mouse HRP GE® por 1h a 37°C. A placa foi lavada com água destilada novamente e revelou-se a reação com 100µL de TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina) Sigma® por poço durante 30min. A reação foi parada com 50µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M e fez-se leitura em filtro de 450nm.

A formação de células ocupando pelo menos metade de cada poço foi um critério para selecionar os clones que seriam submetidos ao ELISA. Outro o critério utilizado foi a coloração do meio. Aqueles poços que passaram de meio rosa para amarelado também foram submetidos a varredura. Desse modo, o sobrenadante de 59 poços foram submetidos ao ELISA.

#### 3.4.4. Varredura dos hibridomas para detecção de anticorpos anti-Rnd1 por *Western Blot*

Extrato de células 293t transfectadas com o plasmídeos GFP-Rnd1 foi submetido a SDS-PAGE 12%, em seguida as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e esta foi bloqueada com TBST leite 1%, para a realização de *Western*

*blotting*. Os sobrenadantes de 14 poços que ainda não haviam sido testados por ELISA foram utilizados.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES PARA ENSAIO DE *PULLDOWN*

As expressões das proteínas recombinantes GST-RhoA G14V (constitutivamente ativa), GST-RBD e GST foram padronizadas a partir de expressões em pequena escala como descrito na metodologia (tabela 1).

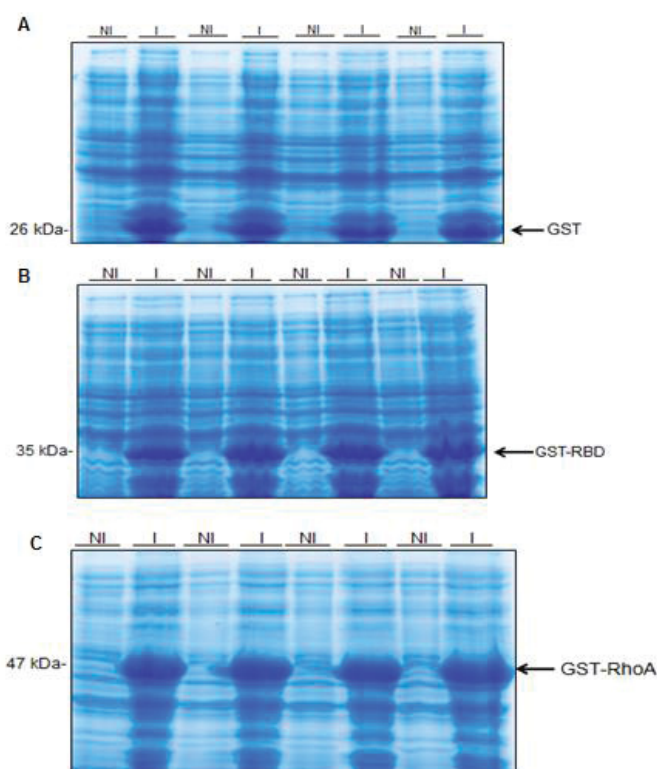


FIGURA 3 - EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES GST (A), GST-RhoA G14V (B) E GST-RBD (C) EM PEQUENA ESCALA. Após indução (I) da expressão das proteínas recombinantes conforme descrito na tabela 1, realizou-se SDS-PAGE para verificar a expressão das proteínas de interesse a partir da comparação com culturas bacterianas não incubadas com IPTG, controles não-induzidos - NI). É possível observar que as três proteínas recombinantes

foram expressas corretamente, e qualquer colônia poderia ser utilizada para a expressão em larga escala.

FONTE: A autora (2017).

Visto que a expressão das proteínas em pequena escala foi bem sucedida, partiu-se então para a expressão destas em larga escala. Em SDS-PAGE corado com azul de Coomassie é possível verificar que as proteínas de interesse foram adequadamente expressas (Figura 4).

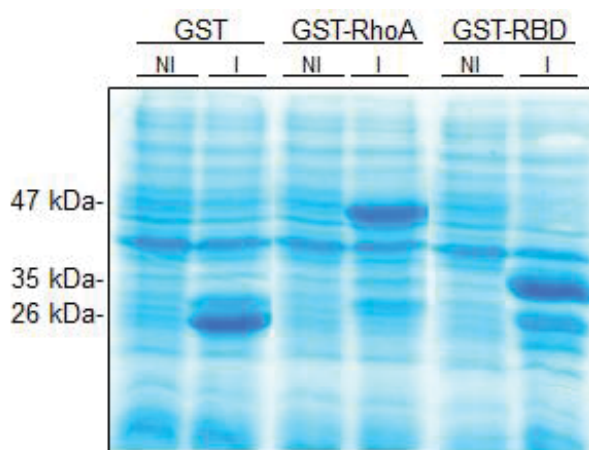


FIGURA 4 - EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS GST, GST-RhoA E GST-RBD EM LARGA ESCALA. Após expressão em larga escala seguindo os mesmos parâmetros da expressão em pequena escala, realizou-se SDS-PAGE para confirmar a expressão das proteínas de interesse a partir da comparação com as culturas bacterianas não induzidas (não incubadas com IPTG – NI). Dessa forma, é possível observar que as proteínas de interesse foram adequadamente expressas em larga escala.

FONTE: A autora (2017).

#### 4.2. ANÁLISE DO PAPEL DE STI1 NA ATIVIDADE DE p190RhoGAP ATRAVÉS DE ENSAIO DE *PULLDOWN* COM GST-RhoA G14V

O ensaio de *pulldown* com a forma constitutivamente ativa de Rho (RhoA G14V) teve como objetivo capturar p190RhoGAP funcionalmente ativa e avaliar a possível participação da proteína GFP-STI1 em sua regulação. No primeiro ensaio com células HEK 293T transfectadas nas condições de interesse, a reação de *Western blotting* com anticorpo anti-GFP (Figura 5) não evidenciou a presença de p190RhoGAP. De acordo

com Oinuma e colaboradores (2012) a presença da GTPase Rnd1 deveria ativar p190RhoGAP, aumentando sua ligação com a recombinante GST-RhoA G14V (OINUMA *et al.*, 2012), ou seja, deveria ter sido detectada uma maior quantidade de p190RhoGAP na linha 2 quando comparada a linha 3. Ainda, a quantidade de p190RhoGAP que deveria ser observada na linha 1 deveria ser similar a da linha 3, mas certamente menor que da linha 2, caso nossa hipótese estivesse correta. Entretanto não foi possível detectar a presença de p190RhoGAP em nenhuma das condições experimentais avaliadas. O *pulldown* com a proteína GST foi utilizado como controle negativo.

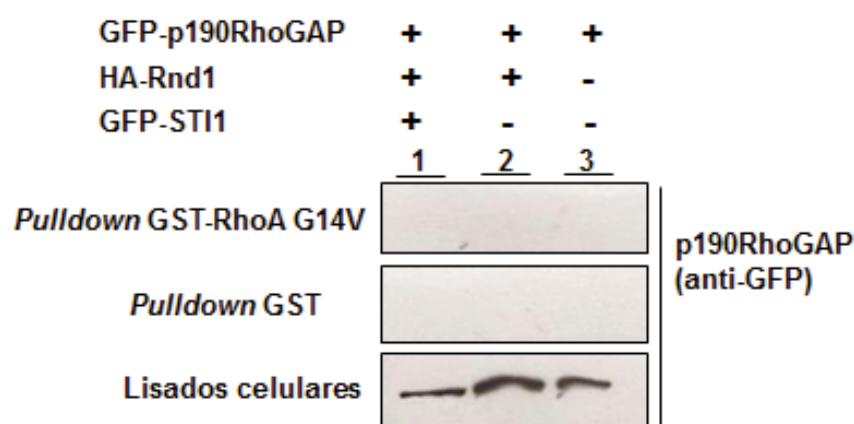


FIGURA 5 - ENSAIO DE PULLDOWN PARA AVALIAÇÃO DO PAPEL DE STI1 SOBRE A ATIVIDADE DA p190RhoGAP. Extratos de células HEK 293T foram transfectados com os vetores indicados na figura e submetidos a pulldown com a recombinante constitutivamente ativa GST-RhoA G14V para detectar atividade da p190RhoGAP. A reação de Western blotting com o anti-GFP (1:1000) evidenciou a expressão da proteína p190RhoGAP nos lisados celulares, entretanto nenhuma p190RhoGAP foi detectada nas condições experimentais deste ensaio. FONTE: A autora (2017).

Como não foi possível verificar a atividade de p190RhoGAP em células HEK 293T, optou-se então por utilizar a linhagem COS-7, a qual também foi utilizada em abordagem experimental semelhante (OINUMA *et al.*, 2012). Assim, estas células foram transfectadas utilizando lipofectamina nas mesmas condições, substituindo apenas o pCDNA3/HA-Rnd1 pelo pEGFP-Rnd1 devido a sua maior eficiência de expressão, e submetidas a *pulldown*.

Na figura 6A pode ser observado que GFP-STI1 inativa GFP-p190RhoGAP, uma vez que menor quantidade desta interage com GST-RhoA G14V (comparar linha 3 com linhas 2 e 1), sugerindo que STI1 pode interferir na sinalização mediada por esta proteína ativadora de GTPases. O rendimento dos extratos celulares totais obtidos foi baixo, provavelmente pela toxicidade do reagente de transfecção, motivo pelo qual não houve massa suficiente para realizar convenientemente o controle de carregamento total de proteína neste ensaio (painel inferior da Fig. 6A).

