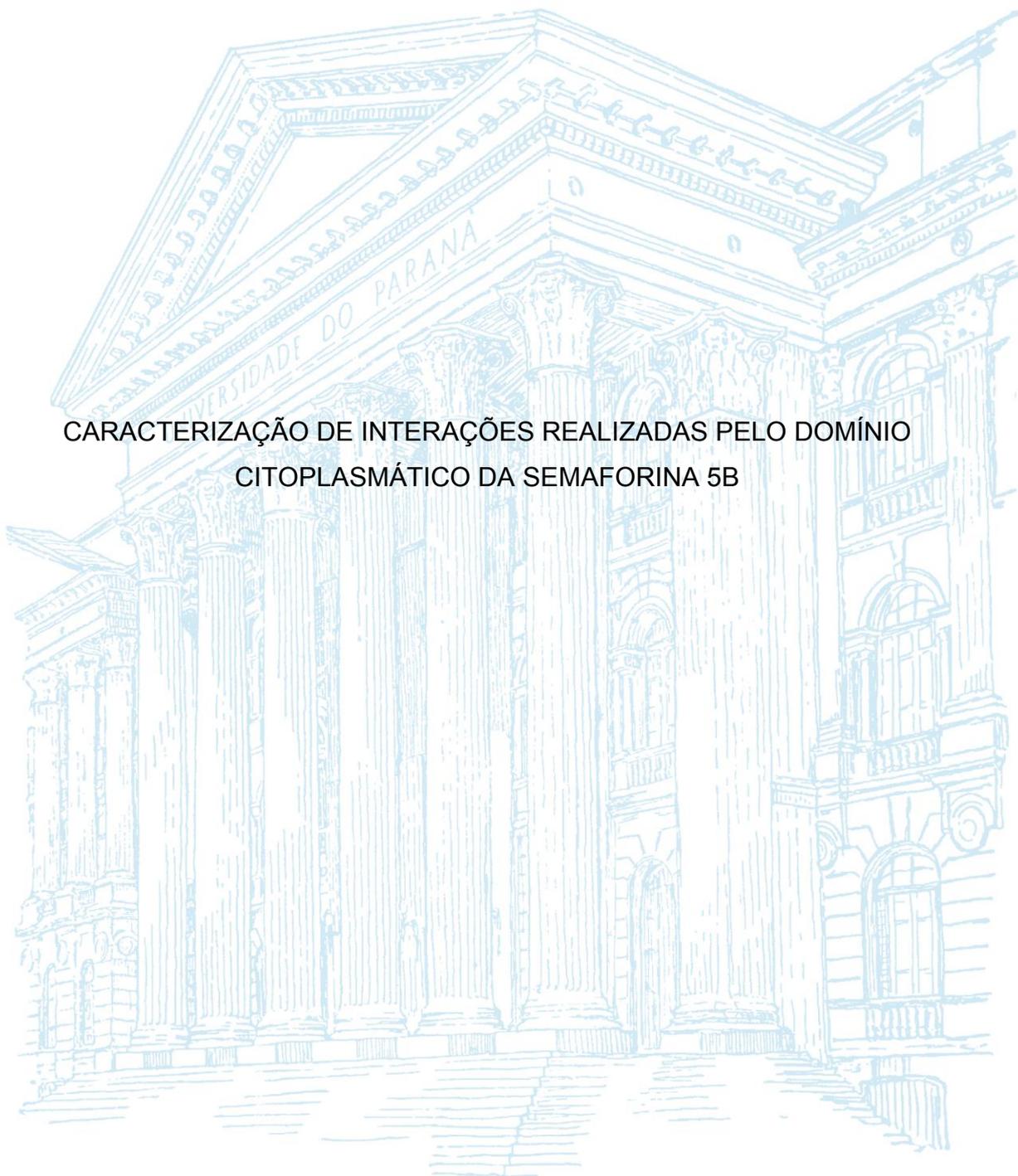


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CELSO FÁVARO JUNIOR

CARACTERIZAÇÃO DE INTERAÇÕES REALIZADAS PELO DOMÍNIO
CITOPLASMÁTICO DA SEMAFORINA 5B



CURITIBA
2015

CELSO FÁVARO JUNIOR

CARACTERIZAÇÃO DE INTERAÇÕES REALIZADAS PELO DOMÍNIO
CITOPLASMÁTICO DA SEMAFORINA 5B

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia. Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Patologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Adriana Frohlich
Mercadante

CURITIBA
2015

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Fávaro Junior, Celso

Caracterização de interações realizadas pelo domínio citoplasmático da semaforina 5B. / Celso Fávaro Junior. – Curitiba, 2015.

72 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Adriana Frohlich Mercadante

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

1. Semaforinas. 2. Ubiquitinação. Título II. Mercadante, Adriana Frohlich. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 616.01



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

**“CARACTERIZAÇÃO DE INTERAÇÕES REALIZADAS PELO
DOMÍNIO CITOPLASMÁTICO DA SEMAFORINA 5B”**

Por

CELSO FÁVARO JUNIOR

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

Adriana F. Mercadante
Prof^a. Dr^a. Adriana Frohlich Mercadante – Presidente

Sheila M. B. Winnischofer
Prof^a. Dr^a. Sheila M. B. Winnischofer

Luiza H. Gremski
Prof^a. Dr^a. Luiza Helena Gremski

Juliana Ferreira de Moura
Prof^a. Dr^a. Juliana Ferreira de Moura

Silvio Marques Zanata
Prof. Dr. Silvio Marques Zanata

Curitiba, 31 de agosto de 2015.

AGRADECIMENTOS

À minha família por sempre me acolher e aconselhar em momentos de dúvida. Meus pais, Celso e Bernadete, meus irmãos, Elisabete, Guido e Margarete. Aos meus sobrinhos pelos momentos de descontração Mateus, Nicole, Carolina, Gabriela, Fernanda e Marcos. À Minha afilhada Ana.

Minha noiva Paloma pela compreensão e acolhimento incondicional durante estes anos de trabalho.

À minha orientadora Prof.^a Adriana por sempre me auxiliar a encontrar o caminho correto não só na pesquisa, mas também para minha formação como pessoa.

Aos alunos de iniciação científica Evelyn Castillo Lima, Leonardo Polak e Carolina que auxiliaram em diferentes momentos neste trabalho.

E aos colegas de laboratório pelas opiniões e discussões sobre o projeto e por proporcionar um ambiente agradável ao trabalho: Max Ingberman, Luiz Rizzo e Roberta Schroder.

À CAPES e CNPq pelo financiamento dos reagentes e auxílio.

“Há uma teoria que indica que sempre que qualquer um descobrir exatamente o que, para que e porque o universo está aqui, o mesmo desaparecerá e será substituído imediatamente por algo ainda mais bizarro e inexplicável... Há uma outra teoria que indica que isto já aconteceu.”

“Odeio escrever, adorei ter escrito.”
Douglas N. Adams

RESUMO

A correta ligação dos axônios aos seus alvos específicos é essencial para o desenvolvimento do sistema nervoso. As semaforinas pertencem a uma grande família de proteínas secretadas ou associadas à membrana, envolvidas na navegação axonal, fasciculação, ramificação e formação de sinapses, além da participação na progressão tumoral, angiogênese e diferenciação de linfócitos B. As semaforinas de classe 5 são proteínas transmembrânicas que contêm sete repetições trombospondinas. Os principais representantes desta classe são a Sema5A e a Sema5B. Não há na literatura nenhum estudo sobre a atuação destas proteínas como transdutoras de sinal. Inúmeras questões sobre esta molécula permanecem em aberto, tais como sua modulação, expressão celular e via de sinalização reversa. Em trabalho anterior, foi realizada uma varredura através do sistema de duplo-híbrido em leveduras para a identificação de alguns ligantes do domínio citoplasmático da Semaforina 5B (Sema-Cito5B). No presente trabalho, um número maior de clones obtidos naquela varredura foi analisado (totalizando 410 clones). Destes, 40 clones foram passíveis de sequenciamento, resultando na identificação de um painel composto por 26 diferentes proteínas, 13 confirmadas como positivas pelo duplo-híbrido. Esse painel inédito de ligantes putativos para Sema5B poderá contribuir para a melhor compreensão dessa proteína, sobretudo com relação ao seu papel como receptora e sinalizadora. A partir de informações da literatura, 5 proteínas foram selecionadas para confirmar os resultados encontrados. Alguns destes ligantes estão envolvidos no mecanismo de ubiquitinação, como Stub1 e Mib2, que são enzimas E3-ligases de ubiquitina; e Usp33, uma enzima deubiquitinante envolvida diretamente na migração de neurônios. Uba2, outro ligante escolhido participa da via de SUMOilação, como enzima ativadora E1. Cript foi escolhida por sua afinidade por proteínas do citoesqueleto e por estar relacionada à modulação de sinalização de PSD-95. Plasmídeos de expressão em células de mamíferos foram montados para expressar integralmente os ligantes selecionadas em fusão com etiqueta Myc. Para Sema5B, foram montados vetores para expressá-la integralmente com ou sem a presença de etiquetas His. Para região citoplasmática da Sema5B foram montados plasmídeos para expressá-la em fusão a uma etiqueta His e à proteína fluorescente EGFP. As expressões bem sucedidas dos ligantes Usp33, Uba2, Stub1 e Cript foram empregadas em ensaios de *pull-down* com Sema5B-his expressa em HEK293 ou com Sema-Cito5B-His produzida em bactérias. Em ambos os ensaios as interações de Sema5B com Usp33 e com Stub1 foram confirmadas. Os resultados sugerem que tais interações podem estar envolvidas na estabilidade/reciclagem do domínio citoplasmático da Semaforina 5B, ou ainda no crescimento axonal.

Palavras-chave: Semaforina. Ubiquitinação. SUMOilação. Sistema de duplo híbrido. Sema5B. Usp33. Uba2. Stub1. Cript. Pull-down. Vetores de expressão.

ABSTRACT

In the developing neuron system, the correct axon guidance is essential for linking the axons to their targets. The Semaphorins belongs to a large family of secreted and membrane associated proteins, which are involved on axon navigation, fasciculation and synaptic formation, besides the role on tumor progression, angiogenesis and B-lymphocyte differentiation. Class 5 Semaphorins are transmembrane proteins which contains seven repetitions of thrombospondins. Sema5A and Sema5B are the most prominent members of this class. Few studies regarding the role of Sema5B are available, and none about reverse signaling. Questions about modulation, cellular expression and reverse signaling are yet to be answered. On a previous work, an yeast two-hybrid screening using the cytoplasmic domain of Sema5B provided 410 clones for analysis. Fourty clones were sequenced, resulting on a panel containing 26 possible molecular partners. After further tests, nine of them were positive for interactions. This novel panel of Sema5B putative ligands contributes for a better comprehension of Sema5B role as a receptor and as a signal transducer protein. Five proteins, Usp33, Uba2, Stub1, Cript and Mib2, were chosen for further investigations. Stub1 and Mib1 are both E3 Ubiquitin ligases; Usp33 is a Deubiquitinating enzyme; Uba2 is a E1 SUMOilation activating enzyme; and Cript was chosen based on its affinity between cytoskeleton and other proteins, and its role as PSD-95 modulating and signaling protein. Mammalian cells expressing vectors were assembled in order to express Sema5B and putative ligands in fusion with tag proteins: Sema-Cito5B expressing His tag and EGFP fusion proteins; full length Sema5B expressing His tag fusion proteins; and a Myc tag was the choice for the putative ligands tag. Usp33, Uba2, Stub1 and Cript together with Sema5B-His or with prokaryotic Sema-Cito5B-His were applied in a pull-down assays. Usp33 and Stub1 interactions were confirmed. This result suggests that these proteins might be involved on stability and recycling of the cytoplasmic domain of Sema5B and axonal growth modulation.

Key words: Semaphorin. Ubiquitination. SUMOilation. y2h. yeast 2 hybrid. Sema5B. Usp33. Uba2. Stub1. Cript. Pull down. Expressing vectors. Plasmids

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática da família de proteínas Semaforina.	14
Figura 2 - Representação da Sema5B e sequências dos domínios citoplasmáticos.	18
Figura 3 - Representação dos plasmídeos construídos.	31
Figura 4 - Ensaio de <i> mating </i> cruzado.	39
Figura 5 - Domínio de SUMOilação.	42
Figura 6 - PCR para amplificação dos insertos correspondentes a Cript e Sema-Cito5B.	45
Figura 7 - PCR para amaplificação dos insertos correspondentes a Usp33, Uba2 e Stub1.	45
Figura 8 - Padronização das condições de PCR para amplificação de Mib2.	46
Figura 9 - Padronização das condições de PCR para amplificação de Sema5B integral.	46
Figura 10 - PCR para Sema5B integral.	47
Figura 11 - PCR de colônia para pEGFP Sema-Cito5B.	47
Figura 12 - PCR de colônia para Sema-Cito5B.	48
Figura 13 - PCR de colônia para pCDNA3.1- N MYC.	49
Figura 14 - PCR de colônia para pCDNA3.1- N MYC.	50
Figura 15 - Digestões simples Gel1 Xbal Gel2 Nhel.	50
Figura 16 - PCR de colônia para Cript e Stub1.	51
Figura 17 - PCR de colônia para Uba2.	51
Figura 18 - PCR de colônia para Usp33.	52
Figura 19 - Expressão dos ligantes de Sema5B em HEK293T transfectadas.	53
Figura 20 - Expressão de Sema5B-His em HEK293T em diferentes tempos.	53
Figura 21 - Purificação de Sema5B-His em resina de níquel.	54
Figura 22 - Expressão dos domínios citoplasmáticos de Sema5B em células HEK293T.	55
Figura 23 - Pull-down com Sema5B integral imobilizada.	56
Figura 24 - Pull-down com Sema-Cito5B expressa em procarionte imobilizada.	56
Figura 25 - Proposta da cascata bioquímica da Sema5B e o envolvimento dos ligantes selecionados.	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CSPG	- Condroitin sulfato;
DH	- Sistema de duplo híbrido;
EGFP	- <i>Enhanced green fluorescent protein</i> , GFP mutada para maior brilho;
Gal	- Galactose;
Gli	- Glicose;
His	- Histidina;
HSPG	- Heparan sulfato;
Leu	- Leucina;
LiAc	- Acetato de Lítio
Meio SD	- <i>Selective dropout</i> , meio desprovido de aminoácidos essenciais e alguns nucleotídeos;
PCR	- <i>Polymerase chain reaction</i> , Reação em cadeia da polimerase;
pGi_5B	- Plasmídeo pGILDA com a sequência para Sema-Cito5B,
SEMA	- Domínio extracelular de ~500 aminoácidos das Semaforinas.
Sema5B	- Semaforina 5B;
Sema-Cito5B	- Porção citoplasmática da semaforina 5B;
Sema-Cito5B-EGFP	- Porção citoplasmática da semaforina 5B em fusão com EGFP;
Sema-Cito5B-His	- Porção citoplasmática da semaforina 5B em fusão com etiqueta de 6 histidinas;
Trp	- Triptofano
Ura	- Uracil;
Y2H	- Sistema de duplo híbrido;

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1	Bases Moleculares da Navegação Axonal.....	12
2.2	A Família das Semaforinas e seu Envolvimento na Navegação Axonal.....	13
2.3	Semaforinas transmembrânicas	15
2.4	Semaforinas de Classe 5	16
2.5	Resultados Anteriores.....	21
3	OBJETIVOS GERAIS	23
3.1	Objetivos Específicos	23
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1	Validação de ligantes de Sema-cito5B obtidos por duplo-híbrido	24
4.1.1	Seleção de Colônias Candidatas	24
4.1.2	Extração e confirmação do plasmídeo da biblioteca	25
4.1.3	Confirmação da identidade dos ligantes	27
4.1.4	Avaliação do potencial de autoativação dos ligantes por ensaio de mating cruzado (KOLONIN et al., 2000).....	28
4.2	Construção de plasmídeos para obtenção de proteínas para semaforinas e seus ligantes.....	29
4.2.1	Expressão heteróloga e purificação de Sema-cito5B em bactérias	29
4.2.2	Estratégia para expressão de proteínas em células de mamíferos	30
4.2.3	Montagem do vetor pCDNA 3.1- N Myc.....	33
4.2.4	Construção dos plasmídeos para expressão em células de mamíferos.....	34
4.2.5	Transfecção em HEK293.....	34
4.3	Ensaio de <i>pull-down</i>	35
4.3.1	Extrato de células HEK293T.....	35
4.3.2	<i>Pull Down</i>	35
5	RESULTADOS	37
5.1	Identificação de novos ligantes do domínio citoplasmático de Sema5B.....	37
5.2	Confirmação das interações através de ensaio de mating cruzado (cross-mating assay).....	39
5.3	Crerios de escolha de ligantes e levantamento da literatura para atuação de putativos ligantes de Sema-cito5B	40
5.4	Construção de vetores para expressão de Sema5B e seus ligantes em células de mamíferos	43
5.4.1	Escolha dos vetores e etiquetas moleculares	43
5.4.2	Obtenção dos insertos.....	44
5.4.3	Clonagem de Sema-Cito pCDNA His e Sema-Cito pEGFP	47
5.4.4	Montagem do pCDNA 3.1- N Myc tag	48
5.4.5	Clonagem dos ligantes no vetor pCDNA 3.1(-) N-Myc.....	51
5.5	Expressão dos ligantes e de Sema5B em células HEK293T	52
5.6	Confirmação das interações por <i>pull-down</i>	55
6	DISCUSSÃO	58
7	CONCLUSÃO	65
	REFERÊNCIAS	66

1 INTRODUÇÃO

O estabelecimento de redes neurais bem sucedidas é essencial para o funcionamento adequado do sistema nervoso (O'CONNOR et al., 2009). Para tanto, existem diversas interações e vias metabólicas que trabalham de maneira orquestrada na regulação dos prolongamentos neurais, de forma a eliminar a formação de sinapses inadequadas (GODA; DAVIS, 2003).

Nesse contexto de regulação do desenvolvimento das redes neurais estão inseridas as semaforinas, pertencentes a uma família de proteínas que exibem estrutura e funcionalidade conservadas filogeneticamente (YAZDANI; TERMAN, 2006). As semaforinas apresentam comprovada atividade na regulação da adesão e proliferação celular, organização do citoesqueleto e crescimento axonal, controlando de maneira específica a morfologia neural e a sinaptogênese (YAZDANI; TERMAN, 2006).