Ainda, não há diferença entre a quantidade de p190RhoGAP imobilizada nas condições de presença e ausência de Rnd1 (comparar linha 1 e 2), resultado este que contraria dados anteriormente publicados (Wennerberg et al, 2003). Uma vez que a interação direta entre p190RhoGAP e STI1 não foi ainda demonstrada, acreditamos que a diminuição da atividade de p190RhoGAP ocorra de forma indireta através de Rnd1, dando assim subsídios para a sustentação da hipótese deste trabalho. No gel com coloração de Coomassie (figura 6B) é possível verificar que a massa de GST-RhoA G14V foi a mesma para cada uma das três condições de *pulldown*, demonstrando que o enriquecimento de p190RhoGAP (Fig. 6A) é reflexo da presença da forma ativa nos extratos e não artefato experimental provocado por diferentes massas de GST-RhoA G14V imobilizadas na matriz cromatográfica.

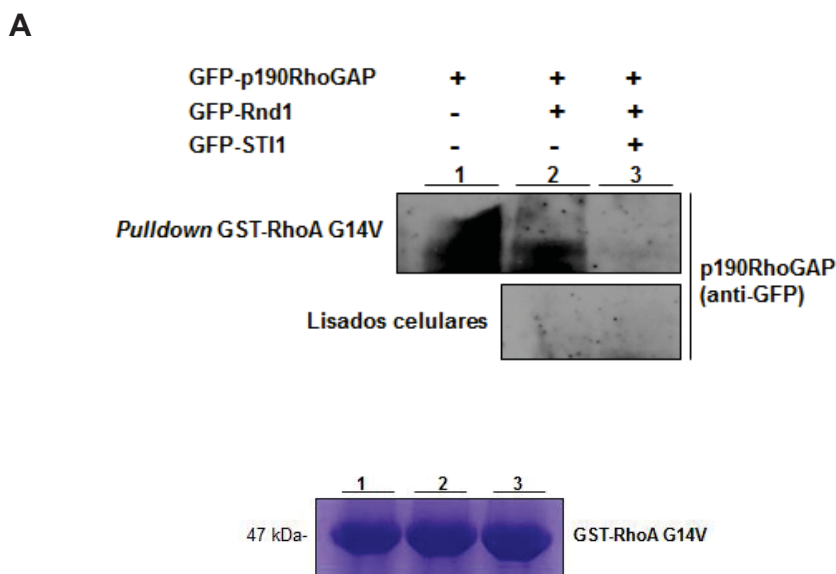


FIGURA 6 – ANÁLISE DO PAPEL DA PROTEÍNA STI1 NA ATIVIDADE DE p190RhoGAP EM CÉLULAS COS-7 ATRAVÉS DE ENSAIO DE PULLDOWN. Extratos de células COS-7 transfectadas com os vetores de interesse foram submetidos a pull-down com a recombinante ativa GST-RhoA G14V para detectar a atividade de p190RhoGAP. Assim, foi possível verificar que a proteína STI1, ao inativar Rnd1, diminui também a atividade de p190RhoGAP (A). Já o SDS-PAGE com coloração de Coomassie mostra que a mesma massa de recombinante foi utilizadas nas três condições de pull-down (B).  
 FONTE: A autora (2017).

#### 4.3. ANÁLISE DO PAPEL DA PROTEÍNA STI1 NA ATIVIDADE DE RhoA ATRAVÉS DE ENSAIO DE PULLDOWN

##### 4.3.1. Padronização dos ensaios

Antes de realizar os ensaios de pull-down com GST-RBD foi feita uma reação de WB com extrato de células HEK 293T não transfectadas para determinar se é possível detectar a expressão endógena de RhoA sem a necessidade de superexpressá-la, como previamente descrito na literatura para a linhagem COS-7 (OINUMA et al. 2012). Desse modo, como visto na figura 7 é possível detectar diretamente a expressão endógena desta GTPase com anticorpo anti-RhoA.

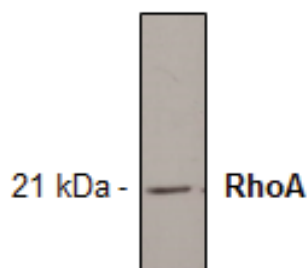


FIGURA 7– EXPRESSÃO DE RhoA EM CÉLULAS HEK 293T. Reação de WB com membrana de nitrocelulose com 40 µg extrato de células HEK 293T não transfectadas. Foi utilizado anti-RhoA na diluição 1:200 como anticorpo primário e anti-camundongo (1:4000) como secundário. FONTE: A autora (2017).

Em ensaios de *pull-down*, ainda que a proteína recombinante GST-RBD interaja com menor afinidade a Rho-GDP do que Rho-GTP (REN *et al.* 1999), caso se empregue uma quantidade excessiva de GST-RBD imobilizada na matriz glutationa-sepharose poderá ocorrer uma significativa ligação de RhoA inativa. Neste caso, a quantidade de RhoA ativa no sistema *in vitro* poderia ser superestimada. Desse modo, foi estabelecido o uso de 15µg da proteína de interesse imobilizada à matriz cromatográfica (OINUMA *et al.* 2003). Sendo assim, para padronização do volume de lisado bacteriano contendo a proteína recombinante GST-RBD a ser utilizada nos ensaios de *pull-down*, realizou-se uma curva com massas conhecidas de BSA (figura 8). Assim, foi possível estimar qual o volume de extrato bacteriano bruto conterá a massa ideal para este tipo de ensaio, nas condições de expressão descritas.

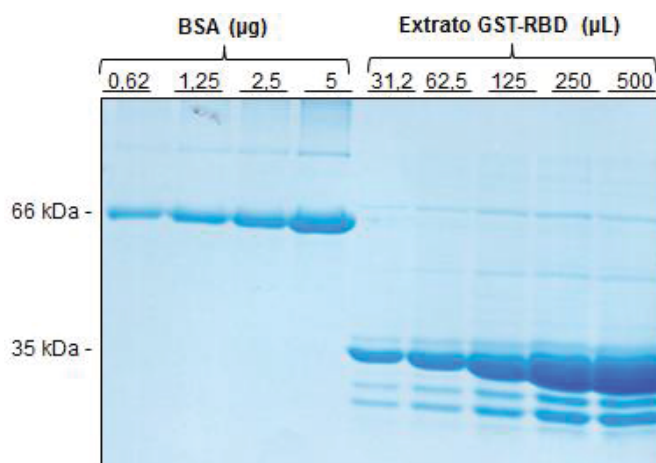


FIGURA 8 - ESTIMATIVA DA MASSA DE GST-RBD EM VOLUME DE EXTRATO TOTAL BACTERIANO A PARTIR DA COMPARAÇÃO COM DIFERENTES MASSAS CONHECIDAS DE BSA. Para estabelecer o volume necessário de lisado de bactéria contendo a proteína recombinante GST-RBD para os ensaios de pull-down tomou-se separadamente diferentes volumes daquele, incubou-se com a mesma quantidade de matriz glutationa-sepharose, e as proteínas imobilizadas foram resolvidas por SDS-PAGE e comparadas com as massas conhecidas de BSA. Verificou-se assim que o volume ideal de lisado para se obter 15µg da proteína de interesse seria, neste experimento representativo, de aproximadamente 125µL. FONTE: A autora (2017).

Além disso, realizou-se outro experimento utilizando diferentes volumes do lisado bacteriano contendo a proteína recombinante GST-RBD para pull-down com extrato de célula transfectadas ou não com os vetores pCDNA3/HA-Rnd1 e pEGFP-p190RhoGAP. Os volumes de lisado bacteriano expressando a proteína recombinante GST-RBD incubados com a resina de glutationa-sepharose foram 45, 90 e 180µL. Desse modo, após a reação de WB (Figura 9) com anticorpo anti-RhoA, verificou-se que o volume mais adequado para os ensaios de pull-down, de modo que não houvesse ligações inespecíficas, foi de 90µL para este lote de extrato bacteriano preparado.

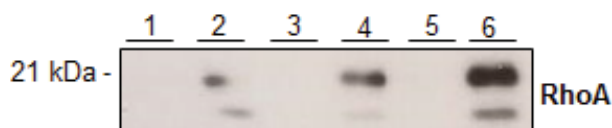


FIGURA 9 – PADRONIZAÇÃO DO VOLUME ADEQUADO DE LISADO BACTERIANO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE GST-RBD PARA ENSAIO DE PULLDOWN. Para padronizar o volume de lisado bacteriano contendo GST-RBD, realizou-se pulldown com diferentes volumes ligados a resina glutationa-sepharose, (linhas 1 e 2 - 45µL, 3 e 4 - 90µL, 4 e 5 - 180µL). Foram utilizados 50µg de extrato de células HEK 293T não transfectadas (1,3,5) e de células transfectadas com os vetores HA-Rnd1 e GFP-p190RhoGAP (2,4,6).A reação de WB foi realizada com anticorpo primário anti-RhoA (1:500) e anticorpo secundário anti-camundongo (1:4000).

FONTE: A autora (2017).

Outro parâmetro avaliado para os ensaios de *pulldown* GST-RBD foi o tempo de transfecção das células HEK293T, visto que foi optado pela detecção da RhoA endógena e dados da literatura sugerem que apenas 0,5 a 1% desta permanece ativa perante um estímulo bioquímico (REN et al., 1999) buscou-se detectá-la em seu pico de atividade. Para tal, inicialmente foram realizadas transfecções com o vetor pCDNA3/HA-Rnd1, e os extratos foram obtidos após 12 e 24 horas. Em seguida, realizou-se *pulldown* com estas amostras (Figura 10 A). Para controle negativo, extratos de células HEK 293T não transfectadas foram utilizados. Desse modo, foi possível verificar uma maior expressão de RhoA ativa no extrato obtido com 12 horas de transfecção, havendo um declínio de sua atividade com 24 horas. Em seguida, Para confirmar se o melhor tempo para detecção de RhoA-GTP é após 12 horas de transfecção, realizou mais um ensaio de *pulldown*, desta vez com extratos obtidos com tempos menores, sendo eles: 8, 10 e novamente 12 horas. Neste foi possível observar que após 10 horas se dá a maior detecção de RhoA ativa (Figura 10B), e desse modo este tempo passou a ser padrão para os ensaios.

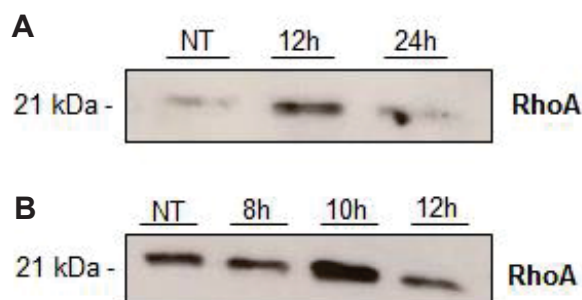


FIGURA 10 – PADRONIZAÇÃO DO TEMPO DE TRANSFECCÃO DE HA-Rnd1 PARA MELHOR DETECÇÃO DE RhoA ATIVA. Para determinar o melhor tempo de detecção de RhoA ativa foi realizado pulldown de células HEK 293T transfectadas com vetor HÁ-Rnd1 e os extratos obtidos após 12 e 24 horas (A). Em seguida foram testados também os tempos 8, 10 e 12 horas na mesma condição de transfecção (B). Como controle células não transfectadas (NT) também foram utilizadas. Na reação de WB constatou-se que o extrato com maior quantidade de RhoA ativa foi o obtido após 10 horas de transfecção. O anticorpo primário utilizado nesta reação foi anti-RhoA (1:500) e anti-camundongo (1:4000) como secundário. FONTE: A autora (2017).

#### 4.3.2. *Pulldown* GST-RBD

Desse modo, após estas padronizações, foi possível realizar a captura da GTPase RhoA ativa visando reproduzir dados da literatura. Todavia, os resultados obtidos não foram os esperados, como descritos Oinuma e colaboradores (2003), visto que atividade de RhoA não pareceu ser maior na presença de Rnd1  $\Delta$ N (mutada) do que na presença de Rnd1 WT (selvagem) (figura 11).

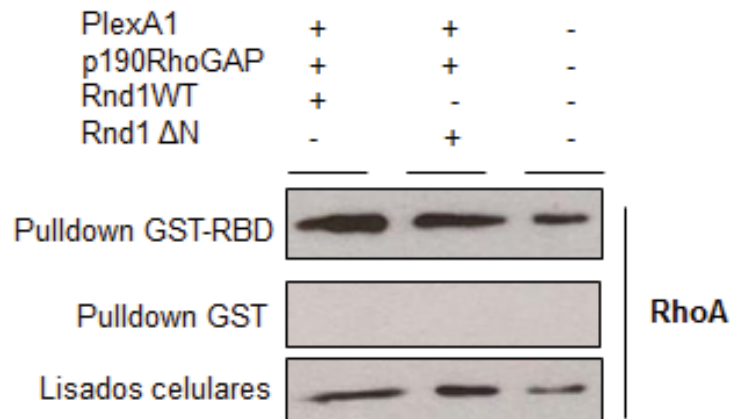


FIGURA 11 – ANÁLISE DA ATIVIDADE DE RhoA NA PRESENÇA DA GTPase Rnd1 SELVAGEM. Células HEK 293T foram transfectadas nas condições especificadas na figura. Os lisados celulares foram submetidos ao ensaio de pull-down para detecção da atividade da proteína RhoA. Como controle negativo do ensaio foi feito pull-down somente com a proteína recombinante GST. A reação de Western blot foi feita com o anticorpo anti-RhoA (1:500). O anticorpo secundário anti-camundongo foi utilizado na concentração 1:4000. FONTE: A autora (2017).

Visto que o resultado obtido foi diferente do esperado e levando em consideração que talvez a quantidade de RhoA ativa disponível nas células HEK 293T seja muito pequena para detectá-la adequadamente, ainda que em condições favoráveis, buscou-se estimular sua atividade através de tratamento com 20mM de ácido lisofosfatídico (LPA) como descrito por Kranenburg e colaboradores (1999). Visando então determinar o tempo de exposição das células ao LPA que poderia levar a maior detecção da proteína alvo, realizou-se pull-down com extratos de células tratadas por 0, 1, 3, 10 e 30 minutos. Desse modo, determinou-se que o tratamento por 10 minutos é o que mais favorece a detecção de RhoA ativa (Figura 12).

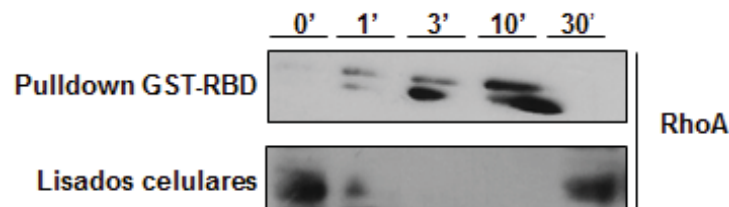


FIGURA 12 – PADRONIZAÇÃO DO TEMPO IDEAL DE TRATAMENTO DAS CÉLULAS HEK 293T COM LPA PARA DETECÇÃO DE RhoA ATIVA. Células HEK 293T foram submetidas a tratamento com ácido lisofosfatídico (LPA) por diferentes tempos (0, 1, 3, 10 e 30 minutos). Em seguida seus extratos foram submetidos a ensaio de pull-down para detecção de RhoA ativa.

Para a reação de WB foram utilizados os anticorpos anti-RhoA e anti-camundongo nas diluições já citadas. Verificou-se então que a maior atividade de RhoA foi detectada nas células tratadas por 10 minutos.

FONTE: A autora (2017).

Ao determinar que ao tratar as células por 10 minutos com LPA a detecção da atividade de RhoA era maior, utilizou-se disto para realizar um novo ensaio de pulldown sob as condições de interesse, em que os plasmídeos pEGFP-p190RhoGAP, pEGFP-Rnd1 e pEGFP-STI1 foram transfectados. O resultado porém também foi diferente do esperado (figura 13A) pois apesar de ter sido possível detectar o antagonismo de Rnd1 frente a atividade de RhoA (linha 2), a presença da proteína STI1 não reverteu esta condição, como visto na linha 3, em que a detecção de RhoA ativa deveria ser semelhante àquela detectada na linha 1.

Em SDS-PAGE com coloração de Coomassie (figura 13B) constatou-se que a massa de extrato bacteriano da recombinante GST-RBD utilizada no ensaio foi aproximadamente a mesma para as três condições, descartando assim a possibilidade de o resultado obtido ter sido causado por diferenças de carregamento na matriz cromatográfica.

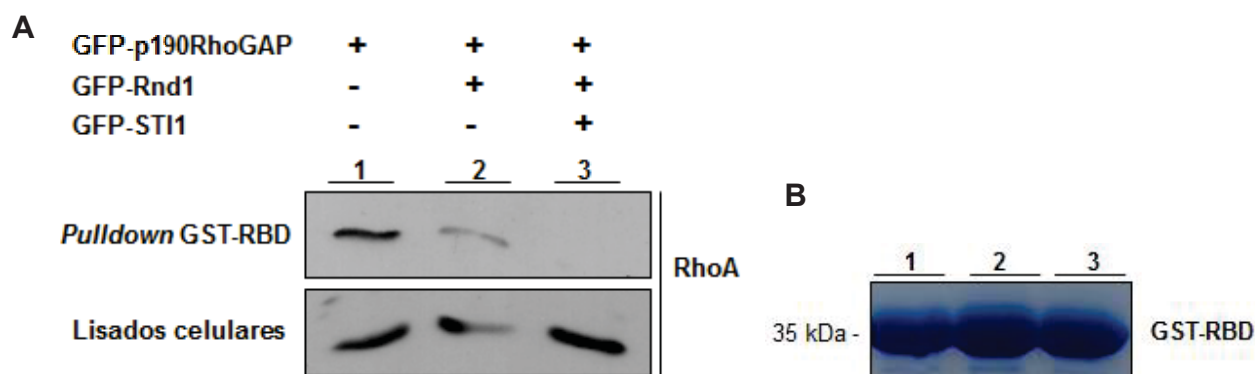


FIGURA 13 – ANÁLISE DO PAPEL DA PROTEÍNA STI1 NA ATIVIDADE DE RhoA EM CÉLULAS HEK293T ATRAVÉS DE ENSAIO DE PULLDOWN. Células HEK 293T foram transfectadas nas três condições especificadas na figura. Após 48 horas de transfecção as células foram tratadas por 10 minutos com LPA, lisadas e submetidas a pulldown. Ao contrário do esperado, não foi possível detectar maior atividade de RhoA na presença de STI1 quando comparada a sua ausência (A). SDS-PAGE com coloração de Coomassie mostra que a mesma

massa de lisado bacteriano da recombinante GST-RBD foi utilizada para as três condições do pulldown (B).