Dentre as diferentes classes de semaforinas, a classe 5 ainda carece de estudos que elucidem o seu funcionamento, portanto constitui um campo fértil a ser investigado. Sema5A e SemaB são os representantes dessa classe em vertebrados (RAPER, 2000). Poucos estudos existem a respeito desses membros, sobretudo no que tange a Sema5B. A Sema5B é uma proteína transmembrânica de passagem única, tal característica sugere que ela possa atuar tanto na sinalizaç, o extracelular (funcionando como ligante) como na sinalizaç, o intracelular (funcionando como receptora). Como será apresentado, os trabalhos existentes acerca da Sema5B abordaram seu domínio extracelular, logo, direcionaram-se à sua função como ligante.

Um dos objetivos do projeto de doutorado em questão foi analisar clones obtidos através de uma varredura por duplo híbrido de uma biblioteca de epitélio olfatório, utilizando como isca a porção citoplasmática da Semaforina 5B. Estes ligantes foram avaliados quanto à sua capacidade de autoativação. A presença de diversos ligantes identificados como positivos possibilitou a produção de um painel de candidatos para proteínas ligantes da região citoplasmática de Sema5B (Sema-

cito5B). Ligantes inéditos para a Sema-cito5B foram selecionados para melhor caracterização de suas interações. Vetores capazes de expressar Sema5B e seus ligantes em células de mamíferos foram produzidos e os produtos de expressão destes vetores foram analisados para confirmação das interações.

O painel produzido nesse projeto apresenta dados inéditos de ligantes da porção citoplasmática da Sema5B e podem ajudar a elucidar a função de Sema5B como uma proteína transdutora de sinal.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Bases Moleculares da Navegação Axonal

A formação do sistema nervoso durante o desenvolvimento embrionário é dependente de inúmeras moléculas quimiorrepelentes e quimioatrativas (HUBER et al., 2003; WIT, DE; VERHAAGEN, 2003). Tais moléculas atuam nos neuroblastos (células precursoras de neurônios) de maneiras distintas, ou seja, neuroblastos que desempenharão determinadas funções respondem de maneira específica a cada molécula (HUBER et al., 2003; KELLER, 2005; LIU et al., 2014). A expressão destas moléculas muda ao longo da formação do sistema nervoso. Já foi mostrado, por exemplo, que gradientes de expressão destas moléculas determinam o fenótipo das células em desenvolvimento, limitando sua diferenciação até a idade embrionária correta, em torno do dia embrionário 6 (E6) ao E14 em camundongos, e que o silenciamento de Semaforina 5A e Semaforina 5B acarreta na entrada prematura de axônios durante a formação da medula espinhal (LIU et al., 2014). Estas guias químicas são detectadas pelos neuroblastos através de estruturas especializadas conhecidas como cones de crescimento, presentes na porção final dos neuritos (MUELLER, 1999; HUBER et al., 2003).

Os neuritos são extensões filiformes que se estendem a partir do corpo celular do neuroblasto. Já o cone de crescimento é uma especialização celular na extremidade desses prolongamentos celulares, constituída por lamelipódios e de projeções denominadas filipódios. Os neuritos juntamente com os cones de crescimento se assemelham a braços e mãos do neuroblastos (MUELLER, 1999). O cone de crescimento é dinâmico, pois possui elementos do citoesqueleto com grande plasticidade (microtúbulos e F-actina); este dinamismo é influenciado pela sinalização extracelular (MUELLER, 1999; HUBER et al., 2003; WIT, DE; VERHAAGEN, 2003). A detecção de ligantes químicos extracelulares é realizada por uma miríade de moléculas receptoras responsáveis por transduzir a informação através de cascatas bioquímicas, alterando o dinamismo do citoesqueleto. Moléculas quimioatrativas fornecem um ambiente favorável à manutenção e desenvolvimento do cone, enquanto que moléculas quimiorrepelentes induzem o

que é chamado de colapso do cone de crescimento, no qual todo o citoesqueleto do cone é “desmontado” e o prolongamento afetado cessa seu direcionamento de crescimento (DICKSON, 2002). Estas guias químicas, divididas em quimiorrepelentes e quimioatrativas, atuam pelo contato com seus receptores nos cones de crescimento, e podem ser tanto secretadas na matriz extracelular como estar associadas a membranas de outras células (JONGBLOETS; PASTERKAMP, 2014). A função de muitas moléculas varia de acordo com fatores como tipo celular, composição dos receptores no cone de crescimento e até mesmo com a composição da matriz extracelular (HUBER et al., 2003; HILARIO et al., 2009; JONGBLOETS; PASTERKAMP, 2014; LIU et al., 2014). Finalmente, tais moléculas se encontram presentes não só no desenvolvimento embrionário como também em processos regenerativos pós patologias no sistema nervoso (CAFFERTY et al., 2008; BRAUER; RICHERI, 2013).

Dentre as famílias de moléculas sinalizadoras e receptoras que regulam o direcionamento axonal encontram-se os receptores do tipo tirosino-quinase e tirosino-fosfatase (LEMMON; SCHLESSINGER, 2010; LEE, 2015); as netrinas e os receptores de netrinas (GOODMAN ET AL., 1999; KENNEDY, 2000); a família Robo e os seus receptores (GIGER; KOLODKIN, 2001) e as semaforinas (Semas) (WIT, DE; VERHAAGEN, 2003; PASTERKAMP, 2012; JONGBLOETS; PASTERKAMP, 2014) e seus receptores, plexinas e neuropilinas (TAMAGNONE; COMOGLIO, 2000; JONGBLOETS; PASTERKAMP, 2014; KOROPOULI; KOLODKIN, 2014).

2.2 A Família das Semaforinas e seu Envolvimento na Navegação Axonal

As semaforinas são uma grande família de proteínas secretadas ou associadas à membrana. Muitas dessas proteínas estão envolvidas na navegação axonal, fasciculação, ramificação e formação de sinapses, atuando como moléculas quimioatrativas ou quimiorrepelentes (KOLODKIN et al., 1992; MATTHES et al., 1995; KOLK et al., 2009; JONGBLOETS; PASTERKAMP, 2014). Outras funções desta família englobam a formação de vasos sanguíneos (FIORE et al., 2005; GELFAND et al., 2009) e a diferenciação celular de osteoblastos (SPENCER; LALLIER, 2009; HAYASHI et al., 2012).

A família das semaforinas possui mais de vinte membros, expressos em vertebrados, invertebrados e até em alguns vírus. Descritas originalmente como proteínas ligantes, atuam sobre determinados receptores como plexinas, neuropilinas, receptor tirosino-quinase e integrinas. (WIT, DE; VERHAAGEN, 2003; JONGBLOETS; PASTERKAMP, 2014). A família das semaforinas compreende membros que possuem um domínio amino-terminal extracelular de cerca de 500 aminoácidos identificado como domínio SEMA; com exceção do membro expresso nos vírus, os demais contêm um domínio com 17 cisteínas denominado PSI (*plexin, SEMA and Integrin domain*) que apresenta similaridades com determinado domínio presente em plexinas e integrinas. As classes desta família se diferenciam na sua região carboxi-terminal que pode conter motivos adicionais (GOODMAN et al., 1999).

As semaforinas também diferem entre si quanto à localização celular: topologicamente podem estar associadas à membrana por âncoras de GPI, podem ser transmembrânicas de passagem única, como também podem ser secretadas (GOODMAN et al., 1999).

Tais diversidades estruturais permitiram a designação de 8 classes de semaforinas (GOODMAN et al., 1999). Semaforinas das classes 1 e 2 são encontradas em invertebrados; classes 3 a 7 estão presentes predominantemente em vertebrados, e uma classe final (classe V) é composta de proteínas codificadas por vírus. (**Fig. 1**)

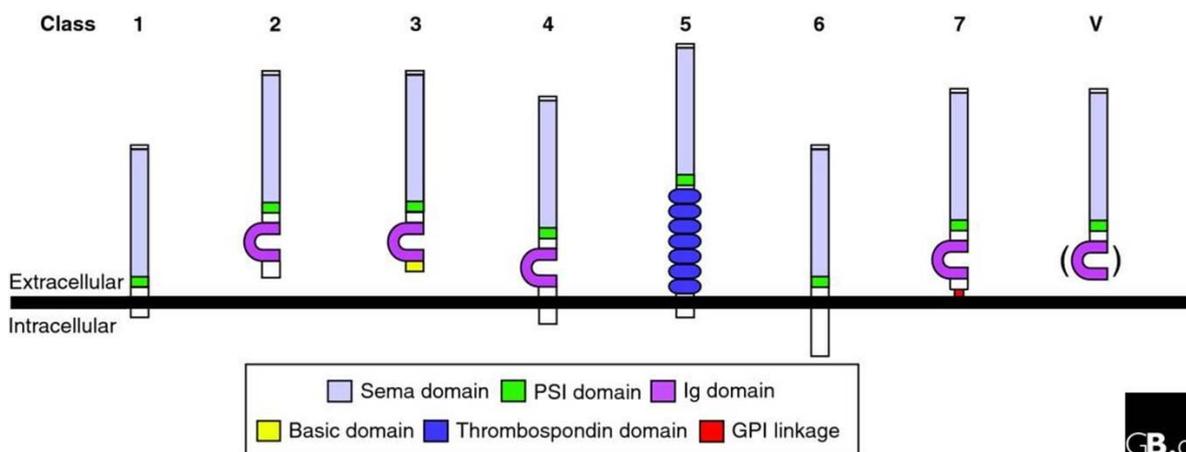


Figura 1 - Representação esquemática da família de proteínas Semaforina.

As 8 classes estão representadas conforme a topologia e domínios conservados na sequência proteica. As classes 1 e 2 são encontradas em invertebrados; classes 3 a 7 em vertebrados e classe V engloba semaforinas virais. As semaforinas 1, 4, 5 e 6 são proteínas transmembrânicas, as de classe 2, 3 e V são secretadas e as semaforinas de classe 7 podem ser ancoradas por GPI ou secretadas (FONTE: (YAZDANI; TERMAN, 2006).

A atuação como moléculas sinalizadoras, envolve a presença de receptores característicos que são as plexinas e neuropilinas. Nove tipos de plexinas já foram identificados e classificados em quatro classes distintas (classes A-D), sendo que sequências similares a plexinas também foram encontradas em *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans* (WINBERG et al., 1998; YOSHIDA, 2012). Plexinas são proteínas transmembrânicas cujo domínio extracelular é rico em cisteína e contém cerca de 500 aminoácidos correspondentes ao domínio semaforina (o qual se apresenta relacionado de forma distante ao domínio SEMA das semaforinas). A região citoplasmática contém uma sequência de aproximadamente 600 aminoácidos altamente conservada entre as diferentes plexinas; esta região pode estar associada a um domínio de ligação com a Rho GTPase (GOODMAN et al., 1999; ROHM et al., 2000; OSTER et al., 2003; HOTA; BUCK, 2012). Foi demonstrado que as plexinas possuem atividade GAP intrínseca, essencial para sua habilidade de induzir colapso do cone de crescimento e regular diretamente a atividade de pequenas GTPases, como Rnd1 e RhoD (ZANATA et al., 2002). Uma série de estudos indica que tal atividade é dependente da interação da plexina com a semaforina (HOTA; BUCK, 2012; JONGBLOETS; PASTERKAMP, 2014). As semaforinas de classe 3, que são secretadas, necessitam de neuropilinas (Nrp) para intermediar sua ligação com plexinas através da formação de um receptor heterodimérico (RAPER, 2000; JANSSEN et al., 2012).

2.3 Semaforinas transmembrânicas

Inicialmente, estudos envolvendo as semaforinas visavam investigar sua função como ligantes de plexinas. Sendo as plexinas receptoras, a sua ativação levava, na maioria das vezes, a um comportamento quimiorrepelente (HALLORAN; WOLMAN, 2006). Em 1996, Hall et al. identificou a função da Sema4D como acceptora de sinal. Esta semaforina transmembrânica mostrou-se envolvida na agregação celular de linfócitos B através de seu domínio citoplasmático ativando quinases (HALL et al., 1996). A partir da descrição da Sema4D, outros trabalhos seguiram essa linha de estudo considerando as semaforinas transmembrânicas como moléculas receptoras de sinal. Inagaki et al (2001), através o uso da técnica de duplo-híbrido, identificaram ligantes do domínio citoplasmático da Sema4C. A

interação com PSD-95, uma proteína que possui repetições de PDZ envolvidas na plasticidade de sinapses, foi confirmada (INAGAKI et al., 2001). A atuação da Sema 6D como transdutora de sinal de ligação da plexina A1 também foi investigada pela técnica de duplo-híbrido. A porção citoplasmática da Sema6D foi utilizada como isca e foi identificada uma interação específica com a quinase Abl (TOYOFUKU et al., 2004). Nesse trabalho foi também verificado que a interação Sema6D-Plexina A1 acarretou no aumento da proteólise do domínio extracelular da Sema6D, e que esta porção truncada possuía maior afinidade por Abl, sugerindo que a clivagem do domínio extracelular foi responsável pela ativação da transdução de sinal da semaforina. Finalmente, em drosófilas, a função da Sema1a como receptora foi identificada em prolongamentos dendríticos de neurônios envolvidos no sistema olfatório. Neste caso, as moléculas ligantes eram outras semaforinas, a Sema2a e Sema2b, que são secretadas (SWEENEY et al., 2011). Esse estudo evidenciou que a ligação de Sema2a ou 2b na Sema1a era capaz de direcionar os dendritos de neurônios projeccionais (PN, projectional neuron) para seus alvos específicos no lobo antenal.

Os trabalhos supracitados demonstram que as semaforinas transmembrânicas também podem atuar como proteínas receptoras. As semaforinas de classe 5, representadas por seus dois membros principais a Semaforina 5A e a menos estudada Semaforina 5B, apresentam um domínio transmembrânico, o que sugere a participação destas como receptoras capazes de transduzir sinais a partir de seus domínios citoplasmáticos. Como será visto a seguir, a literatura dispõe de poucos trabalhos acerca das semaforinas de classe 5, abordando a função destas semaforinas como ligantes e, portanto focaram-se no domínio extracelular destas moléculas. Um dos objetivos do presente trabalho foi a identificação e caracterização de interações realizadas pelo domínio citoplasmático da Semaforina 5B. O estudo dessas interações poderá ajudar a desvendar o papel de Sema5B como uma molécula receptora, transdutora de sinal.

2.4 Semaforinas de Classe 5

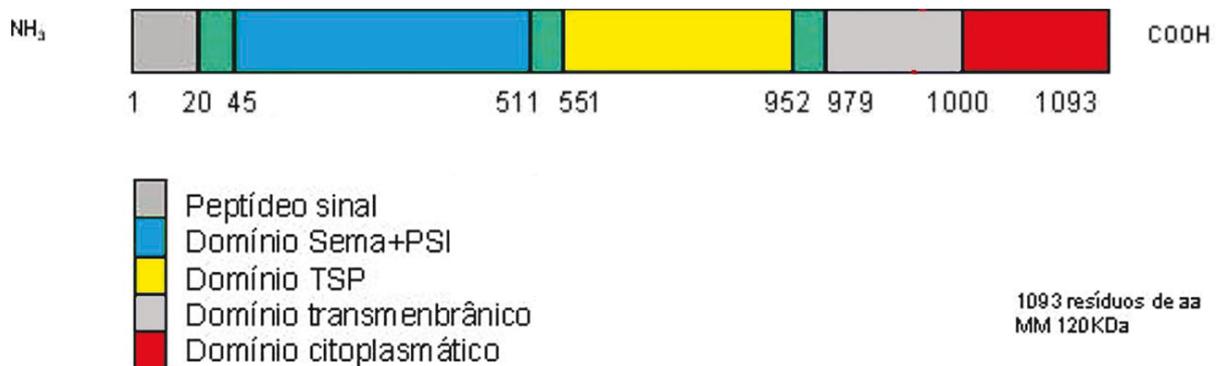
A nomenclatura para semaforinas foi revisada em 1999 a fim de se padronizar as diferentes denominações para as proteínas desta família. As semaforinas F e G

foram renomeadas para semaforinas 5A e 5B, respectivamente (GOODMAN et al., 1999).

As semaforinas 5A e 5B pertencem à classe 5 e foram identificadas em 1996, por ADAMS e colaboradores. Ambas são constituídas por uma região N-terminal extracelular com 485 aminoácidos, correspondente ao domínio Sema (também conhecido como domínio Sema+PSI, sendo PSI um peptídeo que possui sequência conservada em plexinas, semaforinas e integrinas), um domínio modular exclusiva da classe 5 com 408 resíduos que compõem sete repetições de uma sequência com alto grau de homologia às repetições encontradas em tromboespondinas 1 e 2 (TSP – type 1 repeat) (ADAMS; TUCKER, 2000), um único domínio hidrofóbico transmembrânico e uma região citoplasmática C-terminal com 80 (Sema5A) ou 93 aminoácidos (Sema5B) (**Fig. 2**). Esta última região configura o domínio com menor grau de similaridade entre Sema5A e 5B em comparação às demais regiões destas proteínas (ADAMS et al., 1996). A identidade das sequências de aminoácidos entre Sema 5A e 5B é de 58%, enquanto que a similaridade entre elas é de 72% (ADAMS et al., 1996).

A

SEMAFORINA 5B



B

Sequência de aminoácidos dos domínios citoplasmáticos:

Sema_5A: 993-1077

YTYCQRYQQQSHDATVIHPVSPAALNSSITNHINKLDKYDSVEAIKAFNKNNLILEERNKY
FNPHLTGKTYSNAYFTDLNNYDEY

Sema_5B: 1000-1093

SCQHCQRQSQUESTLVHPATPNHLHYKGGGTPKNEKYTPMEFKTLNKNLIPDDRANFY
PLQQTNVYTTTTYPSPLNKPSFRPEASPGQRCFPNS

Figura 2 - Representação da Sema5B e sequências dos domínios citoplasmáticos.

A) Representação esquemática da proteína Semaforina 5B. Esta proteína possui 1093 aminoácidos e massa molecular predita de 120 kDa. Sema5B é composta de um peptídeo sinal (1-20 aa), um domínio Sema + PSI (45-544 aa), 7 repetições do tipo tromboespondina 1 (TSP-1; 551-952 aa); um domínio transmembrânico composto de 20 resíduos de aminoácidos (979-999 aa) e uma região citoplasmática (1000-1093 aa). As regiões em verde não representam domínios funcionais conhecidos. **B)** Sequências de aminoácidos da região citoplasmática das Semaforinas 5A e 5B (Sema_5A e Sema_5B).