FONTE: A autora (2017).

#### 4.4. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE GST-Rnd1 PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL

Para a produção de anticorpos monoclonais anti-Rnd1, foi realizada a expressão em larga escala e subsequente purificação do antígeno recombinante GST-Rnd1. Após padronização das condições em expressões em pequena escala (Figura 14) o antígeno foi purificado por cromatografia de afinidade com coluna de glutationa-sepharose. Na coloração do gel de policrilamida com azul de Coomassie (Figura 15), é possível observar que apesar de grande quantidade da proteína permanecer no sedimento que corresponde a fração insolúvel da proteína (Figura 16, linha P), é possível obtê-la em quantidades satisfatórias e na forma solúvel já nas primeiras frações eluídas após as lavagens (linhas E1-E5).

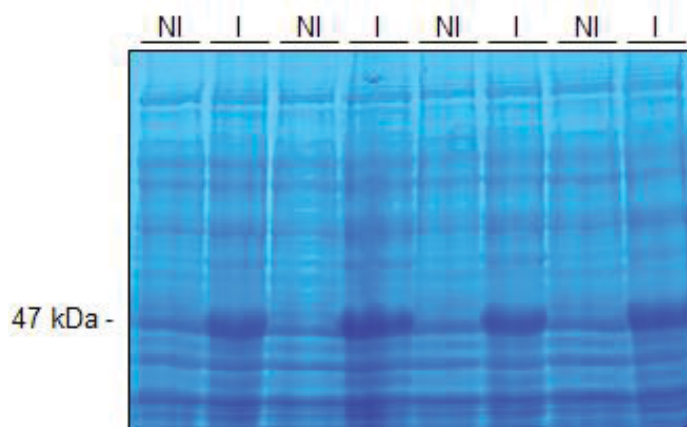


FIGURA 14 - MINI-EXPRESSÃO DO ANTÍGENO RECOMBINANTE GST-Rnd1. Após indução (I) da expressão da proteína recombinante conforme descrito na tabela 2, realizou-se SDS-PAGE para verificar a expressão das proteínas de interesse a partir da comparação com culturas bacterianas não incubadas com IPTG (culturas não-induzidas - NI).

FONTE: A autora (2017).



FIGURA 15 - PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE GST-Rnd1 COM RESINA DE GLUTATIONA-SEPHAROSE. Gel de poliacrilamida 12% mostrando as etapas da purificação de GST-Rnd1. A GST-Rnd1 foi convenientemente eluída na fração E1, apesar de grande parte permanecer no sedimento (linha P). FNL– Fração não ligada, L1– lavagem um, L2- lavagem dois, E1 – eluato um, E2- eluato dois, E3- eluato três, E4- eluato quatro, E5- eluato cinco, P- sedimento contendo a fração insolúvel da proteína.

FONTE: A autora (2017).

#### 4.5. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE 6His-Rnd1 PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL

Em paralelo a imunização dos animais com a recombinante GST-Rnd1, realizou-se também a expressão e purificação de 6His-Rnd1. A partir da padronização das condições para a expressão em pequena escala (Figura 16) foi feita a purificação em larga escala da proteína 6His-Rnd1. As diversas etapas do processo de purificação estão mostradas no SDS-PAGE corado com azul de Coomassie (Figura 17).

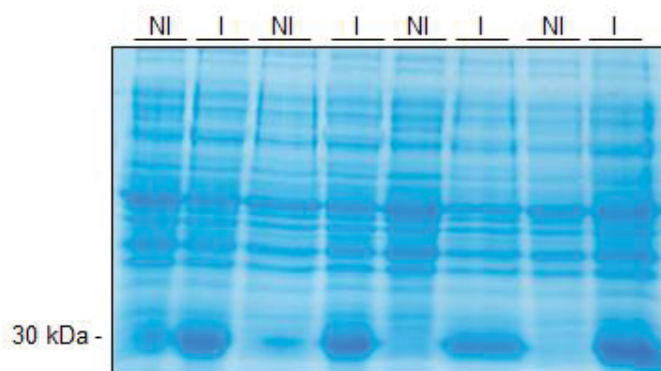


FIGURA 16 - MINI-EXPRESSÃO DA RECOMBINANTE 6His-Rnd1. Após indução (I) da expressão da proteína recombinante conforme descrito na tabela 2, realizou-se SDS-PAGE para verificar a expressão da proteína de interesse a partir da comparação com culturas bacterianas não incubadas com IPTG, ou seja, controles não-induzidos - NI).

FONTE: A autora (2017).

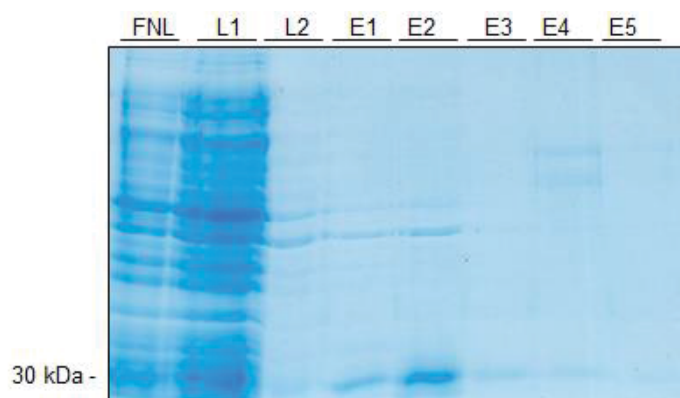


FIGURA 17 - PURIFICAÇÃO DA RECOMBINANTE 6His-Rnd1 COM COLUNA DE NÍQUEL. Gel poliacrilamida 12% mostrando as etapas da purificação da recombinante 6His-Rnd1. A proteína foi majoritariamente eluída na fração E2, apesar de ainda apresentar proteínas contaminantes com massa molecular superior a Rnd1. FNL– Fração não ligada, L1– lavagem um, L2- lavagem dois, E1 – eluato um, E2- eluato dois, E3- eluato três, E4- eluato quatro, E5- eluato cinco.

FONTE: A autora (2017).

#### 4.6. TESTE DE SORO POLICLONAL GST-Rnd1

Após a terceira imunização com GST-Rnd1 foi coletado soro dos animais para testar sua eficiência. Para tal realizou-se ensaio de *Western Blot* com 1µg da proteína

recombinante GST-Rnd1 como controle positivo e 40µg de extrato de células HEK 293T transfectadas com o plasmídeo pcDNA3/HA-Rnd1 em gel de poliácridamida 12%. Desse modo, para detectar a presença ou não de anticorpos anti-Rnd1 no soro dos animais utilizou-se as seguintes diluições: 1:250, 1:500 e 1:1000 (Figura 18).

No teste do soro do animal 01 (figura 19A), as bandas correspondentes a altura da GTPase Rnd1 (30kDa) apareceram de forma muito branda em todas as diluições. A transfecção foi confirmada utilizando anti-HA (coluna c(t) – figura 18A).

Já na reação com o soro do animal 02 não foi possível detectar sua interação com a proteína em nenhuma diluição, indicando a ausência de anticorpos anti-Rnd1, apesar da presença de banda no controle positivo (figura 18B).

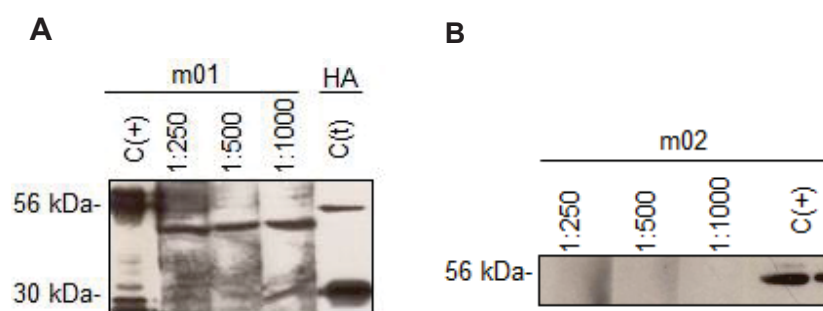


FIGURA 18 - REAÇÃO DE WESTERN BLOT PARA TESTE DE SORO POLICLONAL ANTI-Rnd1 DOS ANIMAIS 01 E 02. Extrato de células HEK 293 transfectadas com plasmídeo pcDNA3/HA-Rnd1 foram imobilizadas em membrana de nitrocelulose após SDS-PAGE. Nas colunas do controle positivo com a recombinante o soro foi utilizado na diluição 1:4000. Já nas colunas com os extratos foi realizada 3 diluições (1:250, 1:500 e 1:1000). O anticorpo secundário utilizado em ambas as reações foi anti-camundongo-HRP (1:2000). FONTE: A autora (2017).

Desse mesmo modo, realizou-se o teste da eficiência da imunização dos animais m03 e m04, utilizando ensaio de Western Blot e diferindo apenas nas diluições testadas do soro, visto que os primeiros animais não apresentaram boa resposta. Sendo assim, os soros foram testados somente nas concentrações 1:250 e 1:500 (figura 19), de modo que o animal m03 apresentou melhor resposta.