Sema5A e Sema5B são expressas tanto em tecidos embrionários como em adultos (ARTIGIANI et al., 2004; TAMAGNONE; COMOGLIO, 2004; O'CONNOR et al., 2009; LETT et al., 2009). O domínio caracterizado pela presença de repetições tipo tromboespondina (TSP), exclusivo das semaforinas de classe 5, possui atividade nos fenômenos de neuritogênese e quimioatração neuronal (ADAMS; TUCKER, 2000; HILARIO et al., 2009). Tromboespondinas constituem uma família de glicoproteínas extracelulares ligantes de cálcio. São abundantemente expressas na matriz extracelular embrionária. Várias proteínas compartilham as repetições do tipo tromboespondina-1 (TSP-1), sendo muitas destas expressas no sistema nervoso em desenvolvimento. O padrão de expressão e propriedades *in vitro* sugerem funções potenciais para TSP-1 na navegação axonal e migração do cone de crescimento. As repetições de TSP-1 têm sido implicadas na diferenciação, no

crescimento de neuritos, no desenvolvimento do sistema nervoso e em processos de regeneração e adesão neuronal (ADAMS; TUCKER, 2000).

É possível que as repetições TSP estejam relacionadas à associação de Sema5A com outras proteínas. Foi constatado que Sema5A liga-se a plexina 3B e que o domínio TSP é importante para essa interação (ARTIGIANI et al., 2004).

Kantor *et al* (2004) demonstraram a capacidade da Sema5A em desencadear respostas tanto atrativas quanto repulsivas no direcionamento de axônios do *fasciculus retroflexus* (FR), um feixe de nervos do diencéfalo associado a funções do sistema límbico. O diferente padrão de resposta foi relacionado à interação do domínio de repetições TSP da Sema5A com a porção glicosaminoglicana de dois tipos de proteoglicanos: os condroitin sulfato (CSPGs) e os heparan sulfato (HSPGs). A ligação da Sema5A com CSPG inibe a extensão de axônios FR, enquanto que a interação com HSPG resulta na atração axonal (KANTOR et al., 2004).

Em axônios do disco e do nervo ópticos, a Sema5A foi capaz de induzir o colapso dos cones de crescimento através de seu domínio SEMA. Demonstrou-se que o domínio TSP auxilia na propriedade quimiorrepelente. O colapso dos cones de crescimento expostos à Sema5A continuou mesmo na presença de moléculas atrativas e neuritogênicas, como laminina, L1 e netrina (OSTER et al., 2003).

A Sema5A parece desempenhar um papel fundamental no desenvolvimento embrionário, pois camundongos nocautes para Sema5A homozigotos morrem entre os dias embrionários E11.5 e E12.5 (FIORE et al., 2005). A análise desses animais revelou que a estrutura geral do sistema vascular, o desenvolvimento dos tecidos extraembrionários e o sistema nervoso apresentavam-se normais. Contudo, foi observada uma diminuição no número de vasos de grande diâmetro na região cranial de embriões E10.5. Esses vasos não apresentavam ramificações adicionais, tampouco organização e estruturação normal (FIORE et al., 2005). Tal fenótipo implica que Sema5A não está envolvida na diferenciação de vasos sanguíneos em geral, mas sim na padronização regional da vasculatura. Sua atuação pode estar vinculada à ação em células endoteliais e à inibição de apoptose, além de influenciar processos de remodelamento da matriz extracelular (SADANANDAM et al., 2010). Outra linhagem de camundongos nocautes para Sema5A foi desenvolvida e produziu animais viáveis. Já que estudos de associação genética identificaram o gene humano que codifica para Sema5A como sendo um gene de suscetibilidade ao

autismo (WEISS et al., 2009), Gunn et al. (2011) avaliaram se essa linhagem de animais nocautes viáveis poderia ser utilizada como um modelo animal para o autismo. Vários testes comportamentais foram utilizados e diferenças entre os animais nocautes e selvagens foram reportadas. Contudo, o estudo concluiu que tais camundongos não podem ser utilizados como um bom modelo para o estudo do autismo (GUNN et al., 2011). Mais recentemente, Duan e colaboradores (2014) demonstraram que camundongos *Sema5A*^{-/-} apresentam déficit de interação social, uma característica típica de pacientes autistas. Nesse mesmo trabalho verificou-se que as interações intra-dendríticas entre *Sema5A* e *PlexinaA2* inibem a formação de sinapses excitatórias em células granulares hipocâmpais, apoiando a ideia de que *Sema5A* contribui para as desordens do espectro autista (DUAN et al., 2014).

Outras funções não relacionadas ao sistema nervoso e à navegação axonal também foram atribuídas à *Sema5A*, tais como envolvimento em câncer (revisado em (PUROHIT et al., 2014) e participação em mecanismos do sistema imune (GRAS et al., 2014).

Quanto à *Sema5B*, sua atuação ocorre na formação do córtex cerebral, no desenvolvimento da rede neural. Essa ação pode ser comparada à de uma molécula “encapsuladora” de axônios, evitando a formação de sinapses para fora do córtex entre regiões distintas do cérebro em formação (LETT et al., 2009). Liu et al. (2014) mostraram que, na coluna espinhal, *Sema5B* mostra um padrão de ação tempo e concentração dependentes, inibindo a entrada de neurônios sensoriais até o E8. Ao mesmo tempo, a molécula não tem efeito sobre axônios de neurônios proprioceptivos. A atuação da *Sema5B* neste contexto pode ser dependente do receptor TAG-1. *Sema5B* neste tecido é essencial para que os diferentes axônios que entram na massa cinzenta da coluna espinhal por diferentes vias (gânglios da raiz dorsal, raiz ventral) sejam encaminhados para a correta ligação dos neurônios já existentes nesta estrutura, e que a partir daí desempenhem uma navegação tridimensional que formará todo o circuito nervoso periférico, incluindo o arco reflexo, neurônios nociceptivos e proprioceptivos e neurônios motores (LIU et al., 2014).

To et al. 2007, estudaram o papel da *Sema5B* como quimiorrepelente, induzindo o colapso de cones de crescimento em gânglios da raiz dorsal de galinha (DRG) através do influxo de Ca^{+2} extracelular. Os resultados indicam que a resposta é dependente de cascatas de sinalização da fosfatase calcineurina e da protease calpaína (TO et al., 2007). Outro trabalho, indicou que a *Sema5B* pode sofrer um

processamento proteolítico, fazendo com que a sua porção Sema passe a se comportar como uma molécula secretada dentro do hipocampo de neonatos. Esta porção mantém sua função biológica atuando na inibição de formação de sinapses (O'CONNOR et al., 2009; BROWNE et al., 2012).

Fora do contexto de navegação axonal, a semaforina 5B aparece envolvida em processos de remodelamento dentário, onde fibroblastos isolados da gengiva originados da crista neural apresentam uma expressão aumentada em comparação à média do tecido (SPENCER; LALLIER, 2009).

O trabalho de Matsuoka et al. (2011) investigou o papel de ambas as semaforinas de classe 5, Sema5A e Sema5B, na retina. Demonstrou-se que a ação destas foi relacionada à correta inibição de prolongamentos axonais de diferentes tipos de neurônios presentes na retina de camundongos, como terminais axonais de fotorreceptores, células amácrinas dopaminérgicas (ambas suscetíveis apenas à Sema5B) e células amácrinas colinérgicas. A posição de núcleos celulares também foi prejudicada em animais nocaute para ambas as semaforinas, mostrando o papel delas na laminação da retina. A técnica para nocaute dos genes teve como alvo os exons responsáveis pela expressão dos primeiros 41 e 51 aminoácidos da Sema 5A e 5B, respectivamente, correspondentes ao peptídeo sinal. Esta estratégia gerou animais viáveis e férteis, diferente de outras tentativas de nocaute para estas proteínas. Porém, a má formação das camadas plexiformes na retina geraram animais com visão prejudicada (MATSUOKA et al., 2011).

Ainda quanto à classe 5 das semaforinas, deve-se ressaltar que esta é a única que possui representantes tanto em vertebrados (Sema5A e Sema5B), como em invertebrados. Nesses últimos, Sema-5c foi identificada em *Drosophila melanogaster* envolvida no sistema olfatório, modificando comportamentos olfativos na vida adulta (ROLLMANN et al., 2007).

2.5 Resultados Anteriores

Durante o meu mestrado, desenvolvi um projeto que iniciou a busca por ligantes de semaforinas de classe 5 através do sistema de duplo-híbrido em leveduras (FÁVARO Jr., 2011). Assim, primeiramente, houve a necessidade de se padronizar essa metodologia no Laboratório de Neurobiologia (Patologia Básica,

UFPR). Iscas correspondentes aos domínios citoplasmáticos de Sema5A e Sema5B foram construídas e avaliadas quanto ao seu potencial de auto-ativação de genes repórteres (indicadores de interações no sistema de duplo-híbrido). Somente a isca para Sema5B pôde ser utilizada posteriormente (FAVARO, 2011).

Através da varredura da biblioteca de cDNA de epitélio olfatório (construída durante o pós-doutorado da orientadora do trabalho em questão) com a isca correspondente ao domínio citoplasmático de Sema5B, foi possível a obtenção de cerca de 10.000 clones positivos para interação (pela análise de um gene repórter, *LEU2*). Destes, 159 clones foram usados para os testes posteriores, necessários para a confirmação de ligantes do sistema de duplo-híbrido. Ao final dos testes, foi possível obter as sequências de 9 insertos de ligantes putativos. Três candidatos apresentaram insertos com a correta fase aberta de leitura para proteínas que podem ser reais parceiros moleculares de Sema5B: Cript, que será discutida ao longo deste trabalho, Scramblase 2, uma proteína envolvida na perda de assimetria de fosfolipídeos de membrana e Trappc6a, uma proteína com pouca informação na literatura.

Como um desdobramento do mestrado e para dar continuidade a esse trabalho, a proposta do doutorado foi testar novos clones positivos obtidos na varredura e aumentar a relação de ligantes candidatos para Sema5B, complementando os dados obtidos anteriormente. Como será visto, uma lista de novos ligantes inéditos para Sema5B foi obtida no presente trabalho. Cinco desses ligantes, envolvidos nos mecanismos de sumoilação e ubiquitinação, foram escolhidos para uma caracterização mais aprofundada das interações com o domínio citoplasmático de Sema5B.

3 Objetivos Gerais

Identificar ligantes para o domínio citoplasmático de Sema5B e construir vetores de expressão em células de mamíferos para confirmação das interações dos ligantes com a porção citoplasmática da Semaforina5B.

3.1 Objetivos Específicos

- a) Sequenciamento e identificação dos ligantes obtidos em varredura anterior;
- b) Avaliação de potencial de auto ativação dos ligantes para confirmação das interações, dentro do sistema de duplo-híbrido;
- c) Construção de vetores para expressão de Sema5B em células de mamíferos;
- d) Construção de vetores de ligantes selecionados (Cript, Usp33, Uba2, Mib2 e Stub1) para expressão em células de mamíferos;
- e) Confirmação das interações entre Sema5B e os ligantes Cript, Usp33, Uba2 e Stub1 através de ensaios de ligação *in vitro* (*pull-down*).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Validação de ligantes de Sema-cito5B obtidos por duplo-híbrido

Os ligantes obtidos na varredura foram identificados e validados quanto ao seu potencial de autoativação.

4.1.1 Seleção de Colônias Candidatas

A partir da varredura da biblioteca de epitélio olfatório de camundongo, as novas colônias foram repicadas em placa “master plate” SD Gal -His -Trp -Ura (+Leu), e incubadas a 30°C por dois dias. A “master plate” serve como molde para “carimbar” outras quatro placas:

- SD Gli -His -Trp -Ura -Leu;
- SD Gli X-Gal -His -Trp -Ura (+Leu);
- SD Gal -His -Trp -Ura -Leu;
- SD Gal X-Gal -His -Trp -Ura (+Leu).

O carimbo é obtido pressionando-se a placa “master” sobre um pedaço de veludo estéril apoiado sobre um disco rígido de ~9cm. Em seguida, as outras placas foram pressionadas uma a uma sobre esse tecido. Após incubação na estufa a 30°C, as placas são acompanhadas a cada 24h até 96h (4 dias). A seleção de colônias deve seguir os critérios apresentados no **quadro 1**.

Placa	Característica
SD Gli -His -Trp -Ura -Leu	Ausência ou pouco crescimento
SD Gli X-Gal -His -Trp -Ura (+Leu)	Coloração branca até 72H
SD Gal -His -Trp -Ura -Leu	Crescimento
SD Gal X-Gal -His -Trp -Ura (+Leu)	Coloração azul

Quadro 1 - Relação das características das colônias positivas para seleção. Estas características ocorrem devido à atuação de 2 repórteres. A indução ocorre por galactose, expressando as proteínas de fusão Isca + Lex-A (BD) e Biblioteca + B42 (AD). A aproximação dos domínios BD e AD por interação entre isca + biblioteca induz a expressão do gene LacZ, provocando a cor azulada em meio enriquecido com X-Gal, e do gene LEU2, permitindo a sobrevivência da colônia em meio sem leucina.

4.1.2 Extração e confirmação do plasmídeo da biblioteca

As colônias selecionadas foram submetidas à extração de DNA plasmidial. O método utilizado foi adaptado do manual do usuário da ORIGENE, 2008 que deriva do método de lise alcalina (BIMBOIM, 1979), utilizando esferas (*beads*) de vidro lavadas em ácido para romper a parede celular das leveduras sem a necessidade de utilizar enzimas. *Beads* de ~2mm de diâmetro são colocadas em tubos cônicos de 15 ml. Foi adicionado HCl 5,8 M em um volume 3x maior que o ocupado pelas *beads* e incubadas por 1 hora. O ácido foi removido e as *beads* foram lavadas 10x com água destilada, adicionando-se 3x o volume de *beads* de água, agitando e descartando-a. Após as lavagens, toda a água foi retirada, as *beads* foram autoclavadas por 20 minutos e em seguida secas em estufa de secagem a 65°C durante a noite. Após a preparação das esferas, cada colônia positiva foi plaqueada em 3 mm² de meio SD-Gli –His –Ura –Trp e incubada a 30°C por 3 dias. Toda a biomassa formada foi raspada e inoculada em 2 ml de meio SD Glicose –His –Ura –Trp a 30°C com agitação por 16-18 horas. As colônias foram sedimentadas por centrifugação a 1.500 xg por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e o precipitado ressuspensão no volume residual, tendo sido em seguida transferido para um tubo de 1,5 ml. Foram adicionados 200 µl da solução *plasmid rescue* (Triton X-100 2%; SDS 1%; NaCl 0,1 M; Tris pH8 10 mM; EDTA 1 mM). Em seguida foram adicionados 100 µl de fenol saturado pH8,0 e 100 µl de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Foram adicionados então 300 mg dos *beads* lavados em cada lise. Os tubos foram agitados a baixa velocidade por 4 minutos e em seguida centrifugados a 10.000 xg por 5 minutos. Em um novo tubo de 1,5 ml, 200 µl do sobrenadante foram transferidos, então, lisado, foram adicionados 20 µl de acetato de sódio 3 M autoclavado. O tubo foi vigorosamente agitado e em seguida adicionaram-se 400 µl de etanol 95% (Merck®) e foi novamente agitado. O tubo então foi centrifugado a 10.000 xg por 20 minutos a 20°C. O sobrenadante foi descartado e as paredes do tubo lavadas com etanol 70% (Merck®) gelado. O sobrenadante foi removido e o precipitado resultante foi seco em uma estufa a 37°C por 15 minutos. A parede do tubo foi lavada e o precipitado ressuspensão com 5 µl de água pura.

O produto da lise foi então submetido a uma PCR para verificação da presença da banda correspondente ao pJG4-5 + inserto.

Inicialmente foram usados 0,7 µl do precipitado como molde em uma reação de PCR contendo tampão ótimo para Taq 1x, 2 mM MgCl₂, 1,6 mM dNTP, 0,24 µM de iniciadores, 0,6 U Taq DNA polimerase em uma reação com 25 µl de volume final. Posteriormente, todos os plasmídeos precipitados foram quantificados através do NanoDrop 1000™ – Thermo Scientific®.

Os iniciadores utilizados flanqueiam a região de policlonagem do plasmídeo pJG4-5.

Iniciadores:

- Iniciador *forward* para o plasmídeo pJG4-5 que anela a 42bp da região de clonagem; Tm: 62°C, CG: 61%, 18mer.
5' CTG AGT GGA GAT GCC TCC 3'
- Iniciador *reverse* para o plasmídeo pJG4-5 que anela a 62bp da região policlonal; Tm: 57°C, CG:53%, 17mer.
5' GCC GAC AAC CTT GAT TG 3'

A reação foi realizada a:

95°C – 2min; 30 ciclos de 95°C – 40s, 57°C – 30s, 72°C – 2min e uma extensão final a 72°C – 7min.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% para avaliação e posteriormente serviram como molde em uma reação de sequenciamento.

Paralelamente os plasmídeos foram eletroporados em bactérias eletrocompetentes DH5α [F– Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK–, mK+) phoA supE44 λ– thi-1 gyrA96 relA1]. Brevemente, 10ng de cada plasmídeo precipitado foram adicionados a 40 µl da bactéria, homogeneizados e colocados em uma cubeta de eletroporação de 1mm (Gene Pulser®/MicroPulser™ - BioRad®). O eletroporador modelo Gene Pulser XCell™ – BioRad® foi utilizado submetendo a cubeta a uma diferença de potencial de 1,40 kV por até 5ms. Após a recuperação por 1 hora em 1ml de meio LB (10g/l de triptona; 5g/l de extrato de levedura; 10g/l de NaCl), no agitador orbital (Certomat BS-1 P™. - Braun®) a 37°C 250rpm foram estricadas em placas de LB + agar com 17g/l de agar adicionado de ampicilina a 100µg/ml (placa LB + Amp), inicialmente 100µl foram esgotados com o auxílio da alça de Drigalsky, então o restante foi transferido para um tubo de 1,5ml e

centrifugado a 3.500rpm por 2min em uma centrífuga Mini Spin™ da Eppendorf®. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em aproximadamente 100µl de LB e foram esgotados em outra placa LB + Amp. As placas ficaram por não mais que 16 horas em estufa a 37°C. Para obtenção de uma colônia de bactéria contendo o plasmídeo da biblioteca, foi necessário selecionar 6 colônias de cada transformação para realização de PCR de colônia. A seleção deve conter ao menos 3 colônias de bactérias para que ao menos uma delas contenha o plasmídeo pJG4-5, uma vez que a levedura lisada possuía 3 plasmídeos em seu citoplasma: pGILDA (isca); pSH18-34 (repórter) e pJG4-5 (biblioteca), todos contendo o gene de resistência para ampicilina.