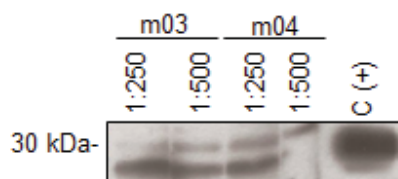


FIGURA 19 - REAÇÃO DE WESTERN BLOT PARA TESTE DE SORO POLICLONAL ANTI-Rnd1 DOS ANIMAIS 03 E 04. Extrato de células HEK 293T expressando HA-Rnd1 foi resolvido por SDS-PAGE e as proteínas transferidas para membrana de nitrocelulose. Foram realizadas 2 diluições dos soros (1:250, 1:500). Para controle da transfecção foi utilizado anticorpo anti-HA na diluição 1:1000. O anticorpo secundário anti-camundongo foi utilizado na concentração 1:4000 e o anti-coelho 1:5000.

FONTE: A autora (2017).

Após a verificação de que o animal m03 apresentou melhor resposta imune contra o antígeno de interesse, realizou-se então mais dois ensaios visando a confirmação da presença de anticorpos anti-Rnd1 no soro deste animal. Primeiramente, através de ensaio de *Western Blotting*, com 40µg de células HEK 293T expressando ou não as proteínas GFP, GFP-Rnd1 e HA-Rnd1, foi possível confirmar que o soro apresentava-se reativo quanto a presença de anticorpos anti-Rnd1(figura 20) tornando o animal apto para o procedimento de fusão.

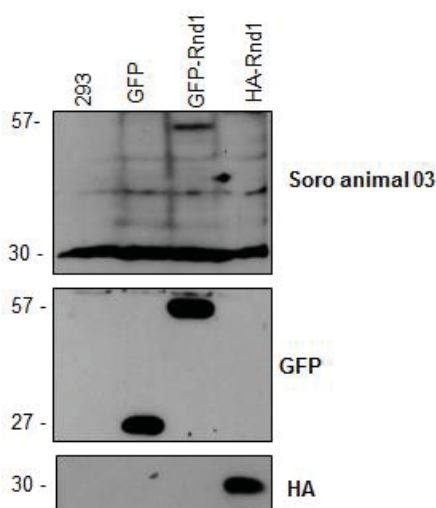
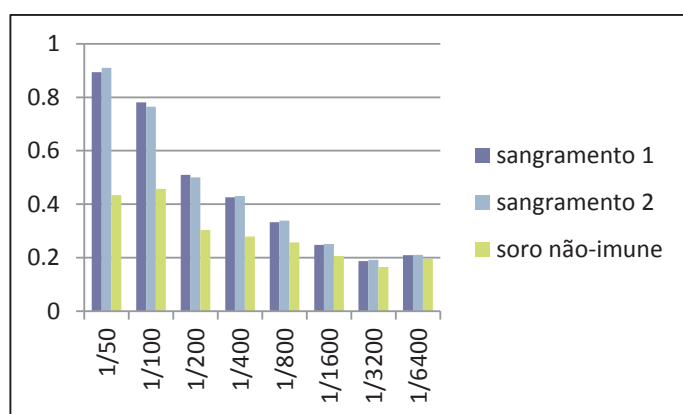


FIGURA 20 - CONFIRMAÇÃO DA PRESENÇA DE ANTICORPOS ANTI-Rnd1 NO SORO DO ANIMAL 03 EM REAÇÃO DE WESTERN BLOTING. Em membrana de nitrocelulose com extrato de células 293T transfectadas com os plasmídeos pCDNA3/HA-Rnd1, pEGFP-Rnd1,

pEGFP e células não transfectadas, o soro do animal 03 foi novamente testado na diluição 1:350. Como controle da transfecção utilizaram-se anticorpos anti-HA (1:1000) e anti-GFP (1:1000). O anticorpo secundário anti-camundongo foi utilizado na diluição 1:4000 e o anti-coelho em 1:5000.

FONTE: A autora (2017).

Concomitante a retirada do baço do animal m03 para a coleta das células que seriam fusionadas para a produção dos hibridomas secretores de anticorpos monoclonais, foi obtido soro hiper-imune a partir do sangue total do mesmo animal. Este soro hiper-imune foi testado para a presença de anticorpos anti-Rnd1 pelo método de ELISA (HARLOW & LANE, 1998). No gráfico 1 é apresentado o resultado do teste do soro coletado logo após a última imunização (sangramento 1) e o soro hiper-imune (sangramento 2). Como controle negativo, utilizou-se soro de animal não desafiado experimentalmente com antígenos recombinantes (soro não-imune). Desse modo, foi possível perceber que o soro do animal apresentava-se reativo para a presença de anticorpos anti-Rnd1 e que diluição limite aproximada para a detecção específica de 6His-Rnd1 neste tipo de ensaio era 1/1600 em comparação ao soro não-imune.



**GRÁFICO 1 - COMPARAÇÃO ENTRE SORO DO ANIMAL 03 OBTIDO EM DUAS OCASIÕES E SORO NÃO-IMUNE QUANTO A PRESENÇA DE ANTICORPOS ANTI-Rnd1.** Pelo método de ELISA realizou-se uma comparação quanto a presença de anticorpos no soro policlonal do animal 03 obtido logo depois da última imunização, do sangramento realizado no dia da fusão e de um soro não imune. Foram feitas oito diluições, sendo que nas menores os soros do animal imunizado apresentaram títulos bem maiores em relação ao soro não-imune.  
 FONTE: A autora (2017).

Sendo assim, ficou comprovado que o animal escolhido estava apto para fornecer células adequadas á produção de hibridomas secretores de anticorpos monoclonais reativos para Rnd1.

#### 4.8. TESTE DE SORO POLICLONAL ANTI-6His-Rnd

Os soros obtidos dos animais imunizados com a proteína recombinante 6His-Rnd1 também foram testados por Western Blot em membrana de nitrocelulose com extrato de células HEK 293T transfectadas com o plasmídeo pCDNA3/HA-Rnd1 (figura 21). Os soros dos quatro animais foram testados em 3 diluições (1:250, 1:500, 1:1000), porém nenhum destes apresentou anticorpos reativos para HA-Rnd1.

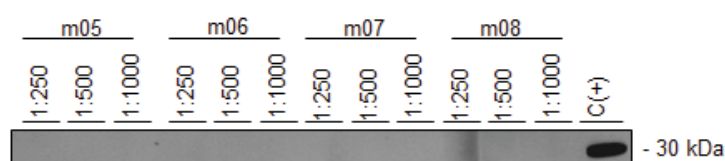


FIGURA 21 – REAÇÃO DE WESTERN BLOT PARA TESTE DE SORO POLICLONAL ANTI-Rnd1 DOS ANIMAIS 05 A 08. Reação de Western Blotting em membrana de nitrocelulose com extrato de células HEK 293T transfectadas com plasmídeo pCDNA3/HA-Rnd1. Foram realizadas 3 diluições dos soros (1:250, 1:500 e 1:1000). Para controle da transfecção foi utilizado anticorpo anti-HA na diluição 1:1000. O anticorpo secundário anti-camundongo foi utilizado na concentração 1:4000 e o anti-coelho 1:5000.

FONTE: A autora (2017).

#### 4.9. VARREDURA DOS HIBRIDOMAS

Após a realização da fusão das células do animal 03, foram testados os sobrenadantes dos poços de cultura celular, a partir dos critérios já citados, quanto a presença de anticorpos anti-Rnd1. Esta varredura foi realizada primeiramente por

ELISA, em que a maioria dos sobrenadantes apresentaram valores de absorvância próximos ao dos controles negativos (soro não-imune e meio de cultura completo - dados não mostrados). Entretanto, alguns poços tinham sobrenadantes que apresentaram valores de absorvância ligeiramente (0,5 a 1 vez) superiores ao do controle negativo. Estes sobrenadantes foram testado novamente por reação de Western Blot (figura 22). Sendo assim, dos 192 poços de fusão, 72 foram testados, porém todos apresentaram-se negativos (tabela 3).

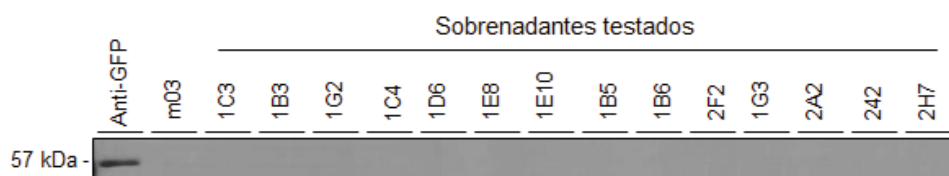


FIGURA 22 - VARREDURA DOS HIBRIDOMAS POR WB Após a realização de ELISA, os sobrenadantes dos poços que apresentaram valores de absorvância superiores a 50% do valor do controle negativo foram testados novamente para a presença de anti-Rnd1 por reação de WB. Todos os hibridomas mostraram-se consistentemente negativos para a secreção de anticorpos anti-Rnd1.

FONTE: A autora (2017).

Assim, dos 192 poços de fusão, 69 foram testados, porém todos apresentaram-se negativos (tabela 3) quanto a presença de anticorpos monoclonais anti-Rnd1.

	nº de poços testados	nº de poços positivos
ELISA	58	0
Western Blot	14	0

TABELA 3 - VARREDURA DOS HIBRIDOMAS.

FONTE: A autora (2017).