As colônias selecionadas foram repicadas em “master plate” e inoculadas em um tubo de reação para PCR de 0,2ml servindo como molde para reação. Em um volume final de 15µl foi adicionado: Tampão *Taq* 1x, dNTP 0,2mM; MgCl₂ 1,33mM; 2pmol de Primer para pJG4-5 e 0,3U de *Taq*. DNA polimerase. A reação foi submetida a 95°C – 10min; e 35 ciclos de 95°C – 40s; 49°C - 50s; 72°C – 1min e 10s; finalizando com uma extensão a 72°C por 7min.

Após corrida eletroforética, as colônias que apresentaram banda na altura esperada para o plasmídeo pGJ-45 mais um inserto foram selecionadas e submetidas à preparação de plasmídeos (mini-prep) que foram usados em transformações de leveduras para os testes do duplo-híbrido.

4.1.3 Confirmação da identidade dos ligantes

A partir do produto de PCR em leveduras ou da preparação de plasmídeos, foram realizadas reações de sequenciamento de nucleotídeos para identificação do ligante presente no plasmídeo pJG-45. Como segue:

- 1µl BigDye; 1,5µl tampão BD 5x; 5pmol iniciador; 300ng dsDNA (molde); em um volume final de 10µl.

Tanto o iniciador *forward* como o iniciador *reverse* para pJG4-5 foram utilizados. A reação foi submetida a 96°C por 2min e 35 ciclos de 96°C 15s, 48°C 15s, 60°C 4min.

Após a reação, as amostras foram precipitadas adicionando-se 0,1V (V= volume final da reação de sequenciamento) de acetato de sódio 1,5M/ EDTA 0,25M e 3V de etanol 100% (Merck®), a reação foi então transferida para um tubo de 1,5ml

e homogeneizada gentilmente. Os tubos foram mantidos no gelo por 10 minutos e então centrifugados por 20 minutos a 20.000xg a 4°C. O sobrenadante foi descartado, foram adicionados 15µl de etanol 70% gelado (Merck®) e novamente centrifugados. O sobrenadante foi descartado e o tubo seco em estufa a 37°C por uma hora. As reações foram mantidas a -20°C até serem aplicadas no sequenciador. Dez microlitros de Hi-Di™formamida foram adicionados às amostras, que foram então incubadas por 5 minutos a 95°C e colocadas no gelo, logo antes da corrida. Foram utilizados os sequenciadores Applied Biosystems® ABI 3500 e 3130 e o eletroferograma resultante foi visualizado no BioEdit® v.7.0.9.0.

4.1.4 Avaliação do potencial de autoativação dos ligantes por ensaio de mating cruzado (KOLONIN et al., 2000)

Foram selecionados os plasmídeos que apresentaram a sequência de cDNA referente a proteínas ou fragmentos de proteínas conhecidas em fase aberta de leitura mediante consulta à base de dados. Os plasmídeos pJG-45 contendo as sequências codificantes para os ligantes encontrados foram novamente transformados em leveduras EGY48 de acordo com o método a seguir.

Várias colônias EGY48 foram inoculadas em um pré-inóculo de 25 ml de YPD. Essa cultura foi incubada em um agitador a 30°C e 240 rpm até atingir uma $DO_{600} \sim 0,8$, então foi transferida para um inóculo de 200 ml (meio YPD) e incubadas novamente sob agitação por 3 horas, a 30°C. A cultura foi precipitada a 2.500rpm por 5min à temperatura ambiente. O meio foi descartado e o precipitado foi lavado e centrifugado em água ultrapura estéril com o mesmo volume de meio.

O sobrenadante foi removido e o precipitado foi ressuspenso e lavado em 50 ml de acetato de lítio (LiAc) 0,1M juntando-se as suspensões em um só tubo. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e o precipitado foi ressuspenso em LiAc 0,1M até um volume final de 1 mL. A suspensão de células (500 µL) foi misturada com a solução TRAF0 (0,750 µL de LiAc 1M; 4 mg de ssDNA; H₂O q.s.p. 2,5 mL). Desta mistura, foram usados 50 µL por transformação. Para cada transformação, aproximadamente 100 ng de plasmídeo foram adicionados, os tubos foram agitados por 2min, então acrescentou-se 100µL de 50% PEG 3350.

Os tubos foram incubados a 42°C por 40min a 200rpm, logo em seguida as leveduras foram sedimentadas a 2.500rpm por 5min. Finalmente o precipitado foi

ressuspenso em 100µl de água ultrapura estéril e o volume final foi plaqueado (sem diluir ou na diluição de 1:100) em meio seletivo SD Glicose –Trp. Após 2-4 dias as colônias foram repicadas em uma “master-plate”. A partir desta placa, as leveduras EGY 48 transformadas foram plaqueadas lado a lado em meio seletivo de modo que cada ligante formava uma linha; a levedura contendo o plasmídeo controle pBait (Origen®) que expressa uma proteína em fusão com BD (Lex-A) também foi inoculada na placa. Em outra placa, leveduras RFY contendo pGi_5B, pGilda vazio e pTarget (plasmídeo controle que expressa uma proteína em fusão com AD que possui afinidade pela proteína expressa pelo pBait) foram também plaqueadas em linha. Após o crescimento nestas placas, elas foram carimbadas em uma placa YPD de maneira que todas as linhas de uma placa interceptem a da outra placa. Após 24 horas, as leveduras realizaram o “*matting*” e então esta placa foi carimbada nas mesmas placas controle do cruzamento (**Quadro 1**). É de se esperar a confirmação da interação nos pontos de intersecção dos ligantes com a pGi_5B, e a ausência dos mesmos sinais nos outros pontos de intersecção, exceto o do controle positivo (pBait + pTarget).

4.2 Construção de plasmídeos para obtenção de proteínas para semaforinas e seus ligantes

Vetores contendo sequências codificantes para Sema5B e alguns de seus ligantes foram produzidos. Outro vetor já existente contendo a sequência codificante para Sema-Cito5B foi utilizado para obtenção da proteína contendo uma cauda de 6 repetições de histidina.

4.2.1 Expressão heteróloga e purificação de Sema-cito5B em bactérias

A expressão em bactérias para a porção citoplasmática de Semaforina 5B (Sema-cito5B) resultou na proteína precipitada ou fortemente aderida à coluna de purificação de Ni-NTA.

A construção utilizada (pETcito5B) foi desenvolvida por Jaqueline A. M. Trentin do Laboratório de Neurobiologia da UFPR (TRENTIN, 2008). Após eletroporação em bactérias BL21 (DE3) pLysS foi realizada uma mini expressão com 5 colônias com 0,35mM de IPTG. Após a escolha da colônia que melhor expressava

a proteína, foi realizada uma expressão em larga escala com 500ml de LB +Kan (15µg/ml) por 2 horas a 28°C. As bactérias foram lisadas com um tampão de lise desnaturante (50mM Tris.HCl pH7,8; 300mM NaCl; 6M Ureia; 1mM PMSF) na French press - AMINCO®. Após centrifugação o sobrenadante foi filtrado (0,45µm) e 2,5ml foram incubados em 300µl de resina Ni-NTA – Quiagen® por 16 horas. O Void foi removido por centrifugação e a resina lavada com tampão de lavagem (50mM Tris.HCl pH7,8; 500mM NaCl; 6M Ureia; 1mM PMSF; 35mM Imidazol), foi montado um Gradiente Maker - BRL® para retirada da Uréia usando um volume de 60ml indo de 6M a ~0M de Uréia. Todas as etapas foram coletadas e aplicadas em um gel de acrilamida 18% para SDS-PAGE redutor.

Para uso nos ensaios de *pull-down* (item 3.3.2), a resina foi lavada em tampão de lise (50mM Tris.HCl pH7,4; 0,2% deoxicolato de sódio; 0,5% Triton x-100; 1mM PMSF) contendo 35mM de Imidazol.

4.2.2 Estratégia para expressão de proteínas em células de mamíferos

Foram escolhidos os vetores pCDNA 3.1- (Invitrogen®) e pEGFP (Clontech®) para clonar, em diferentes conformações, tanto os ligantes como as diferentes construções da Sema5B. Estes plasmídeos apresentam genes de seleção em bactérias para ampicilina e canamicina, respectivamente; origem de replicação para bactérias e para células eucariontes; e pSV40, um receptor de antígeno T de SV40 expresso pela linhagem T de HEK293 (HEK293T) que confere uma replicação epissomal do plasmídeo garantido uma maior expressão de proteínas das suas sequências clonadas. Além disso, modificações foram feitas para que as construções expressassem etiquetas em fusão com a proteína de interesse. Para os ligantes, uma etiqueta Myc foi adicionada à porção N terminal da proteína de fusão (mantendo a porção C terminal livre para interação com a Sema), assim como uma etiqueta de EGFP para a Sema-cito5B. Uma etiqueta com 6 repetições de histidina (His Tag) foi adicionada à porção C terminal de Sema-cito5B e Sema5B. As etiquetas são facilmente reconhecidas com anticorpos comerciais, isso permite a fácil identificação dos ligantes em ensaios de Western-blot, o qual será abordado adiante. A His tag permite a purificação de proteínas em colunas de metal imobilizado enquanto que a EGFP apresenta fluorescência permitindo ensaios de localização sem adição de outros componentes. As proteínas foram analisadas

utilizando a base de dados do Uniprot, levando em consideração, quando possível, a porção da proteína alvo identificada no duplo-híbrido. Todos os peptídeos encontrados estavam afastados da porção N-terminal das proteínas nativas e nenhuma possuía peptídeos sinal na porção N-terminal. A **Figura 3** resume os vetores construídos, bem como as proteínas que se pretende expressar.

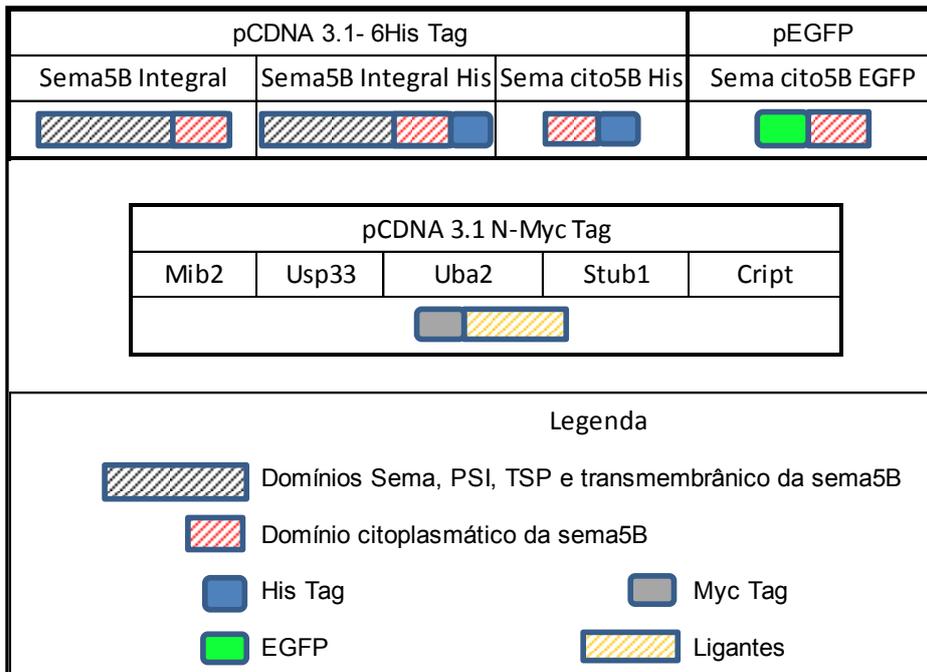


Figura 3 - Representação dos plasmídeos construídos.

Aqui são apresentados os plasmídeos que foram clonados com seus respectivos insertos e o resultado final pretendido para as proteínas expressas com ou sem etiquetas moleculares (*myc tag*, 6xHis e EGFP).

Brevemente, iniciadores para os peptídeos foram desenhados a partir dos dados obtidos no repositório *on-line* do NCBI (National Center for Biothechnologies Information) utilizando-se a ferramenta *on-line* Oligo Analyzer da IDT (Integrated DNA Technologies). Sítios de restrição foram adicionados aos iniciadores após verificação utilizando a ferramenta online NEBcutter V2.0, confirmando a ausência destes sítios nas proteínas desejadas.

Para PCR de larga escala dos ligantes, foi utilizado como molde da reação o cDNA de extrato de embriões de camundongo em E12, momento do desenvolvimento embrionário do camundongo que expressa grande quantidade de Sema5B.

Devido a dificuldades na obtenção de cDNA para a Sema5B integral, plasmídeos cedidos pelo Dr. Timothy P. O'Connor (University of British Columbia, Vancouver, Canada) foram utilizados. Após PCR de colônia, os insertos foram

clonados nos plasmídeos e verificados por sequenciamento de nucleotídeos de acordo com a técnica já descrita nos **Quadros 2 e 3**.

O plasmídeo pCDNA 3.1- 6His *Tag* foi contruído previamente em nosso laboratório com a colocação da His *Tag* entre os sítios de restrição BamHI e Asp718I (dados não publicados). O plasmídeo pCDNA3.1- N Myc *Tag* foi construído para este estudo.

Iniciador	Sequência	T _m (°C)	Enzima
SemaCito_pEGFP_FWD	CTAA <u>CTCGACT</u> TCT TGC CAG CAC TGC CAG	60,5	XhoI
SemaCito_pEGFP_RVS	CGA <u>GGA TCC TCA</u> ACT GTT GGG GAA ACA GCG	61,3	BamHI
SemaCito_pCDNAHis_FWD	CGAGA <u>ATTCACCATG</u> TCT TGC CAG CAC TGC CAG	60,5	EcoRI
SemaCito_pCDNAHis_RVS	CGC <u>GGA TCC</u> ACT GTT GGG GAA ACA GCGC	59,3	BamHI
Sema5Bintegral_FWD	CGAG <u>CTAGC ATG</u> GTA GTC CCA GGA CC	55	NheI
Sema5BintegralSTOP_RVS	CGG <u>CGGCCG</u> CACT GTT GGG GAA ACA GCG	55,9	NotI
Sema5BintegralHis_RVS	CGG <u>CGGCCG</u> <u>TCA</u> ACT GTT GGG GAA ACA GCC	55,7	NotI

Quadro 2 Iniciadores desenhados para as construções de Semaforina 5B. Iniciadores FWD e RVS para obtenção de insertos, sequência escrita no sentido 5'-3' com o sítio de restrição sublinhado, Temperatura de melting e sítio de restrição presente.

Iniciador	Sequência	T _m (°C)	Enzima
Mib_FWD	CTAA <u>CTCGAG</u> ATG <u>GAC</u> CTG GAC CCC C	57,9	XhoI
Mib_internoFWD	ATG GCA GAG CAC AAC AG	55	
Mib_RVS	C TGC GGC CGC <u>TCA</u> CAC GAA GAT CTG AAT GC	56,1	NotI
Usp33_FWD	CT <u>TCT AGA ATG</u> ACG ACT TTT CGA AAT CAT TGT CC	60,7	XbaI
Usp33_internoFWD	CAA ACA CTA ACT TCT GAG G	51,2	
Usp33_RVS	CTGCGGCCGC <u>CTA</u> CAA AGA GCG AGT TTC TAC TTC AAT C	60,5	NotI
Uba2_FWD	CT <u>TCT AGA ATG</u> GCA CTG TCG CGG	56,7	XbaI
Uba2_RVS	CT ACA <u>GAA TTC TCA</u> GTC TAA CGC TAT GAC G	54,4	EcoRI
Stub1_FWD	GCG <u>TCT AGA ATG</u> AAG GGC AAG GAG GAA AAG	58,7	XbaI
Stub1_RVS	ATAA <u>CTC GAG TCA</u> ATA GTC CTC TAC CCA GCC	58,8	XhoI

Quadro 3 Iniciadores desenhados para as construções e sequenciamento dos ligantes. Iniciadores FWD (*Forward*) e RVS (*Reverse*) para obtenção de insertos e iniciadores internos para

sequenciamento. Sequências encontram-se no sentido 5'-3', com o sítio de restrição sublinhado. T_m (temperatura de *melting*).

4.2.3 Montagem do vetor pCDNA 3.1- N Myc

A sequência referência da etiqueta Myc tag foi obtida do plasmídeo pCDNA3.1- Myc/His da Invitrogen[®]. A etiqueta foi desenhada adicionando-se sítios para enzimas de restrição NheI a 3' e XbaI a 5' formando as pontas coesivas, sequência consenso de Kozak ANNATGG e códon de iniciação. Tanto a fita molde como a complementar foram sintetizadas integralmente (IDT- Integrated DNA Technologies). Ambas as fitas foram misturadas em uma razão de 1:1 a partir de soluções a 100µM. A mistura foi aquecida a 70°C por 5 minutos e mantida a temperatura ambiente por 20 minutos. As fitas complementares formam DNA dupla fita em uma solução a 50µM. Antes da clonagem, as terminações 5' da Myc tag foram fosforiladas com a enzima T4 DNA kinase da Fermentas[®]: 50pmol do Myc tag foram adicionados a 2µl de Buffer A, 20µmol de ATP de sódio e 10u de T4 PNK em um volume final de 20µl. A reação foi incubada a 37°C por 20 minutos e inativada a 75°C por 10 minutos.

O plasmídeo pCDNA3.1(-) foi digerido com as enzimas NheI e XbaI (Fermentas[®]) em uma reação de 16-18 horas. Então a reação foi submetida a uma separação eletroforética em gel com 0,8% de agarose. A banda correspondente ao plasmídeo digerido foi extraída do gel e o plasmídeo submetido à desfosforilação. Foi utilizada a enzima CIAP (Fermentas[®]): 0,2U da CIAP foi pré-diluída em tampão CIAP 1x e água. Em seguida, 700ng do plasmídeo purificado foram misturados com tampão 1x, aquecidos a 60°C e rapidamente resfriada a 4°C para desfazer as pontes de hidrogênio das pontas coesivas e esticar o DNA, então 1 µl da CIAP foi adicionado. A reação foi incubada a 37°C por 30 minutos. Foram adicionados mais 2 µl da enzima diluída e o volume final foi novamente incubado por mais 30 minutos até sua inativação a 85°C por 15 minutos. O plasmídeo foi purificado em uma separação orgânica seguida de precipitação para que o EDTA do tampão não atrapalhasse as próximas reações. À reação inativada adicionou-se o mesmo volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e a mistura foi vigorosamente agitada e centrifugada a 14.000 xg por 5 minutos à temperatura ambiente. A porção aquosa foi transferida para um novo tubo ao qual adicionou-se 0,1 volumes de acetato de sódio 3M. A solução foi misturada e logo em seguida foram adicionados

2,5 volumes de etanol 100%. A solução foi centrifugada a 14.000g por 5 minutos a temperatura ambiente.