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. STI1 E A ATIVIDADE DE p190RhoGAP

Para avaliar a regulação da proteína STI1 sob a atividade de p190RhoGAP, realizou-se ensaio de *pulldown* com a recombinante constitutivamente ativa GST-RhoA G14V. Isto porque de acordo com Oinuma e colaboradores (2012) a ativação funcional dessa GAP pode ser mensurada pelo aumento da sua capacidade de se associar ao seu substrato, a RhoA ativa. Assim, células HEK293T foram transfectadas pelo método de precipitação de cálcio nas condições de interesse e submetidas ao ensaio. Porém, não foi possível detectar p190RhoGAP ativa em nenhuma das condições mesmo com sua superexpressão (figura 6). Isto pode ter sido causado pela dificuldade da transfecção de um plasmídeo tão grande como o de p190RhoGAP prejudicando assim sua detecção na forma ativa.

Em vista disso, uma nova linhagem celular foi utilizada, a de células COS-7. Estas foram transfectadas com lipofectamina nas mesmas condições do primeiro ensaio, e apesar de ter ocorrido perda de células, provavelmente devido a toxicidade deste reagente, foi possível realizar o *pulldown*. Assim como esperado, observamos na figura 7 que a proteína STI1 participa da regulação da atividade de p190RhoGAP inativando-a através de sua ligação com Rnd1, não sendo mais possível a sua detecção (linha 3 – figura 7). Por outro lado, na condição de superexpressão apenas de Rnd1 e p190RhoGAP (linha 2 – figura 7), sua atividade mostra-se similar a condição em que somente a proteína alvo é superexpressa (linha 1 – figura 7).

Os resultados previamente obtidos pelo grupo mostram que STI1 liga-se de forma específica a Rnd1, e que esta interação leva ao bloqueio do colapso do citoesqueleto mediado por esta GTPase em células COS-7 (DE SOUZA et al., 2014). Já no trabalho publicado pelo grupo do Dr. Neguishi, foi mostrado que Rnd1 quando ativa, aumenta também a atividade de p190RhoGAP ao recrutá-la para se localizar nos *lipid rafts* levando também a inativação de RhoA (OINUMA et al., 2012). Assim, os resultados desta dissertação vêm a corroborar com os dados da literatura, mostrando que a atividade de p190RhoGAP é também regulada pela proteína STI1, devido a sua interação com Rnd1. Porém, os mecanismos dessa regulação ainda precisam ser

elucidados, e nosso grupo propõe dois: (1) STI1 ao interagir e inativar Rnd1, impediria que esta se ligue a p190RhoGAP, de modo a torna-la também inativa, ou (2) STI1 ao interagir com Rnd1 estaria ocupando o mesmo sítio de ligação que seria usado para a interação com p190RhoGAP, de modo a não permitir sua ativação.

## 5.2. STI1 E A ATIVIDADE DE RhoA

Para avaliar o papel da proteína STI1 na atividade de RhoA, realizou-se *pull-down* tendo como isca a recombinante GST-RBD. Esta proteína efetora, também conhecida como *Rhotekin binding domain*, liga-se especificamente a RhoA ativa (BISHOP & HALL, 2000; ASPENSTROM, 1999; REN *et al.*, 1999) Desse modo, os ensaios foram realizados sob diferentes condições de transfecção com os plasmídeos HA-Rnd1, (selvagem e mutado), p190RhoGAP e STI1.

Para isso, primeiramente foi necessário padronizar alguns parâmetros, dentre eles verificar se era possível a detecção de RhoA endógena em células HEK293T assim como descrita por Pescatore *et al.* (2012) em células VSMC. Logo, a figura 8 mostra a presença de banda indicativa desta GTPase em células não transfectadas. Em seguida, partiu-se para a padronização de volume de extrato bacteriano expressando a recombinante GST-RBD que seria ligado a resina de glutationa-sepharose nos ensaios de *pull-down*. Isto porque apesar de a recombinante ligar-se com muito menor afinidade a GDP-RhoA, em relação a GTP-RhoA, se houver uma quantidade excessiva desta “isca” podem ocorrer ligações significativas com a forma inativa, gerando uma subestimada detecção de RhoA ativa. Desse modo, o volume de 90µL do extrato bacteriano foi estabelecido como ideal para os ensaios nas condições de expressão estabelecidas, pois com este volume foi possível detectar em reação de WB bandas satisfatórias (figura 10), levando em conta que apenas 0,5 a 1% de toda RhoA encontra-se na forma ativa (REN *et al.*, 1999)

Apesar disso, os primeiros ensaios ainda apresentaram problemas na detecção da GTPase ativa quando as células HEK 293T foram transfectadas para produzir as condições de interesse. Desse modo, foi necessário também padronizar o tempo para obtenção do extrato celular após a transfecção. Assim, realizou-se *pull-down* a partir de

extratos com diferentes tempos de expressão, sendo eles 10, 12, e 24 horas no qual foi possível verificar que o tempo ideal para a detecção de RhoA ativa é de 10 horas após transfecção dos vetores já que em seguida sua atividade começa a decair (figura 11).

Com a padronização destes parâmetros foi realizado o ensaio de *pulldown* com as primeiras condições de interesse, ou seja, com células transfectadas com HA-Rnd1WT (selvagem) e HA-Rnd1ΔN (mutado) na tentativa de reproduzir os resultados obtido por Oinuma e colaboradores (2012). Nestas condições esperava-se que a atividade de RhoA fosse maior na presença de Rnd1 mutado. Isso porque esta proteína mutante apresenta uma deleção na porção N-terminal KERRA composta por 7 aminoácidos, a qual seria a responsável pelo antagonismo desta frente a RhoA. Todavia, nossos resultados apresentaram-se de forma contrária ao esperado (figura 12).

Uma possível justificativa para este resultado, deve-se ao fato de que os ensaios publicados pelo grupo citado aconteceu em condições de superexpressão de RhoA, o que poderia levar a detecção mais eficiente desta. Desse modo, visando aumentar a quantidade de RhoA ativa presente na célula para *pulldown*, porém sem a sua superexpressão, foi utilizado o ácido lisofosfatídico (LPA). Este fosfolípido é conhecido por sua capacidade de aumentar a atividade de RhoA, além de induzir a fosforilação da cadeia leve de miosina e conduzir a formação de fibras de estresse e adesões focais (SEUFFERLEINS & ROZENGURTL, 1994; ZHANG et al., 1997; KRANENBURG et al., 1999). Assim, seguiu-se para a padronização do tempo de exposição das células que seriam submetidas a *pulldown* ao LPA. Em *pulldown* com células HEK 293T tratadas com LPA, o extrato daquelas expostas por 10 minutos (figura 13), resultou em maior detecção da atividade de RhoA, sendo este o tempo estabelecido para o ensaio sob as condições de interesse.

À vista disso, considerando que o estímulo de LPA resultaria em RhoA ativa suficiente para sua detecção de forma mais eficiente, realizou-se *pulldown* das células transfectadas nas condições de interesse. O resultado porém apresentou-se diferente do esperado (figura 14A), já que apesar de ter sido possível observar diminuição da atividade de RhoA pelo antagonismo de Rnd1 (OINUMA et al., 2012), a reversão deste fenômeno esperado pela interação de ST11 com Rnd1 (DE SOUZA et al., 2014) que levaria ao aumento de atividade de RhoA não ocorreu.

Dentro os fatores que explicariam este resultado destacamos a ativação de RhoA por estímulo de LPA, já que isto ocorre por uma via diferente da que é alvo deste estudo. De acordo com Moolenaar e colaboradores (1997), esta ativação se dá quando o receptor de membrana de LPA se liga a Rho através de subunidades livres da proteína G e de um intermediário ainda desconhecido. Assim, é possível que a capacidade de STI1 reverter o antagonismo de Rnd1 que levaria ao aumento da atividade de RhoA só ocorra quando sua regulação depende apenas do eixo Rnd1-p190RhoGAP. Além disso, é preciso considerar que a linhagem celular HEK293T que foi submetida ao tratamento é de origem humana, enquanto que as utilizadas nos trabalhos citados N1E-115 e NIH 3T3 são células de origem animal, o que pode levar a diferentes resultados. Além disso, existe a possibilidade de a ativação por LPA não ter sido totalmente eficaz, já que outros fatores do cultivo celular como o número de passagens, podem tornar as células pouco responsivas ou irresponsivas.

Desse modo, a detecção de RhoA ativa com estímulo de LPA, ainda que tenha sido mais eficaz que sem o tratamento, pode não ter sido ideal e não mimetizar condições de superexpressão, como visto em trabalho de Oinuma e colaboradores (2012), que poderiam favorecer a obtenção dos resultados esperados

### 5.3. PRODUÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-Rnd1

A produção de um anticorpo monoclonal anti-Rnd1 foi o terceiro objetivo deste trabalho, ocorrendo paralelamente aos ensaios de *pull-down*. Para isso foi expressa e purificada a proteína recombinante a GST-Rnd1. Por causa da fusão com a etiqueta GST que possui maior imunogenicidade devido a seu tamanho (~26kDa) e ter origem no *Schistosoma japonicum* (HARPER et al. 2013) de modo que tipicamente leva a uma resposta mais robusta em um hospedeiro mamífero, optamos também pela expressão e purificação do antígeno recombinante 6His-Rnd1. Assim, um segundo grupo foi imunizado com este antígeno, na intenção de driblar uma possível imunogenicidade dominante do hospedeiro frente à porção GST, quando comparada à porção Rnd1 do mesmo antígeno.