A ligação entre a etiqueta Myc e o plasmídeo foi realizada em duas reações distintas, uma equimolar e outra 1:5 (plasmídeo: inserto) conforme preconizado por Revie et al. (1988) e Sambrook et al. (2001). Ambas as ligações utilizaram 50ng de plasmídeo, 10 U de T4 DNA ligase (New England Biolabs®) e tampão 1x em um volume final de 5µl. As reações foram incubadas a 16°C por 16 horas e mantidas em temperatura ambiente por aproximadamente 2 horas. As ligações foram transformadas em bactérias como descrito anteriormente.

4.2.4 Construção dos plasmídeos para expressão em células de mamíferos

A clonagem dos ligantes de Sema-Cito5B foi feita no plasmídeo pCDNA 3.1 - N Myc após digestão dupla. Foram seguidas as indicações do fabricante das enzimas (antiga Fermentas, atual ThermoScientific) para o protocolo de digestão, e posterior protocolo de ligação seguindo a proporção de 1:5 (plasmídeo: inserto), conforme protocolo já descrito.

4.2.5 Transfecção em HEK293

Os plasmídeos construídos, após serem submetidos à verificação do posicionamento na correta fase de leitura após sequenciamento, foram transfectados em células HEK293T (uma linhagem proveniente de rim de embrião humano) pelo método de precipitação por fosfato de cálcio. Placas p100 foram inoculadas com aproximadamente 4×10^6 células um dia antes da transfecção. Após 24 horas na estufa 37°C com 5% CO₂, foi preparada a solução de transfecção, uma por plasmídeo, da seguinte maneira: em um tubo de 15 ml foram adicionados 750 µl de água MiliQ autoclavada, 12 µg de DNA foram depositados com cuidado sobre a superfície da água, foram adicionados ainda 250 µl de cloreto de cálcio 1M, 1 ml de BBS (50mM BES, 280mM NaCl, 1,5mM Na₂ HPO₄) foi jateado fortemente no tubo (deslocamento rápido do embolo da pipeta até o final do curso), e foi feita uma pausa de 5 minutos.

A esta solução, foram adicionados outros 8ml de meio MEM e o volume final foi colocado sobre a monocamada de células previamente lavadas com PBS.

Após 5 horas na estufa a 37°C o meio de transfecção foi removido, e foram adicionados outros 8 ml de MEM e 10% de soro fetal bovino (SFB) sem que a placa fosse lavada. Após 24 horas, a monocamada foi observada em um microscópio invertido para determinar a viabilidade celular e, quando possível, a taxa de transfecção por fluorescência (expressão de EGFP).

4.3 Ensaios de *pull-down*

4.3.1 Extrato de células HEK293T

Foram produzidos extratos das células transfectadas visando a obtenção de proteínas solúveis em condições fisiológicas para o estudo da interação das proteínas, possibilitando a realização dos testes. Para obtenção do extrato, uma ou duas placas (sendo uma placa para extrações utilizadas à fresco e duas para armazenamento de uma quantidade maior de proteínas) de cada transformação foi mantida em incubadora de CO₂ 5% a 37°C por 12, 24 ou 48 horas. Após o período de incubação, o meio de cultivo foi removido e a camada de células foi cuidadosamente lavada com PBS 1x gelado. Após a lavagem, as células foram soltas da placa com o auxílio de 1 ml de PBS e raspadas com o uso de um *cell scraper*. As células foram sedimentadas por centrifugação (1.000 xg por 5' a 4°C), o sobrenadante foi removido e foram adicionados cerca de 200 µl de tampão de lise (50mM Tris.HCl pH7,4; 0,2% deoxicolato de sódio; 0,5% Triton x-100; 1mM PMSF). A lise foi feita durante 30 minutos, no gelo e, para aumentar sua eficiência, o extrato foi passado em uma agulha acoplada em uma seringa de 1 mL a cada 10 minutos. O homogenato foi então centrifugado a 5.000xg a 4°C por 5' e o sobrenadante armazenado a -20C para uso posterior.

4.3.2 *Pull Down*

Os extratos celulares foram obtidos em 12, 24 ou 48 horas após a transfecção. Para os ensaios de *pull-down*, 30µl da resina Ni-NTA – Quiagen® foi previamente equilibrada com tampão de lise (50mM Tris-HCl pH7,4; 0,2% deoxicolato de sódio; 0,5% Triton X-100, 40mM imidazol), em seguida, ~300µg do extrato total das células transfectadas com a construção Sema5B His foram

incubadas a 4°C por 16 horas. Após a incubação, uma sequência de cinco lavagens com o tampão foi realizada.

Em outro experimento, 200 µg do extrato de bactérias expressando a Sema-Cito5B-His também foram utilizados, sendo submetidos aos mesmos passos descritos acima.

À resina lavada, ~250 µg dos extratos totais expressando cada ligante (Uba2, Usp33, Stub1 e Cript) foram adicionados, juntamente com 600 µl de tampão de lise e o volume final foi incubado por 3h a 4°C. Paralelamente, como controle negativo, ~250µg dos extratos totais expressando cada ligante (Uba2, Stub1, Usp33 e Cript) foram incubados em 30ul de Ni-NTA vazia equilibrada com tampão de lise por 3h a 4°C. Após 5 lavagens com tampão de lise, as amostras ligadas na resina foram eluídas através da adição de 30 µl de tampão de corrida redutor e fervura. Foram então aplicadas em gel de acrilamida para SDS-PAGE (8% para Uba2 e Usp33 e 15% para Stub1 e Cript) (35mA até a saída da frente de migração).

Após separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose por indução elétrica (100V, uma hora) e submetidas à técnica de Western-blot para detecção de proteínas.

O anticorpo monoclonal anti-penta his (Sigma[®]) foi utilizado para detectar a Sema5B-His e Sema-Cito5B (procarionte) em uma diluição de 1:1000; o anticorpo monoclonal anti- c-Myc (sc-40, Santa Cruz[®]) foi utilizado para detectar os ligantes expressos (diluição 1:800). Ambos foram detectados incubando-se a membrana com o anti-IgG de camundongo conjugado com HRP (Sigma[®]), 1:4000. As membranas foram reveladas com substrato quimioluminescente Westar Supernova[™] da Cyanagen[®] por 10 minutos em filme radiográfico da Kodak[®].

5 RESULTADOS

5.1 Identificação de novos ligantes do domínio citoplasmático de Sema5B

A varredura através do sistema de duplo-híbrido em leveduras realizada anteriormente, forneceu cerca de 10 mil clones positivos (usando apenas um gene repórter, *LEU2*) para a interação com o domínio citoplasmático de Sema5B. Nesse trabalho prévio, 159 clones foram testados em ensaios posteriores e, ao final, obtiveram-se 3 clones contendo o inserto na correta fase de leitura: *Cript*, *Scramblase 2* e *Trappc6a* (FAVARO, 2011)

No presente trabalho, dentre as 10^4 colônias obtidas na varredura, outras 251 foram selecionadas para ampliar o painel de ligantes e obter mais informações sobre as possíveis interações realizadas pelo domínio citoplasmático da Sema5B. Ao todo, dentre as 410 colônias, 40 apresentaram critérios positivos (**Quadro 1**) que levaram ao sequenciamento do plasmídeo da biblioteca pJG45 (**Tabela 1**).

Nº de clones varridos	6x10 ⁷		
Nº de clones Leu+	~1x10 ⁴		
	Mestrado	Doutorado	Total
Nº de clones selecionados para testes	159	251	410
Clones positivos para <i>LacZ</i> e <i>LEU2</i>	27	50	77
Clones Sequenciados	9	31	40

Tabela 1. QUANTIDADE DE CLONES OBTIDOS EM CADA ETAPA DO DUPLO-HÍBRIDO Representa em números cada etapa do duplo-híbrido relacionada a pontos de seleção e mostra o desenvolvimento do projeto relacionando os dados obtidos no mestrado e os obtidos durante o doutorado.

O sequenciamento revelou fragmentos de cDNA correspondentes a 25 diferentes proteínas, relacionadas na **Tabela 2**. Alguns fragmentos foram encontrados em mais de um clone. O “X-Gal score” refere-se à ordem de aparecimento da coloração azul das colônias, relacionado à expressão da proteína β -galactosidase. Em ligantes com mais de uma cópia apenas a primeira colônia a

apresentar a coloração está tabelada. Em outra varredura por duplo-híbrido do mesmo grupo de pesquisa (realizado por Breno Castello Branco Beirão e Paula Gimenez) tendo como isca a proteína príon celular, foi identificado o ligante Stub1. Posteriormente, este ligante teve sua interação com a Sema-Cito5B identificada em um ensaio de duplo-híbrido direto. Portanto, não coube a quantificação de clones relativos a Stub1 na **Tabela 2**.

Nome	Sigla	NM_	# de clones obtidos	X-Gal score
Dynein light chain tctex type 1	Dynlt1	NM_009342.2	4	2
Ubiquitin Like modifier activating enzyme 2	Uba2	NM_016682.2	2	36
Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein F	Hnrnpf	NM_001166432.1	5	27
S100 calcium binding A11	S100a11	NM_016740.3	2	21
Esterase D/formylglutathione hydrolase	Esd	NM_016903.4	1	26
RAS guanyl releasing protein 4	Rasgrp4	NM_001174155.1	1	44
Mus musculus Homolog 2 (Drosophila) Mindbomb	Mib2	NM_145124.2	1	25
Cyclin dependent kinase 2 associated protein	Cdk2ap2	NM_026373.4	1	7
Glutaredoxin 3	Glx3	NM_023140.4	1	40
Lim and cistein rich domain	Lmcd1	NM_144799.2	1	37
Trafficking pt. Particle complex 6	Trappc6a	NM_025960.3	1	3
Zinc finger MYM- type 5	Zmym5	NM_144842.3	1	2
Tripartite motif-containing 27	Trim27	NM_009054.2	1	25
Cysteine rich PDZ binding	Cript	NM_019936.3	2	10
Phospholipase scramblase 2	Plscr2	NM_008880.3	1	6
Mucina 2	Muc2	NM_023566.3	5	4
Mucina 5	Muc5B	NM_028801.2	2	11
Thyroid Hormone Receptor Interactor 6	Trip6	NM_011639.3	1	5
Ubiquitin specific peptidase 33	Usp33	NM_133247.2	1	36
EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 2	Efemp2	NM_001164352.1	1	28
Proxissomal membrane protein3	Pxmp3	NM_001163306.1	1	18
Fibronectin 1	Fn1	NM_010233.1	1	32
ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 1	St3gal1	NM_009177.4	1	8
Copper chaperone for superoxide dismutase	Ccs	NM_016892.3	1	48
Sushi-repeat-containing protein, X-linked 2	Srpx2	NM_001083895.1	1	23
STIP1 homology and U-Box containing protein1	Stub1	NM_019719.3	x	x

Tabela 2. RESULTADO DOS SEQUENCIAMENTOS DE CANDIDATOS A LIGANTES DE SEMA_5B. Relação de todas as sequências de cDNA encontradas a partir do sequenciamento dos insertos no vetor pJG4-5, registro de sequência no banco de dados, número de colônias encontrado para cada sequência e ordem de aparecimento de coloração azul na placa Gal/x-Gal (X-Gal score).

5.2 Confirmação das interações através de ensaio de *mating* cruzado (*cross-mating assay*)

Os plasmídeos sequenciados foram purificados a partir das colônias de leveduras diplóides e transformados em leveduras EGY48 para aplicação no ensaio de *mating* cruzado, como descrito Kolonin e colaboradores (2000). Para tanto, as leveduras EGY48 contendo os vetores para os ligantes foram cruzadas com leveduras RFY206, transformadas com o vetor contendo a isca (pGi_Sema5B) e também com o repórter pSH18-34 (contendo o gene *LacZ*). Os vetores pBait e pTarget (provenientes do Kit DupLexA – Origen) foram utilizados como controle positivo nesse ensaio. O cruzamento entre estas leveduras foi plaqueado em diferentes meios de cultura, para análise das interações através dos genes repórteres (**Quadro 1**, item 3.1.1 em Material e Métodos).

Os ligantes, Uba2, Rasgrp4, Mib2, Glrx3, Lmcd1, Trappc6a, Zmym5, Trim27, Cript, Plscr2, Muc5, Usp33 (não mostrado) e Stub1 foram capazes de ativar a transcrição dos genes repórteres apenas quando cruzados com a porção citoplasmática da Sema 5B (isca) e não quando sozinhos (cruzamentos com vetor pGilda vazio). Assim, essas interações puderam ser confirmadas (**Figura 4**). Os ligantes Hnrnpf, S100a11, Dynlt1, Esd e Cdk2ap2 foram capazes de ativar sozinhos a transcrição do gene *LEU2* ou do gene *LacZ*, portanto foram considerados como falso positivos (dados não mostrados).

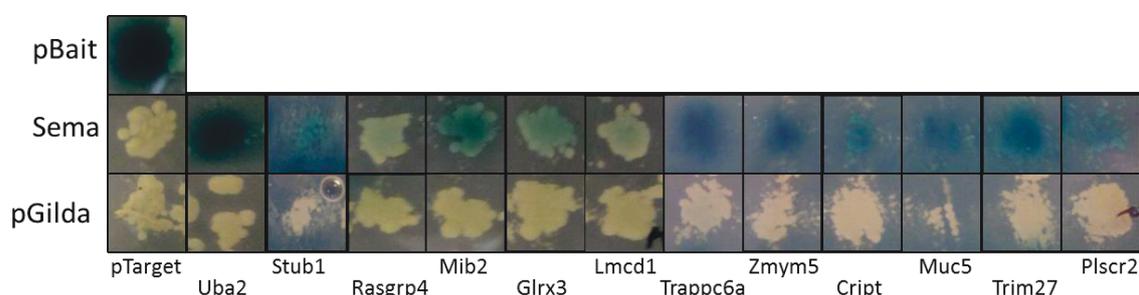


Figura 4 - Ensaio de *mating* cruzado.

Leveduras expressando os ligantes foram cruzadas com leveduras expressando a isca Sema_5B (**Sema**), expressando apenas LexA (**pGilda**, vetor vazio) ou expressando **pBait** e verificadas quanto à interação através da coloração azul (expressão de beta-galactosidase). Esse cruzamento foi plaqueado em meio SD-Gal contendo com X-Gal. O cruzamento de leveduras **pTarget** com pBait foi usado com controle positivo.

Baseado nas informações da literatura (CONSORTIUM, 2015), ligantes cuja função ou localização celular não condiziam com prováveis ligantes da sema5B foram descartados. Por exemplo, Muc5, é uma proteína secretada e não deve interagir com o domínio citoplasmático de Sema5B enquanto que a Plscr2 é uma proteína envolvida na perda de assimetria de membranas citoplasmáticas pela atuação em fosfolípidos de membrana. Informações sobre as funções dos ligantes obtidos após essa nova seleção, bem como o domínio encontrado no vetor da biblioteca são apresentadas na **Tabela 3**. É possível verificar que parte dos ligantes encontrados estão envolvidos nos processos de SUMOilação (Uba2) ou em ubiquitinação (Stub1, Usp33, Mib2, Trim27).

5.3 Critérios de escolha de ligantes e levantamento da literatura para atuação de putativos ligantes de Sema-cito5B

Embora as técnicas de rastreio em larga escala, como o sistema duplo-híbrido, possibilitem a identificação de possíveis interações proteicas, há ainda a necessidade do fortalecimento dessas informações através de outros métodos, tais como co-immunoprecipitação, *pull-down* e co-localização (revisado por BRÜCKNER et al., 2009). Para tanto, após a identificação e confirmação das interações obtidas na varredura (**Tabela 3**), foi necessário escolher alguns dos ligantes para construção de ferramentas e utilização em estudos posteriores.

Essa escolha foi baseada em buscas na literatura e em repositórios de informações sobre proteínas, como o Uniprot (CONSORTIUM, 2015), os quais sugeriram que alguns dos ligantes encontrados poderiam participar de interações biologicamente relevantes com a Sema-Cito5B. Avaliando a porção expressa no pJG4-5 e a relevância biológica de cada ligante encontrado, foram incluídos na seleção para os próximos estudos além da Cript, obtidas anteriormente (ver item “Resultados Anteriores” e FAVARO, 2011), os seguintes ligantes: Usp33, Uba2, Stub1 e Mib2.

A proteína Cript (Cysteine-Rich Interactor of PDZ 3 – ligante de PDZ 3 rico em cisteína) descrita inicialmente por Niethammer et al. (1998), interage com a proteína sináptica PSD-95/SAP90, através do domínio PDZ. Domínios PDZ são sequências peptídicas capazes de se ligar a sequências C-terminais de determinadas proteínas

alvo, mediando assim vias de sinalização (através de interações com canais iônicos, transporters e outros receptores) e reorganização do citoesqueleto, sendo importantes na regulação do crescimento de prolongamentos neurais (FRIEDMAN et al., 2000; VOGRIG et al., 2013; GRILLO-BOSCH et al., 2013). Cript está presente nas sinapses em dendritos, porém não é expressa em sinapses inibitórias e tem papel fundamental na formação de microtúbulos em regiões pré sinápticas (NIETHAMMER et al., 1998). Em O'Connor et al. (2009), é mostrado que a Sema5B tem um papel na redução do número de sinapses e do tamanho de compartimentos pré e pós sinápticos. Assim, é possível supor que Sema5B e Cript interajam *in vivo*, sobretudo nas regiões de sinapse. Há ainda outras associações que puderam ser feitas entre Cript e Sema5B, as quais serão abordadas posteriormente, na “Discussão”.

Outro ligante selecionado, Uba2 (ubiquitin-like modifier activating enzyme 2), é uma enzima tipo E1, ativadora da cascata de SUMOilação (LONG; GRIFFITH, 2000). A SUMOilação é uma modificação pós-traducional que envolve a ligação covalente de membros da família SUMO (*Small Ubiquitin-like Modifier*), pequena proteínas de cerca 11-kDa. Essa modificação é capaz de alterar o destino (transporte núcleo-citoplasma), a estabilidade, função e interações das proteínas alvos (sumoiladas) (GAREAU; LIMA, 2010). O sítio de SUMOilação na proteína alvo é descrito como tendo a sequência ψ KX(D/E)XXSP, onde ψ representa um resíduo hidrofóbico e X pode ser qualquer resíduo (RODRIGUEZ, 2001). Existe uma sequência com alto grau de homologia a este domínio na porção citoplasmática de Sema5B, entre os aminoácidos 27 e 39, com o resíduo de lisina acceptor de SUMO na posição 32 (**Figura 5**). Assim, a interação entre Sema-Cito5B e Uba2 também despertou interesse e Uba2 foi selecionada para investigações posteriores. Até o momento não existe nenhum dado na literatura que indique que as semaforinas possam ser sumoiladas.

A

ψ KX(D/E)XXSP

B

SCQHCQRQSQESTLVHPATPNHLHYKGGGTPKNEKYTPMEFKTLNKNLIPDDRA
NFYPLQQTNvYTTTYPSPLNKPSFRPEASPGQRCFPNS

Figura 5 - Domínio de SUMOilação.

A: Domínio de sumoilação como descrito em (GAREAU; LIMA, 2010); **B:** Sequência do domínio citoplasmático de Sema5B; em negrito o domínio similar ao proposto, sublinhado a Lisina aceptora da SUMO.

Já a Usp33 (*ubiquitin-specific protease 33*) é uma deubiquitinase. Foi visto que ela é responsável por controlar o cruzamento da linha média por axônios comissurais, através da sua ação em receptores Robo1 (YUASA-KAWADA et al., 2009). Esse papel de Usp33 na navegação axonal foi um dos motivos que nos levou a escolher esse ligante para investigações posteriores de sua possível interação com Sema5B.

Stub1 (STIP1 homology and U-Box containing protein 1), também conhecida como CHIP (C-terminus of Hsc70-interacting protein), é uma proteína citoplasmática de 35 kDa que funciona como uma co-chaperona molecular e apresenta atividade ubiquitina E3-ligase (BALLINGER et al., 1999).

Mib2 também é uma ubiquitina E3-ligase e está envolvida em compartimentos pós-sinápticos (LIN; MAN, 2013), endocitose e transdução de sinal para direcionamento axonal (SCHWARZ; PATRICK, 2012; KWON et al., 2013).

Stub1 e Mib2 foram então escolhidas para análises posteriores de suas interações com Sema5B, já que podem estar envolvidas na estabilidade de Sema5B. O controle de qualidade de Sema5B e a possível degradação dessa proteína pela via de ubiquitina-proteossomo ainda não foram abordados na literatura.

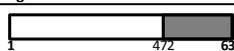
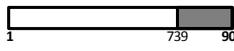
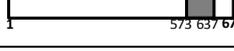
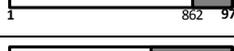
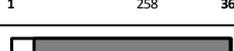
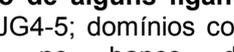
Sigla	Nome	Região encontrada no D-H	Domínios da região	Função da proteína
Uba2	Ubiquitin Like modifier activating enzyme 2		Ligação a ATP	Enzima ativadora de SUMOilação E1 (heterodímero com SAE2), cataliza a reação de ativação das SUMOs 1 a 3.
Usp33	Ubiquitin specific peptidase 33		DUSP1	Enzima deubiquitinante. Envolvida em duplicação centrossomal, migração de células SLIT dependentes, agindo na ROBO1 e reciclagem do receptor ADRB2.
Rasgrp4	RAS guanyl releasing protein 4		Zinc finger Phorbol-ester/DAG type	Trocadora de nucleotídeos regulada por DAG (<i>DAG regulated exchange nucleotide factor</i>) Sinalização via RAS e diferenciação de mielomas.
Mib2	Mus musculus Homolog 2 (Drosophila) Mindbomb		RING type zinc finger	E3 Ligase de Ubiquitina, envolvido na endocitose de receptores Delta.
Lmcd1	Lim and cystein rich domain		Zinc finger	Sinaliza através da via da calcineurina em células T ativadas.
Cript	Cystein rich PDZ binding		Interactor for DLG4, PDZ3 binding	Ancoragem de DLG4 em sinapses excitatórias. Liga-se a PSD-95 e outras proteínas, modulando a sinalização e interação com o citoesqueleto (Niethammer et al., 1998)
Trappc6a	Trafficking pt. Particle complex 6		SH3 binding	Sem informações na base de dados principal. Transporte de vesículas para a membrana cis-Golgi (SACHER et al., 2008 e GWYNN et al., 2006).
Trim27	Tripartite motif-containing 27		Coiled-coil	E3 Ligase de ubiquitina, inibe a ativação de células T CD4, promove a montagem de F-actina e induz à apoptose.
Stub1	STIP1 homology and U-Box containing protein 1		TRP	E3 ligase de ubiquitina, modula atividade de Hsp70 e 90, degradação de chaperonas mal dobradas, modulação da atividade do receptor EPHA2 pela via de degradação.

Tabela 3. Identidade e função de alguns ligantes de Sema5B confirmados. Sigla e nome do inserto encontrados no vetor pJG4-5; domínios conservados presentes neste peptídeo e função da proteína como encontrado no banco de dados disponível eletronicamente em

<http://www.uniprot.org/uniprot/> (CONSORTIUM, 2015), outras citações discriminadas quando necessárias.

5.4 Construção de vetores para expressão de Sema5B e seus ligantes em células de mamíferos

5.4.1 Escolha dos vetores e etiquetas moleculares

Optou-se por construir vetores capazes de expressar os cinco ligantes selecionados (Cript, Uba2, Usp33, Stub1 e Mib2), a região citoplasmática de Sema5B e Sema5B inteira em células de mamíferos. Para expressão do domínio citoplasmático de semaforina 5B (Sema-Cito5B) foram escolhidos dois vetores diferentes, sendo o primeiro deles pEGFP-C1, fabricado pela Clontech®, e o segundo pCDNA 3.1(-), fabricado pela Invitrogen®. O pEGFP-C1 apresenta a capacidade de codificar a proteína GFP (*green fluorescence protein*) conjugada na porção N-terminal à proteína de interesse. A principal função desse construto será oferecer uma maneira de localizar Sema-Cito5B em linhagens celulares, sem a necessidade de utilização de anticorpos, sendo efetivo em ensaios de colocalização.

O segundo plasmídeo escolhido foi o pCDNA 3.1(-), o qual é amplamente utilizado no laboratório. O vetor modificado disponível, contendo a sequência correspondente à etiqueta 6XHis foi o receptor para clonagem de Sema-Cito5B e Sema5B inteira. A principal função desse vetor seria a adição de uma etiqueta de 6 resíduos de histidina à região C-terminal de Sema-Cito5B, a qual permite a purificação da proteína através de cromatografia de afinidade níquel-agarose e a detecção do domínio de interesse com anticorpos comerciais para a etiqueta (Anti-His Antibody - Amershan®).

Para a clonagem dos ligantes, o plasmídeo pCDNA 3.1 foi utilizado. Como etiqueta molecular, foi escolhida a sequência Myc (GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG), pela disponibilidade de anticorpos no laboratório que se ligam a sequência myc codificada (c-Myc Antibody – Santa Cruz Biotech®). Esses construtos permitirão a expressão das proteínas ligantes em linhagens celulares e a realização de ensaios de co-imunoprecipitação e *pull-down* com Sema5B. Outra vantagem desses vetores será a utilização de apenas um anticorpo, anti-myc, para

marcar os diferentes ligantes ao invés do emprego de anticorpos específicos para cada um.

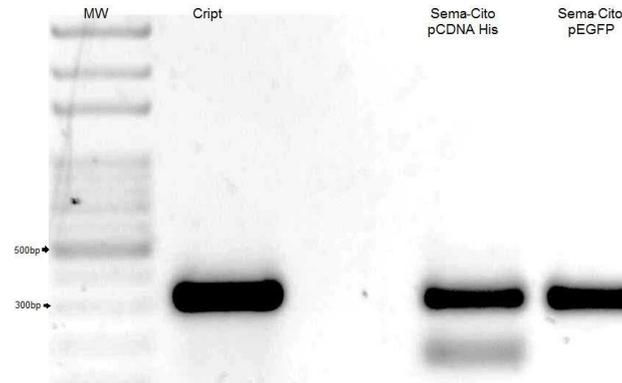
A **Tabela 4** resume as construções planejadas.

	Tamanho do inserto	Vetor utilizado	kDa
SemaCito5B	~309bp	pEGFP	11
SemaCito5B	~303bp	pCDNA com etiqueta His	11
Sema5B	~3.280bp	pCDNA com etiqueta His	124
Sema5B	~3.300bp	pCDNA	120
Mib2	~2.770bp	pCDNA com etiqueta Myc	110
Usp33	~2.730bp	pCDNA com etiqueta Myc	108
Uba2	~1.920bp	pCDNA com etiqueta Myc	73
Cript	~306bp	pCDNA com etiqueta Myc	12
Stub1	~915bp	pCDNA com etiqueta Myc	35

Tabela 4. Relação de cada inserto com o tamanho esperado e respectivos vetores utilizados nas clonagens e massa aproximada do produto de expressão em kDa.

5.4.2 Obtenção dos insertos

Reações de PCR demonstraram a eficácia dos iniciadores e templates utilizados (**Figuras 6, 7, 8 e 9**). De acordo com o esperado, as amplificações com insertos menores que 2,73kb apresentaram apenas uma banda específica no tamanho esperado (ver **Tabela 4**), com a exceção de Sema-Cito pCDNA His, que apresentou uma banda inespecífica em aproximadamente 180bp (**Fig 6**). A obtenção de insertos não foram satisfatórias inicialmente para a Mib2 e Sema5B inteira (resultados não mostrados). Novas tentativas, alterando condições de temperatura de anelamento e adição de DMSO na reação de PCR foram abordadas. O inserto para Mib2 foi amplificado (**Fig 8**), mas os insertos para Sema5B integrais não foram obtidos (**Fig 9**).



Perfil eletroforético, em matriz de gel de agarose 1,5%, da amplificação dos insertos Cript, Sema-Cito pCDNA His e Sema-Cito pEGFP. MW: DNA MW Marker, 100bp Ladder - Amresco®

Figura 6: Perfil eletroforético, em matriz de gel de agarose 1,5%, da amplificação dos insertos Cript, Sema-Cito pCDNA His e Sema-Cito pEGFP. MW: DNA MW Marker, 100bp Ladder - Amresco®

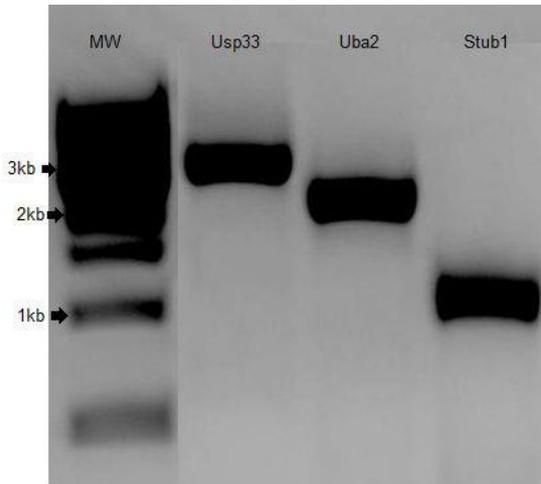


Figura 7 - PCR para amplificação dos insertos correspondentes a Usp33, Uba2 e Stub1.

Perfil eletroforético, em matriz de gel de agarose 1%, da amplificação dos insertos Usp33, Uba2 e Stub1. MW: 1kb DNA ladder - New England Biolabs®

Figura 7: Perfil eletroforético, em matriz de gel de agarose 1%, da amplificação dos insertos Usp33, Uba2 e Stub1. MW: 1kb DNA ladder - New England Biolabs®

Uma vez atestada a eficiência dos iniciadores, foram feitas 4 reações de PCR para cada inserto, totalizando assim material suficiente para início das clonagens. Para Sema-Cito pCDNA His, apenas as bandas no tamanho esperado (303 bp) foram gel extraídas.

Clonagem de Sema-Cito pCDNA His e Sema-Cito pEGFP

Os insertos Sema-Cito pEGFP e Sema-Cito pCDNA His foram digeridos com as enzimas BamHI e XhoI. Os insertos Sema-Cito pCDNA His e Sema-Cito pCDNA His foram digeridos com as enzimas BamHI e XhoI.

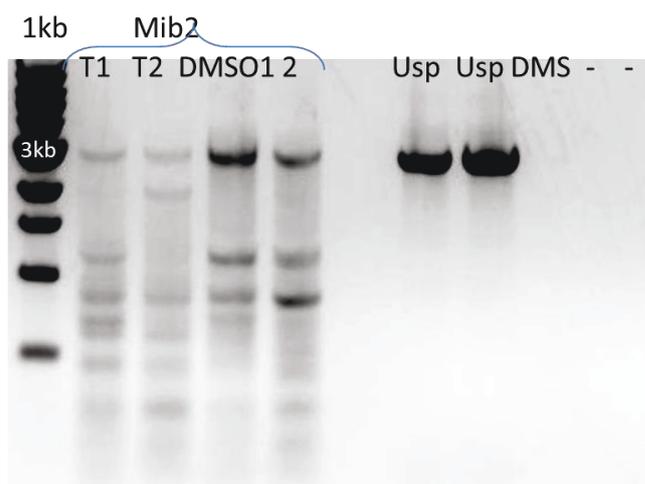


Figura 8 - Padronização das condições de PCR para amplificação de Mib2.

Corrida eletroforética em gel de agarose para separação dos produtos de PCR piloto para obtenção dos insertos. **1kb**: marcador de pares de base; **Mib2**: Reações utilizando os iniciadores para cada peptídeo alvo; **T1**: T de anelamento 46,8°C 10x e 56,8°C 20x, **T2**: T de anelamento 41,1°C 10x e 51,8°C; **DMSO**: Reações de PCR com 5% de DMSO adicionado. **Usp** e **Usp DMS**: controles positivos da reação, com e sem DMSO respectivamente.

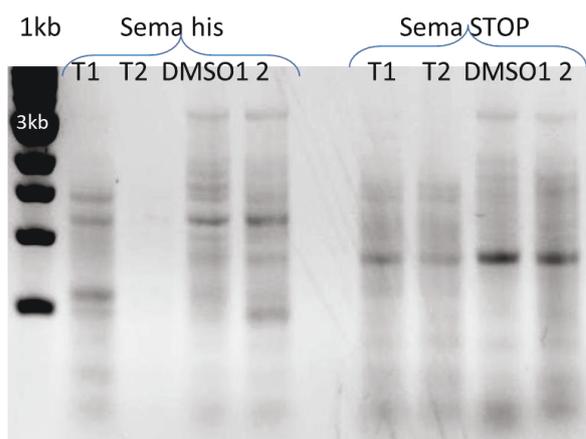


Figura 9 - Padronização das condições de PCR para amplificação de Sema5B integral.

Corrida eletroforética em gel de agarose para separação dos produtos de PCR piloto para obtenção dos insertos para Sema5B que será inserida no vetor pCDNA 3.1-His (“**Sema his**”) e Sema5B que será inserida nesse mesmo vetor mantendo-se o STOP códon da Sema5B (“**Sema Stop**”) eliminando a expressão da etiqueta. **1kb**: marcador de pares de base;; **T1**: T de anelamento 45°C 10x e 57,2°C 20x, **T2**: T de anelamento 40°C 10x e 52,2°C; **DMSO**: Reações de PCR com 5% de DMSO adicionado

Com exceção das sequências para ambas as semaforinas integrais (Sema5B para ser produzida com His-tag e Sema5B para ser expressa sem etiqueta), todas as outras foram submetidas a PCR em larga escala e gel extraídas.

Para obtenção do inserto para semaforina integral, o plasmídeo pSECTag utilizado no trabalho LETT et al., (2009) contendo a sequência para semaforina 5B integral foi cordialmente cedido pelos pesquisadores. Este plasmídeo possuía um peptídeo sinal diferente do peptídeo sinal de Sema5B. Assim, foi necessário o

planejamento de um novo iniciador para amplificar a sequência correspondente à Sema5B inteira. Com os iniciadores corretos, pôde-se obter o inserto correspondente à Sema5B integral (**Fig 10**).

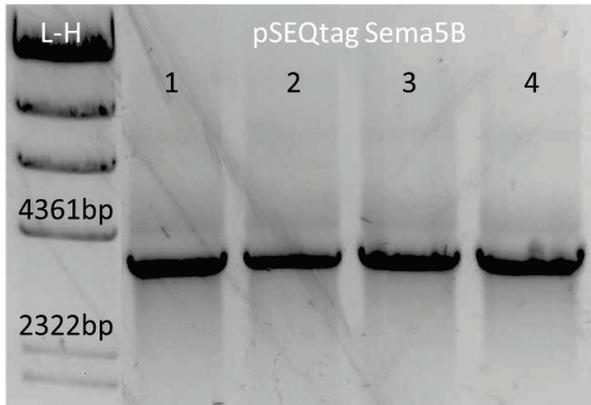


Figura 10 - PCR para Sema5B integral.

Template utilizado: pSeqTag Sema5B Lett, *et al.*2009. **L-H**: Marcador de pares de base Lambda-Hind; **pSEQtag Sema5B 1-4**: Template de preparações de plasmídeo advindas de 4 colônias transformadas

5.4.3 Clonagem de Sema-Cito pCDNA His e Sema-Cito pEGFP

O inserto Sema-Cito5B pEGFP e o plasmídeo pEGFP foram digeridos com as enzimas BamHI e XhoI e o inserto Sema-Cito pCDNA His e plasmídeo pCDNA 3.1(-) His com as enzimas BamHI e EcoRI. Após gel extração, foi feito ensaio de ligação e o produto da reação foi eletroporado em bactérias DH5 α , das quais foram selecionadas colônias para testar a presença do inserto por PCR. O resultado é mostrado nas **Figuras 11** para Sema-Cito5B pEGFP e **12** para Sema-Cito pCDNA His.