Na purificação do antígeno recombinante GST-Rnd1 foi possível observar que grande parte deste não ligou-se adequadamente a coluna cromatográfica (coluna FNL – figura 13) de glutathiona-sepharose. Isso pode ter ocorrido devido a saturação da resina, visto que sua capacidade de ligação é de aproximadamente 5mg/ml e utilizamos 500µL desta matriz cromatográfica. Apesar disso e de a proteína Rnd1 possuir características hidrofóbicas (NOBES et al., 1998a) consideramos que sua expressão e purificação foi satisfatória. Isto porque ela foi obtida na forma solúvel e seu rendimento nas frações eluídas foi estimado em aproximadamente 3,2 mg/ml, o que é mais do que suficiente para a imunização dos animais.

Quanto a expressão e purificação do antígeno 6His-Rnd1, foi possível observar que seu rendimento foi um pouco menor, e com a presença de alguns contaminantes ou bandas de degradação (figura 15). Porém, ainda assim consideramos satisfatório para seguir com a imunização dos animais, visto que a concentração obtida do antígeno recombinante foi de aproximadamente 1,25 mg/ml.

Após a imunização dos animais dos dois grupos, GST-Rnd1 e 6His-Rnd1, seus soros policlonais foram testados quanto a presença de anticorpos anti-Rnd1 por reação de Western Blot. Na figura 16 (A e B), dos soros dos animais m01 e m02, não foi possível observar a presença de banda correspondente a altura de Rnd1 no extrato de células HEK293T transfectadas com HA-Rnd1, apesar de aparecerem em seus controles positivos (antígeno recombinante). Já na figura 17, correspondente ao soro do animal m03, pode-se observar banda na altura esperada, enquanto que o soro m04 não apresentou bons resultados. Desse modo, o animal m03 foi o escolhido para o procedimento de produção de anticorpos monoclonais com hibridomas.

Com o objetivo de confirmar a eficiência do soro do animal antes de prosseguir para o procedimento de fusão, mais dois testes foram realizados. Primeiramente, utilizando extrato de células HEK293T não transfectadas, e transfectadas com os plasmídeos pEGFP, pEGFP/Rnd1 pCDNA3/HA-Rnd1 realizou-se reação de Western Blot. Foi possível observar então que este possui anticorpos anti-Rnd1, porém a presença de forte banda correspondente a Rnd1 endógena (HEK293T não transfectada) sugere certa inespecificidade, visto que esta é mais intensa do que a presente na reação dos extratos com superexpressão da proteína alvo (figura 18). Além disso, o soro do

animal m03 obtido em duas ocasiões (após última imunização – sangramento 1 e no dia do sacrifício do animal – sangramento 2) foi utilizado em ensaio de ELISA para comparação com soro não-imune em diferentes diluições (gráfico 1). Assim, foi constatado que os soros policlonais eram reativos para a presença de anticorpos anti-Rnd1 e que a diluição limite para a detecção específica de 6His-Rnd1 neste ensaio era de 1:1600.

Com os resultados obtidos em *Western Blot* e ELISA comprovando a reatividade do soro do animal m03 para a presença de anti-Rnd1, partiu-se então para a produção dos hibridomas que consiste na fusão esplenócitos do animal com células de mieloma P3X63Ag8.653. Para a varredura dos hibridomas utilizou-se de duas técnicas: primeiramente ELISA do sobrenadante de 58 poços da fusão que foram selecionados seguindo critérios como aqueles cujas células ocuparam mais da metade da área do poço sendo visível a olho nu e mudança de sua coloração (HARLOW & LANE, 1998). Em seguida foi realizado *Western Blot* daqueles cujos valores foram ligeiramente maiores que o controle negativo. Todavia, todos os 72 poços testados apresentaram-se negativos quanto a presença de anticorpos monoclonais anti-Rnd1. Assim, apesar da obtenção de alguns clones secretores de anticorpos reativos para a proteína Rnd1 recombinante, nenhum anticorpo monoclonal produzido reagiu adequadamente com a Rnd1 produzida em células eucarióticas. Uma possível explicação para tal resultado pode residir no fato que os epítomos imunologicamente mais relevantes no antígeno recombinante e presentes durante a fase de varredura por ELISA (6His-Rnd1) não estivessem mais disponíveis no antígeno expresso nas células HEK293 (HA-Rnd1).

## 6. CONCLUSÃO

- Nossos dados indicam que a proteína STI1 ao interagir e inativar a GTPases Rnd1, regula também a atividade de p190RhoGAP, levando a sua inativação.
- Não foi possível concluir o papel de STI1 na atividade de RhoA visto que nas condições testadas os resultados obtidos foram contrários ao esperado.
- Apesar do soro policlonal do animal imunizado com GST-Rnd1 mostrar-se reativo para a presença de anticorpos anti-Rnd1, não foi possível produzir anticorpo monoclonal reativo para Rnd1 expresso por células de mamífero.
- Os animais imunizados com 6His-Rnd1 não apresentaram soro policlonal responsivo para a presença de anticorpos anti-Rnd1.

## 7. REFERÊNCIAS

VAN AELST, L.; D'SOUZA-SCHOREY, C. Rho GTPases and signaling networks. **Genes & development**, v. 11, n. 18, p. 2295–2322, 1997.

ARANTES, C.; NOMIZO, R.; LOPES, M. H.; et al. Prion protein and its ligand stress inducible protein 1 regulate astrocyte development. **Glia**, v. 57, n. 13, p. 1439–1449, 2009.

ASPENSTROM, P. Effectors for the Rho GTPases Pontus Aspenström WASP. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 11, n. 1, p. 95–102, 1999.

BAINDUR-HUDSON, S.; EDKINS, A. L.; BLATCH, G. L. The Networking of Chaperones by Co-chaperones. , v. 78, p. 69–90, 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-11731-7>>.

BINAMÉ, F.; MEYNARD, A. B.; MAGNAN, L.; et al. Cancer-associated mutations in the protrusion- targeting region of p190RhoGAP impact tumor cell migration. , p. 1–15, 2016.

BISHOP, A. L.; HALL, A. Rho GTPases and their effector proteins. , v. 255, p. 241–255, 2000.

CAETANO, F. A.; MARILENE, L. H.; ARANTES, C. P.; et al. Endocytosis of prion protein is required for ERK1/2 signaling induced by stress-inducible protein 1. , v. 28, n. 26, p. 6691–6702, 2009.

CALDERWOOD, S. K.; MAMBULA, S. S.; GRAY, P. J.; THERIAULT, J. R. Extracellular heat shock proteins in cell signaling. **FEBS Letters**, v. 581, n. 19, p. 3689–3694, 2007.

CARCEA, I.; MA'AYAN, A.; MESIAS, R.; et al. Flotillin-mediated endocytic events dictate cell type-specific responses to semaphorin 3A. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 30, n. 45, p. 15317–15329, 2010.

CHARDIN, P. Function and regulation of Rnd proteins. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 7, n. 1, p. 54–62, 2006.

CHEN, S.; SMITH, D. F. Hop as an adaptor in the heat shock protein 70 (Hsp70) and Hsp90 chaperone machinery. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 52, p. 35194–35200, 1998.

CHIARINI, L. B.; FREITAS, A. R. O.; ZANATA, S. M.; et al. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. , v. 21, n. 13, p. 3317–3326, 2002.

DANG, P.; SMYTHE, E.; FURLEY, A. J. W. TAG1 Regulates the Endocytic Trafficking

and Signaling of the Semaphorin3A Receptor Complex. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 30, p. 10370–10382, 2012.

DANIEL, S.; BRADLEY, G.; LONGSHAW, V. M.; et al. Nuclear translocation of the phosphoprotein Hop (Hsp70/Hsp90 organizing protein) occurs under heat shock, and its proposed nuclear localization signal is involved in Hsp90 binding. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1783, n. 6, p. 1003–1014, 2008.

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

FUJITA, H.; KATOH, H.; ISHIKAWA, Y.; MORI, K.; NEGISHI, M. Rapostlin is a novel effector of Rnd2 GTPase inducing neurite branching. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 47, p. 45428–45434, 2002.

GASTPAR, R.; GEHRMANN, M.; BAUSERO, M. A; ASEA, A.; GROSS, C. Heat Shock Protein 70 Surface-Positive Tumor Exosomes Stimulate Migratory and Cytolytic Activity of Natural Killer Cells Migratory and Cytolytic Activity of Natural Killer Cells. , , n. 12, p. 5238–5247, 2005.

GRIDER, M. H.; PARK, D.; SPENCER, D. M.; SHINE, H. D. Lipid raft-targeted Akt promotes axonal branching and growth cone expansion via mTOR and Rac1, respectively. **Journal of Neuroscience Research**, v. 87, n. 14, p. 3033–3042, 2009.

HAIJ, G. N. M.; ARANTES, C. P.; DIAS, M. V. S.; et al. The unconventional secretion of stress-inducible protein 1 by a heterogeneous population of extracellular vesicles. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, n. 17, p. 3211–3227, 2013.

HARLOW, E.; LANE, D. **Antibodies: a laboratory manual**. 2 edition ed. New York: CSH Press, 1998.

HARPER, S.; SPEICHER, D. W.; PH, D. Purification of proteins fused to glutathione S-transferase. , p. 1–15, 2013.

HONORE, B.; LEFFERS, H.; MADSEN, P.; et al. Molecular cloning and expression of a transformation-sensitive human protein containing the TPR motif and sharing identity to the stress-inducible yeast protein STI1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 12, p. 8485–8491, 1992.

ISHIKAWA, Y.; KATOH, H.; NEGISHI, M. A role of Rnd1 GTPase in dendritic spine formation in hippocampal neurons. **The Journal of neuroscience : the official journal**

of the **Society for Neuroscience**, v. 23, n. 35, p. 11065–11072, 2003.