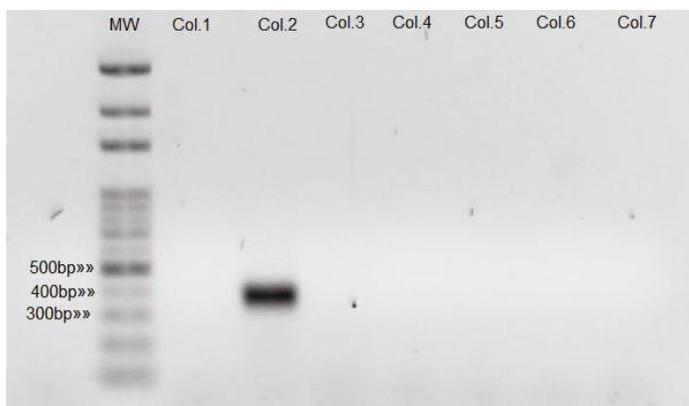


Figura 11 - PCR de colônia para pEGFP Sema-Cito5B. Perfil eletroforético, em matriz de gel de agarose 1,3%, do produto de PCR de colônia e sete colônias isoladas, obtidas pela eletroporação do produto de ligação de Sema-Cito pEGFP. Clones positivos: colônia 2. Col.1-7: colônias 1 a 7. MW: DNA MW Marker, 100bp (BioLabs - Amresco®)

Figura 11: Perfil eletroforético, em matriz de gel de agarose 1,5%, do produto de PCR de colônia de sete colônias isoladas, obtidas pela eletroporação do produto de ligação de Sema-Cito5B pEGFP. Clones positivos: colônia 2. Col.1-7: colônias 1 a 7. MW: DNA MW Marker, 100bp Ladder - Amresco®

Perfil eletroforético, em gel de agarose 1,5%, do produto de PCR de colônia de sete colônias isoladas, obtidas pela eletroporação do produto de ligação de Sema-Cito5B pEGFP. Clones positivos: colônia 2. Col.1-7: colônias 1 a 7. MW: DNA MW Marker, 100bp Ladder - Amresco®

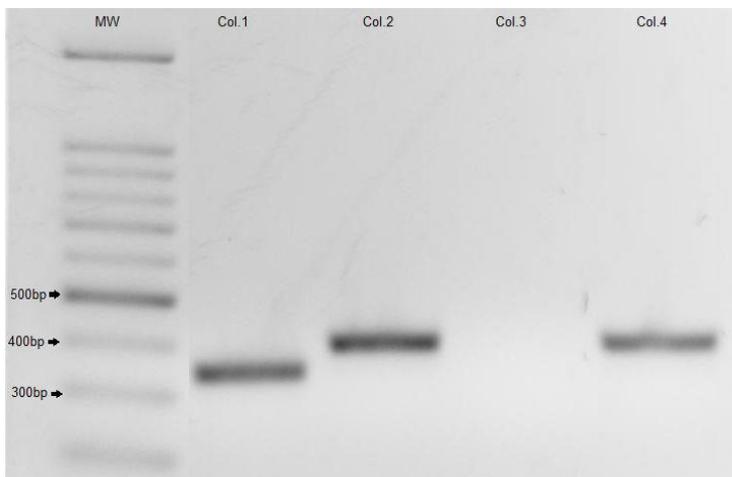


Figura 12 - PCR de colônia para Sema-Cito5B.

Perfil eletroforético, em matriz de gel de agarose 1,5%, do produto de PCR de colônia de quatro colônias isoladas, obtidas pela eletroporação do produto de ligação de Sema-Cito5B pEGFP. Clones positivos: colônia 2 e 4. Col.1-4: colônias 1 a 4. MW: DNA MW Marker, 100bp Ladder - Amresco®

Para ambas as amostras foram escolhidas as colônias número 2 para realização de preparação em pequena escala (mini-prep) e sequenciamento. Ambas apresentaram sequência correta com inserção em fase e abertura de leitura correta.

Pra Sema-Cito pCDNA, His (figura 12) houve ainda, uma colônia que apresentou 5.4.4 Montagem do pCDNA 3.1- N Myc tag

abaixo do esperado (colônia 1), resultado da dificuldade em se isolar apenas material da A montagem do plasmídeo envolveu a construção de uma etiqueta Myc específica (303bp) baseada na figura 10. Dessa forma, para ambas as amostras foram

Os sítios escolhidos para a colocação da etiqueta Myc foram NheI e XbaI. As colônias número 2 para realização de preparação em pequena escala (mini-prep) sequência de reconhecimento para estas enzimas são diferentes, porém a digestão sequenciamento.

delas produz pontas complementares, ou seja, são enzimas isocisomeras. O processo de ligação destas enzimas reflete as características encontradas em clonagens que utilizam apenas uma enzima.

Após a junção das fitas molde e complementar da sequência correspondente à etiqueta Myc, foi realizada uma reação com quinase para colocar um grupo fosfato nas pontas 5' do produto. Enquanto que para o plasmídeo digerido foi realizado uma reação para remover o grupo fosfato da porção 5'. A retirada do fosfato do plasmídeo não impede sua recircularização, porém, a enzima T4 ligase não é capaz de catalisar a ligação fosfodiéster do plasmídeo. A bactéria que venha a ser

transformada com este produto irá perecer na seleção por antibiótico, pois não conseguirá replicar o plasmídeo.

A reação de quinase no fragmento de DNA referente à Myc, permite, após reação de clonagem, que a T4 ligase forme uma ligação fosfodiéster, entre a etiqueta e o plasmídeo, tornando-o viável para seleção após transformação. Esta estratégia favorece a formação de concatêmeros, ligação sequencial entre Myc tags, ocasionando a montagem de plasmídeos fechados contendo mais de uma repetição do inserto. Estas construções são facilmente identificadas por PCR de colônia. É possível aumentar a eficiência da ligação para beneficiar o produto desejado, aumentando a concentração total da reação (fazendo a reação no menor volume possível), pré-aquecer brevemente o plasmídeo digerido e o Myc tag antes da ligação, desfazendo as pontes de hidrogênio e realizar a ligação em uma razão equimolar, favorecendo a interação entre inserto e plasmídeo.

Ainda assim existe a probabilidade de 50% de Myc tag ser ligado na orientação errada. A determinação da correta orientação é identificada através da digestão simples utilizando a NheI ou a XbaI, uma vez que apenas a ligação correta irá preservar o sítio de reconhecimento destas enzimas resultando na digestão do produto.

A eletroporação feita com a ligação equimolar permitiu o crescimento de 5 colônias de bactéria, e a ligação 1:5, 13 colônia. Ambas, após PCR de colônia, 2 de cada possuíam o plasmídeo contendo apenas uma cópia do tag. (**Fig. 13**)

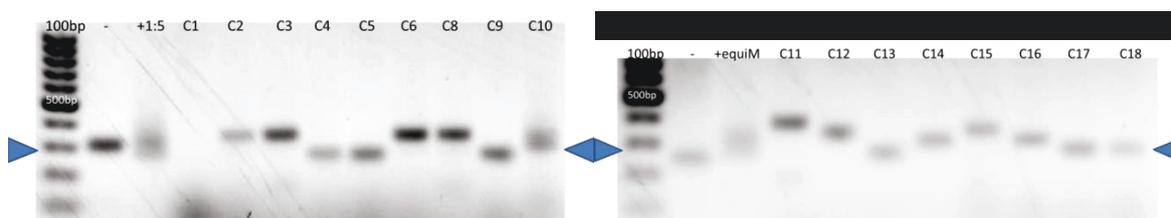


Figura 13 - PCR de colônia para pCDNA3.1- N MYC.

Corrida eletroforética em gel de agarose para separação dos produtos de PCR de colônia. **100bp:** marcador de pares de base; **+**: controles positivos utilizando a ligação como template. **C1-C5:** Bactérias eletroporadas com a ligação equimolar. **C6-C18:** Bactérias eletroporadas com a ligação 1:5. **Setas azuis:** Limite máximo estimado para produtos de PCR que contenham apenas uma cópia do Myc Tag.

Todas as 4 colônias que apresentavam bandas na altura esperada foram selecionadas, uma nova PCR de colônia foi feita (**Fig.14**).

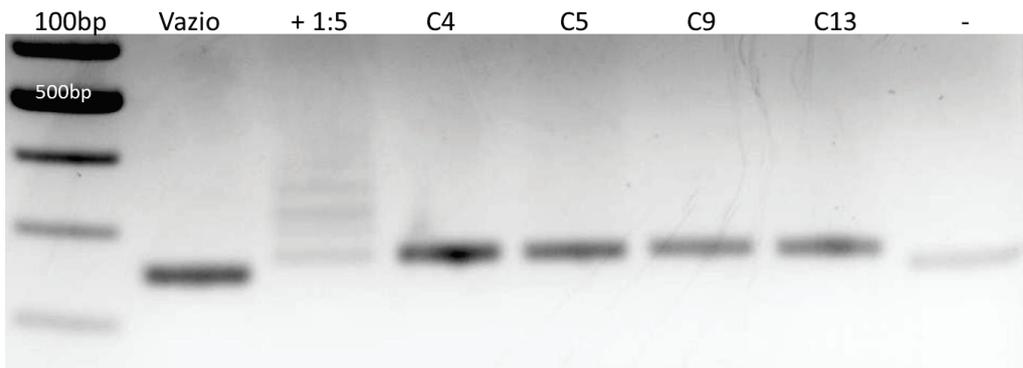


Figura 14 - PCR de colônia para pCDNA3.1- N MYC.

Corrida eletroforética em gel de agarose para separação dos produtos de PCR das colônias 4, 59 e 13. **100bp**: marcador de pares de base; **Vazio**: reação com o pCDNA3.1- vazio (apenas MCS); **+**: controle positivo utilizando a ligação 1:5 como template. **C4 e C5**: Bactérias eletroporadas com a ligação equimolar. **C9 e C13**: Bactérias eletroporadas com a ligação 1:5. -: Controle negativo da reação. Notar que o negativo possui uma banda abaixo das colônias e na mesma altura que o plasmídeo vazio. Notar também as várias bandas presentes representando plasmídeos com números variados de contactameros na ligação 1:5.

As colônias foram submetidas ao protocolo de mini-prep e os plasmídeos foram digeridos para verificação da correta inserção do tag. (**Fig. 15**).

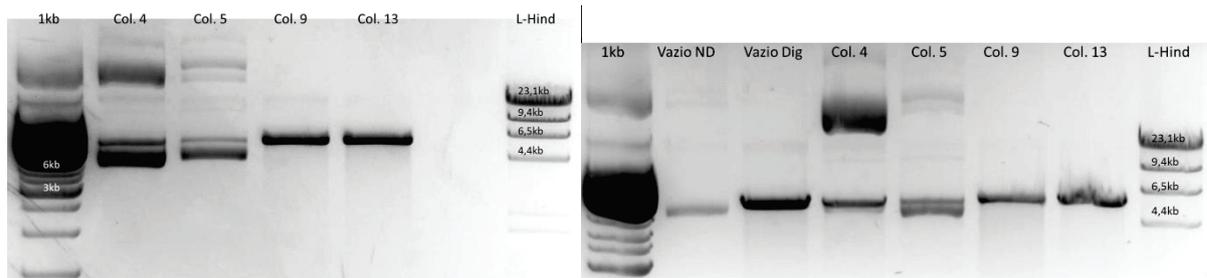


Figura 15 - Digestões simples Gel1 XbaI Gel2 NheI.

Corrida eletroforética em gel de agarose para separação dos produtos de PCR das colônias 4, 59 e 13. **1kb**: marcador de pares de base; **Vazio ND**: pCDNA3.1- vazio não digerido; **Vazio Dig**: pCDNA3.1- vazio digerido; **C4 e C5**: Bactérias eletroporadas com a ligação equimolar. **C9 e C13**: Bactérias eletroporadas com a ligação 1:5.

Nota-se que as colônias 4 e 5 permaneceram fechadas, evidenciados pela presença das bandas correspondentes aos estados *coil*, *super coil* e relaxados existentes apenas em plasmídeos circulares. As colônias 9 e 13, ambas da transformação 1:5 foram digeridas, o que pode indicar a correta colocação do tag.

A colônia 9 apresentou a correta ligação do inserto no plasmídeo verificado após sequenciamento, sendo este usado nas clonagens dos ligantes.

5.4.5 Clonagem dos ligantes no vetor pCDNA 3.1(-) N-Myc

Após a confirmação da clonagem da etiqueta de Myc no pCDNA 3.1(-) pelo sequenciamento, foi iniciada a clonagem dos ligantes. Como primeiro passo, os plasmídeos foram novamente digeridos, em conjunto com os insertos, com as enzimas adequadas. Após a gel extração, foi feita a reação de ligação e posterior eletroporação. Foram escolhidas 5 colônias de cada inserto para PCR de colônia, sendo o resultado apresentado abaixo (**Figuras 16, 17 e 18**).

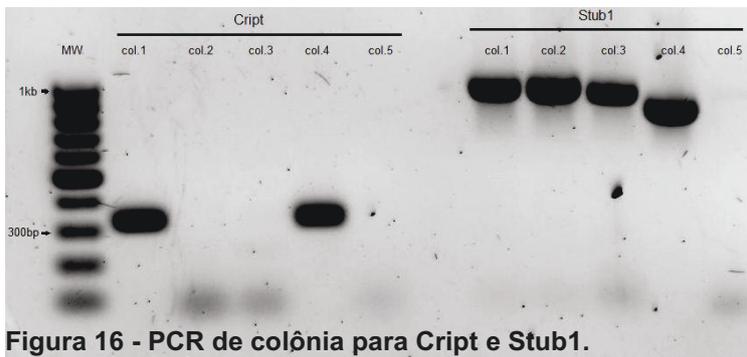


Figura 16 - PCR de colônia para Cript e Stub1.

Perfil eletroforético, em gel de agarose 1%, do produto de PCR de colônia de 10 colônias isoladas (cinco para **Cript** e cinco para **Stub1**), obtidas pela eletroporação do produto de ligação de **Cript/Stub1** com pCDNA 3.1- Myc. **Col.1-5:** colônias 1 a 5. Clones positivos: colônias 1 e 4 para **Cript** e 1,2 e 3 para **Stub1**. As demais colônias não apresentam banda, ou apresentaram banda abaixo do esperado. **MW:** GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Scientific®.

Figura 19: Perfil eletroforético, em matriz de gel de agarose 1%, do produto de PCR de colônia de 10 colônias isoladas (cinco para **Cript** e cinco para **Stub1**), obtidas pela eletroporação do produto de ligação de **Cript/Stub1** com pCDNA 3.1- Myc. **Col.1-5:** colônias 1 a 5. Clones positivos: colônias 1 e 4 para **Cript** e 1,2 e 3 para **Stub1**. As demais colônias não apresentam banda, ou apresentaram banda abaixo do esperado. **MW:** GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Scientific®.

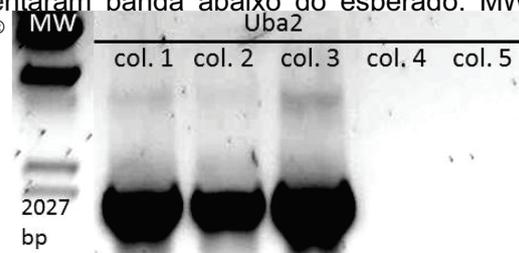


Figura 17 - PCR de colônia para Uba2.

Perfil eletroforético, em matriz de gel de agarose 1%, do produto de PCR de colônia de 5 colônias isoladas para **Uba2**, obtidas pela eletroporação do produto de ligação de **Uba2** com pCDNA 3.1- Myc. **Col.1-5:** colônias 1 a 5. Clones positivos: colônias 1,2 e 3 para **Uba2**. As demais colônias não apresentam banda. **MW:** Marcador de pares de base Lambda-Hind Fermentas®.

Figura 20: Perfil eletroforético, em matriz de gel de agarose 1%, do produto de PCR de colônia de 10 colônias isoladas (cinco para **Usp33** e cinco para **Uba2**), obtidas pela eletroporação do produto de ligação de **Usp33/Uba2** com pCDNA 3.1- Myc. **Col.1-5:** colônias 1 a 5. Clones positivos: colônias 1,2 e 3 para **Uba2**. As demais colônias não apresentam banda. **MW:** λ DNA-HindIII Digest – New England Biolabs®.

Foram selecionados para mini preparação e sequenciamento os clones positivos colônias 1 para **Cript** e **Stub1** e colônia 3 para **Uba2**. Esses foram então sequenciados e apresentaram sequências de acordo com o esperado, estando prontas para uso. Para o inserto

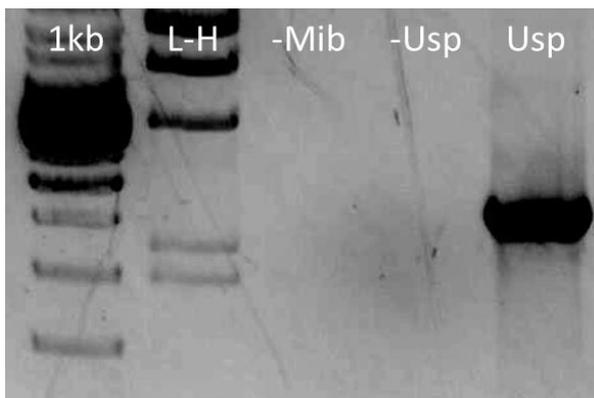


Figura 18 - PCR de colônia para Usp33.

Corrida eletroforética em gel de agarose para separação do produto de PCR da colônia escolhidas para Usp33. **1kb**: marcador de pares de base, **L-H**: marcador de pares de base Lambda-Hind; **-Mib**: Controle negativo, **-Usp**: Controle negativo, **Usp**: produto de PCR de colônia para validação da construção.

As colônias positivas foram usadas para mini preparações dos plasmídeos. Esses foram então sequenciados e apresentaram sequências de acordo com o esperado, estando prontas para uso. Para o inserto Mib2 não foram encontradas colônias positivas (dados não mostrados) mesmo com o uso de DMSO e com alterações nas temperaturas de anelamento.

5.5 Expressão dos ligantes e de Sema5B em células HEK293T

A partir dos vetores clonados com as sequências para Sema5B, Sema5B-His, Sema-Cito5B-His, Sema-Cito5B-EGFP e para os ligantes Cript, Stub, Uba2 e Usp33 transfecções foram realizadas em células HEK293T. HEK293T é uma linhagem derivada de células epiteliais de rim embrionário humano. Elas expressam constitutivamente o antígeno T de SV40, que favorece a manutenção episomal de vetores de expressão transfectados (com SV40 ori) e proporciona uma maior expressão das proteínas de interesse. Ainda, as células HEK293T são utilizadas em vários projetos do Laboratório de Neurobiologia e para sua transfecção o protocolo de precipitação por fosfato de cálcio já é bem estabelecido e de baixo custo.