KIM, Y. S.; HORI, M.; YASUDA, K.; OZAKI, H. Differences in the gestational pattern of mRNA expression of the Rnd family in rat and human myometria. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 142, n. 4, p. 410–415, 2005.

KRANENBURG, O.; POLAND, M.; HORCK, F. P. G. VAN; et al. Activation of RhoA by Lysophosphatidic Acid and G<sub>12/13</sub> Subunits in Neuronal Cells: Induction of Neurite Retraction. , v. 10, n. June, p. 1851–1857, 1999.

LIMA, F. R. S.; ARANTES, C. P.; MURAS, A. G.; et al. Cellular prion protein expression in astrocytes modulates neuronal survival and differentiation. **Journal of Neurochemistry**, v. 103, n. 6, p. 2164–2176, 2007.

LONGSHAW, V. M.; CHAPPLE, J. P.; BALDA, M. S.; CHEETHAM, M. E.; BLATCH, G. L. Nuclear translocation of the Hsp70/Hsp90 organizing protein mSTI1 is regulated by cell cycle kinases. **Journal of cell science**, v. 117, n. Pt 5, p. 701–710, 2004.

LOPES, M. H.; HAJJ, G. N. M.; MURAS, A. G.; et al. Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 25, n. 49, p. 11330–11339, 2005.

LOPES, M. H.; SANTOS, T. G.; RODRIGUES, B. R.; CUNHA, I. W.; WASILEWSKA-SAMPAIO, A. P. Disruption of prion protein – HOP engagement impairs glioblastoma growth and cognitive decline and improves overall survival. , , n. July 2013, p. 1–10, 2014. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/onc.2014.261>>. .

LUO, L. Rho GTPases in neuronal morphogenesis. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 1, n. 3, p. 173–180, 2000.

LUO, Y.; RAIBLE, D.; RAPER, J. A. Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. **Cell**, v. 75, n. 2, p. 217–227, 1993.

MARTINS, V. R.; LINDEN, R.; PRADO, M. A M.; et al. Cellular prion protein: On the road for functions. **FEBS Letters**, v. 512, n. 1–3, p. 25–28, 2002.

MIZUNO, K. Signaling mechanisms and functional roles of co fi lin phosphorylation and dephosphorylation. **Cellular Signalling**, v. 25, n. 2, p. 457–469, 2013. Elsevier Inc.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.11.001>>. .

MOOLENAAR, W. H.; KRANENBURG, O.; POSTMA, F. R.; ZONDAG, G. C. Lysophosphatidic acid : G-protein signalling and cellular responses Wouter H Moolenaar \*, Onno Kranenburg , Friso R Postma and Gerben CM Zondag. **Cell biology**, v. 9, p. 168–173, 1997.

MOON, A.; DAVID, G.; PHARMACEUTICALS, O. Essay The ADF / Cofilin Proteins : Stimulus-responsive Modulators of Actin Dynamics. , v. 6, n. November, p. 1423–1431, 1995.

MORIYAMA, K.; IIDA, K.; YAHARA, I. Phosphorylation of Ser-3 of cofilin regulates its essential function on actin. , p. 73–86, 1996.

NICOLET, C. M.; CRAIG, E. A. Isolation and characterization of STI1, a stress-inducible gene from *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and cellular biology**, v. 9, n. 9, p. 3638–3646, 1989.

NOBES, C. D.; LAURITZEN, I.; MATTEI, M.; et al. A New Member of the Rho Family, Rnd1, Promotes Disassembly of Actin Filament Structures and Loss of Cell Adhesion. , v. 141, n. 1, p. 1–11, 1998a. Disponível em: <<papers3://publication/uuid/7F1141C0-6B0C-4DBD-983B-9E9D70E27C09>>. .

NOBES, C. D.; LAURITZEN, I.; MATTEI, M.; et al. A New Member of the Rho Family, Rnd1, Promotes Disassembly of Actin Filament Structures and Loss of Cell Adhesion. , v. 141, n. 1, p. 187–197, 1998b.

OINUMA, I.; ISHIKAWA, Y.; KATOH, H.; NEGISHI, M. The Semaphorin 4D Receptor Plexin-B1 Is a GTPase Activating Protein for R-Ras. , v. 305, n. August, p. 862–866, 2004.

OINUMA, I.; KATOH, H.; HARADA, A.; NEGISHI, M. Direct interaction of Rnd1 with Plexin-B1 regulates PDZ-RhoGEF-mediated Rho activation by Plexin-B1 and induces cell contraction in COS-7 cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 28, p. 25671–7, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12730235>>. .

OINUMA, I.; KAWADA, K.; TSUKAGOSHI, K.; NEGISHI, M. Rnd1 and Rnd3 targeting to lipid raft is required for p190 RhoGAP activation. **Molecular Biology of the Cell**, v. 23, n. 8, p. 1593–1604, 2012.

PESCATORE, L. A.; BONATTO, D.; FORTI, F. L.; et al. Protein disulfide isomerase is

required for platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell migration, Nox1 NADPH oxidase expression, and RhoGTPase activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 35, p. 29290–29300, 2012.

PUSCHEL, A. W. **Semaphorins: receptor and intracellular signaling mechanisms**. 2007.

REN, X. D.; KIOSSES, W. B.; SCHWARTZ, M. A. Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. **EMBO Journal**, v. 18, n. 3, p. 578–585, 1999.

ROHL, A.; WENGLER, D.; MADL, T.; et al. Hsp90 regulates the dynamics of its cochaperone Sti1 and the transfer of Hsp70 between modules ". **Nature communications**, v. 6, n. 6655, 2015.

RUSHTON, D. N. Functional Electrical Stimulation and rehabilitation—an hypothesis. **Medical Engineering & Physics**, v. 25, p. 75–78, 2003.

SANTOS, T. G.; LOPES, M. H.; MARTINS, V. R. Targeting prion protein interactions in cancer. , p. 165–173, 2015.

SEUFFERLEINS, T.; ROZENGURTL, E. Lysophosphatidic Acid Stimulates Tyrosine Phosphorylation of Focal Adhesion Kinase , Paxillin , and p130. , v. 269, n. 12, p. 9345–9351, 1994.

DA SILVA, J. S.; DOTTI, C. G. Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 3, n. 9, p. 694–704, 2002.

SIMONS, K.; SAMPAIO, J. Membrane organization and lipid rafts. **Cold Spring Harbor ...**, p. 1–18, 2011. Disponível em: <<http://cshperspectives.cshlp.org/content/3/10/a004697.short>>. .

SMITH, D. F. Tetratricopeptide repeat cochaperones in steroid receptor complexes. **Cell stress & chaperones**, v. 9, n. 2, p. 109–121, 2004.

DE SOUZA, L. E. R.; MOURA COSTA, M. D.; BILEK, E. S.; et al. STI1 antagonizes cytoskeleton collapse mediated by small GTPase Rnd1 and regulates neurite growth. **Experimental Cell Research**, v. 324, n. 1, p. 84–91, 2014. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.03.017>>. .

SUMI, T.; MATSUMOTO, K.; TAKAI, Y.; NAKAMURA, T. Cofilin Phosphorylation and

Actin Cytoskeletal Dynamics Regulated by Rho- and Cdc42-activated LIM-kinase 2. , v. 147, n. 7, p. 1519–1532, 1999.

TAKAHASHI, T.; FOURNIER, A.; NAKAMURA, F.; et al. Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors. **Cell**, v. 99, n. 1, p. 59–69, 1999.

VAYSSIÈRE, B.; ZALCMAN, G.; MAHÉ, Y.; et al. Interaction of the Grb7 adapter protein with Rnd1, a new member of the Rho family. **FEBS Letters**, v. 467, n. 1, p. 91–96, 2000.

WILLMER, T.; CONTU, L.; BLATCH, G. L.; EDKINS, A. L. Knockdown of Hop downregulates RhoC expression , and decreases pseudopodia formation and migration in cancer cell lines. **Cancer Letters**, v. 328, n. 2, p. 252–260, 2013. Elsevier Ireland Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2012.09.021>>. .

XIANG, G.; YI, Y.; WEIWEI, H.; WEIMING, W. RND1 is up-regulated in esophageal squamous cell carcinoma and promotes the growth and migration of cancer cells. , p. 773–779, 2016.

ZANATA, S. M.; HOVATTA, I.; ROHM, B.; PÜSCHEL, A. W. Antagonistic effects of Rnd1 and RhoD GTPases regulate receptor activity in Semaphorin 3A-induced cytoskeletal collapse. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 22, n. 2, p. 471–477, 2002.

ZANATA, S. M.; LOPES, M. H.; MERCADANTE, A. F.; et al. Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. **EMBO Journal**, v. 21, n. 13, p. 3307–3316, 2002.

ZHANG, Q.; MAGNUSSON, M. K.; MOSHERT, D. F. Lysophosphatidic Acid and Microtubule-destabilizing Agents Stimulate Fibronectin Matrix Assembly through Rho-dependent Actin Stress Fiber Formation and Cell Contraction. , v. 8, n. August, p. 1415–1425, 1997.

ZHAO, H.; CAO, X.; WU, G.; LOH, H. H.; LAW, P. Y. Neurite outgrowth is dependent on the association of c-Src and lipid rafts. **Neurochemical Research**, v. 34, n. 12, p. 2197–2205, 2009.

SILVERTHORN, D. U. *Fisiologia Humana – uma abordagem integrada*. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010