Após transfecção, os extratos celulares foram preparados e submetidos a ensaios Western blot para detecção da expressão das proteínas.

As proteínas em fusão com a etiqueta Myc, relacionadas aos ligantes Usp33, Uba2 Stub1 e Cript, foram expressas com sucesso nas massas moleculares esperadas conforme apresentado na **Fig. 19**.

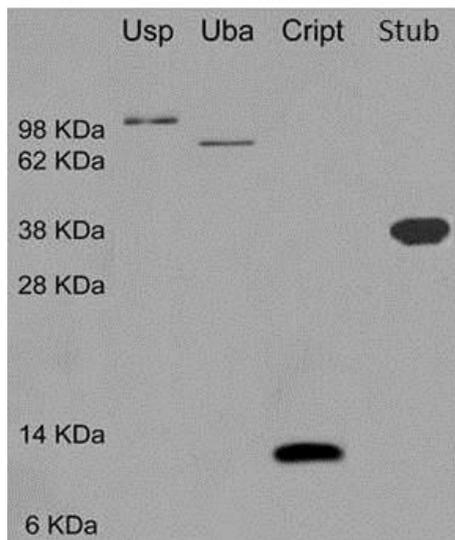


Figura 19 - Expressão dos ligantes de Sema5B em HEK293T transfectadas.

Células HEK293T foram transfectadas com os vetores de expressão, e após 24 h de expressão, os extratos foram separados e submetidos a ensaios de Western blot, com anti-myc.

A expressão de Sema5B integral His-tag foi avaliada nos extratos celulares por Western blot após 12 h, 24 h e 48 h de transfecção. Como pode ser visto na **Figura 20**, Sema5B-His é detectada após 12 h e 24 h de expressão. Em 48 h, a proteína não é mais detectada. Diferentemente, a proteína CD28-His, usada como controle positivo nesse ensaio, é expressa em altos níveis em 24 h e 48 h após a transfecção.

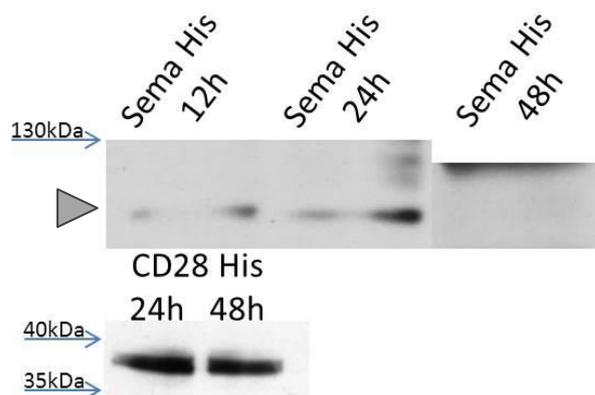


Figura 20 - Expressão de Sema5B-His em HEK293T em diferentes tempos.

Experimento de Western blot seguido de reação com anticorpo específico anti-HisTag. Massa esperada aproximada para cada proteína recombinante: **Sema5B His**: 123,9kDa; **CD28**: 37kDa. Controle positivo. **Ponta de flecha**: posição estimada da proteína Sema 5B-His. Amostras de extrato de células com tempos de 12, 24 e 48 horas obtidos após a transfecção. Nota-se a ausência de expressão em 48 horas da Sema5B-His.

Extratos de células obtidos após 24 horas de transfecção foram usados para a purificação de Sema5B-His por coluna de afinidade por níquel (Ni-NTA agarose).

Após 3 horas de incubação de 300 µg de extrato total a 4°C, a coluna foi lavada com 300 µl de tampão de lise contendo 8 e 40 mM de Imidazol. O sobrenadante de cada lavagem foi coletado e 60 µl foram usados para separação eletroforética. Como mostrado na **Fig. 21**, a Sema5B-His possui afinidade pela resina em condições de lavagem com 40mM de Imidazol. Não foi avaliada a eluição da resina, pois o objetivo é a verificação dos parâmetros de afinidade da proteína para a realização do protocolo de *pull-down*, o qual necessita que Sema5B-His fique imobilizada na resina. Foi possível identificar não só a proteína Sema5B integral, mas também a porção C-terminal clivada por ADAM-17 equivalente à encontrada em BROWNE, 2012.

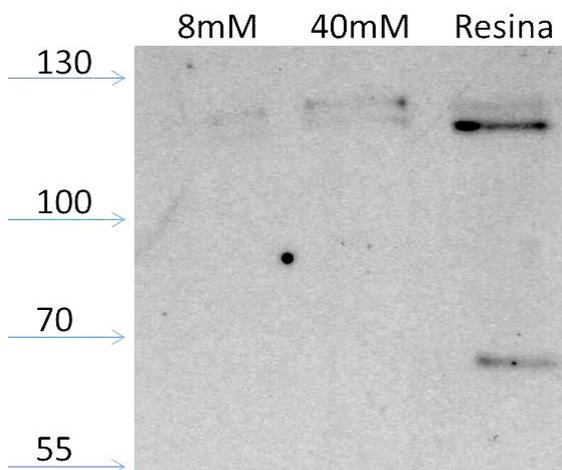


Figura 21 - Purificação de Sema5B-His em resina de níquel.

Extratos de células HEK293T transfectadas com vetor para expressão de Sema5B-His foram incubados com a resina de níquel-agarose e submetidos a lavagens com tampão de lise contendo de 8 a 40mM de Imidazol. Após separação eletroforética, as amostras foram submetidas a Western blot e reveladas com anticorpos específicos para His-Tag. **8mM e 40mM:** Alíquota do sobrenadante da lavagem com concentração de Imidazol representado; **Resina:** O que permaneceu ligado na resina foi eluído com 30ul de tampão de corrida redutor, após fervura.

As transfecções realizadas com os plasmídeos para a porção citoplasmática da Sema5B (pCDNA 3.1 His Sema-Cito5B e pEGFP Sema-Cito5B) não apresentaram bandas específicas em reações com anticorpos contra EGFP e His-tag (**Fig 22**). As transfecções com o plasmídeo pEGFP-Sema-Cito5B mostraram-se pouco eficientes em relação ao plasmídeo vazio. Enquanto o plasmídeo original pEGFP apresentava eficiência de transfecção de ~80% (visto através da fluorescência das células), nas mesmas condições, o vetor pEGFP-Sema-Cito5B apresentava eficiência de 10%, inclusive com o dobro de plasmídeo (dados não apresentados). É possível que essas poucas células transfectadas expressem quantidades de Sema-Cito5B-EGFP que não conseguem ser detectadas no ensaio

de Western blot. A eficiência de transfecção do pCDNA-His Sema-Cito5B não pôde ser quantificada.

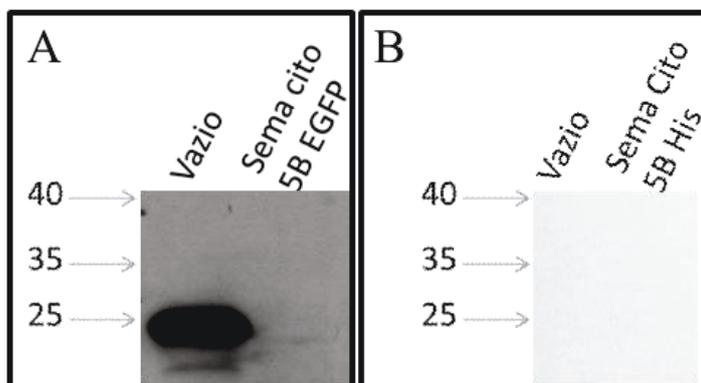


Figura 22 - Expressão dos domínios citoplasmáticos de Sema5B em células HEK293T.

Extratos de células HEK293T transfectadas com vetor **A: pEGFP-Sema-Cito5B** e **pEGFP vazio** e em **B, pCDNA3.1 His** e **Sema-Cito5B**. Ensaio de Western blot com anticorpos Anti GFP (em **A**) e Anti-His (em **B**) para identificação das proteínas de fusão sendo expressas. Apenas a expressão de GFP pode ser visualizada (linha "Vetor vazio"). Os domínios citoplasmáticos de Sema5B, em fusão com GFP, ou com a etiqueta 6xHis, não foram detectados.

5.6 Confirmação das interações por *pull-down*

A Sema5B integral, contendo a etiqueta de His, foi expressa em células HEK293T e, após expressão e lise das células, foi imobilizada em resina de Ni-NTA. Extratos de HEK293T expressando os ligantes Usp33, Uba2, Stub1 e Cript foram incubados com essa resina contendo Sema5B. Após lavagens, os complexos proteicos que permaneceram ligados à agarose foram eluídos e submetidos a ensaios de Western blot para detecção dos ligantes com anti-myc (no caso de Stub1, utilizou-se um anticorpo específico para essa proteína, disponível no laboratório). Na **Fig. 23** é possível ver que Stub1 e Usp33 foram capazes de se ligar a Sema5B de maneira específica, já que houve ausência da detecção do ligante na resina vazia. Nota-se que na linha correspondente ao extrato de HEK293T expressando myc-Usp33 (*input* da **Figura 23A**), há uma banda na altura de 130 kDa que reagiu com o anticorpo anti-His. Coincidentemente, essa banda apresenta a mesma massa molecular que Sema5B-His. Entretanto, as células do extrato em questão não foram transfectadas com o vetor para expressão de Sema5B-His e a banda obtida deve corresponder a uma ligação cruzada do anticorpo anti-His em uma proteína de 130kDa, presente no extrato analisado. Cript não interagiu com Sema5B nas condições deste ensaio, enquanto que a Uba2 mostrou ter interação inespecífica pela resina vazia.

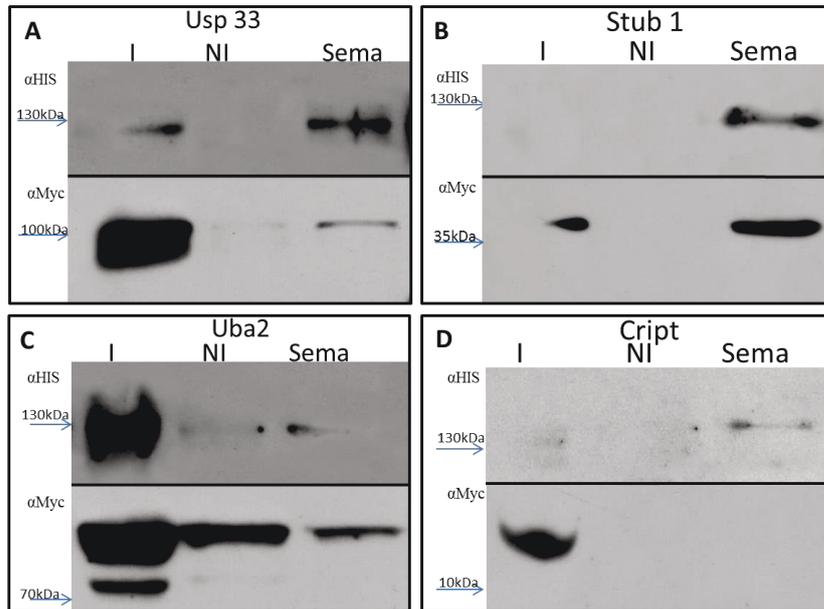


Figura 23 - Pull-down com Sema5B integral imobilizada.

Extrato de HEK293T expressando os ligantes **Usp33** (A), **Stub1** (B), **Uba2** (C) ou **Cript** (D) (com amostras de cada extrato nas colunas "I") foram incubados com Sema5B-His integral imobilizada na resina Ni-NTA (colunas "Sema") ou com essa resina vazia (colunas "NI"). As proteínas ligadas foram avaliadas por Western blot com anti-myc (para detecção dos ligantes) e para anti-His (para detecção de Sema5B). **Nota:** reação que detectou Stub1 foi feita com anticorpo específico e não anti-Myc.

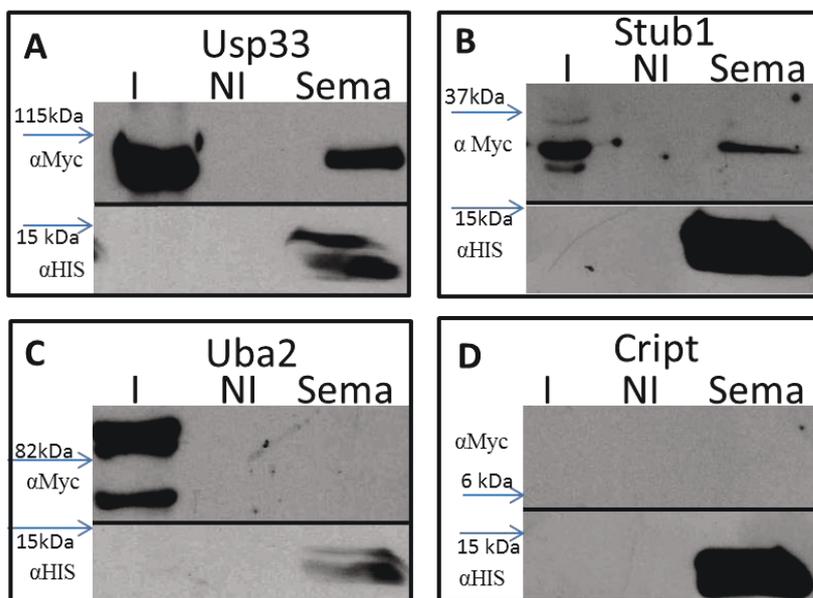


Figura 24 - Pull-down com Sema-Cito5B expressa em procarionte imobilizada.

Extrato de HEK293T expressando os ligantes **Usp33** (A), **Stub1** (B), **Uba2** (C) ou **Cript** (D) (com amostras de cada extrato nas colunas "I") foram incubados com Sema-Cito5B-His imobilizada na resina Ni-NTA (colunas "Sema") ou com essa resina vazia (colunas "NI"). As proteínas ligadas foram avaliadas por Western blot com anti-myc (para detecção dos ligantes) e para anti-His (para detecção de Sema5B) Input: I.

O plasmídeo de expressão procarionte contendo a Sema-Cito5B (pET28a SemaCito5B) já foi validado em (TRENTIN, 2008). O produto de sua expressão foi utilizado como isca em um *pull-down* contra os extratos dos ligantes expressos em HEK293T. Como visto na **Figura 24**, o resultado obtido confirma o encontrado no *pull-down* anterior (**Fig. 23**). Assim, as interações entre Sema5B/Stub1 e Sema5B/Usp33 foram verificadas tanto através da metodologia de duplo-híbrido, quanto em ensaios de ligação *in vitro* com a Sema5B expressa integralmente em células de mamífero e com Sema-Cito5B expressa em células procariontes.

6 DISCUSSÃO

Ainda não há descrição na literatura a respeito da ação da Sema5B como uma proteína receptora, capaz de ativar uma via de sinalização intracelular pelo seu domínio citoplasmático. Uma das abordagens para se identificar essa função de transdução de sinal é a determinação de com quais proteínas essa região citoplasmática interage. Para as semaforinas transmembrânicas, apenas Sema6D (TOYOFUKU et al., 2004), e Sema1a (SWEENEY et al., 2011) tiveram seu domínio citoplasmático associado à função de transdução de sinal.

Com o objetivo de investigar esse possível papel de Sema5B como receptora e transdutora de sinal, iniciamos a busca por parceiros moleculares capazes de interagir com o domínio citoplasmático de Sema5B. Em trabalho anterior (dissertação de mestrado; (FAVARO, 2011)), foi realizada a varredura de uma biblioteca de cDNA de epitélio olfatório (este tecido possui grande quantidade de neurônios e foi demonstrado que ele expressa Sema5B (LETT et al., 2009)) pelo sistema de duplo-híbrido em leveduras, usando o domínio citoplasmático de Sema5B como isca. Alguns ligantes foram identificados nessa etapa, mas ainda havia cerca de dez mil clones positivos obtidos na varredura que poderiam ser avaliados. Assim, no doutorado, optou-se por selecionar novas colônias, levando à identificação de um número maior de ligantes putativos para o domínio citoplasmático de Sema5B. Como pôde ser visto, 9 ligantes de Sema-Cito5B foram confirmados por ensaios de *mating* cruzado e por análises prévias da literatura que apontaram uma atuação destes em eventos de navegação axonal ou sinalização intracelular. Ao mesmo tempo, foram excluídas algumas interações improváveis de ocorrer naturalmente (proteínas citoplasmáticas interagindo com proteínas secretadas, por exemplo) (tabela 3). Boa parte destes ligantes encontra-se expressos no citoplasma celular e possui funções que podem estar associadas às vias de ubiquitinação e SUMOilação, a mecanismos de sinalização intracelular ou a outras vias em que a Sema5B possa estar envolvida, sobretudo no contexto do sistema nervoso central. A função destas proteínas pode ajudar a elucidar o papel do domínio citoplasmático de Sema5B na sinalização celular.

O sistema de duplo-híbrido em leveduras é uma técnica utilizada há mais de 25 anos para identificação de interações proteicas (VIDAL; FIELDS, 2014). Embora

possua algumas desvantagens, como diferenças nos níveis de expressão das proteínas isca e alvo, dependendo do ambiente em que são normalmente expressas, esse sistema ainda apresenta benefícios quando comparado a outras técnicas de detecção de interações proteína-proteína em larga escala. Entre essas vantagens, podemos citar que não é uma técnica amplamente influenciada pela abundância proteica e embora forneça um menor número de interações, essas interações provavelmente são mais específicas (IVANIC et al., 2009). Ainda que seja capaz de encontrar interações mais específicas, deve-se ter cautela ao se analisar os dados obtidos, sempre levando em conta o contexto em que a interação deveria ocorrer. No presente trabalho analisamos a capacidade da porção intracelular de Sema5B em interagir com outras proteínas, sendo que selecionamos as interações com proteínas citoplasmáticas como mais prováveis de estarem ocorrendo no ambiente natural da célula.

Evidências indicam que Sema5B pode ser clivada (**Figura 21**) por ADAM-17 na membrana plasmática, levando a internalização das porções intracelular e transmembrânica. Essas, por sua vez, são direcionadas para degradação via proteossomo (BROWNE et al., 2012). A degradação via proteossomo é uma importante rota de reciclagem proteica e controle de estabilidade de proteínas, sendo o direcionamento feito pelas proteínas de ubiquitinação. Entre nossos achados, encontramos a proteína Stub1, uma co-chaperona com atividade ubiquitina E3 ligase, que pode estar envolvida no processo de degradação da porção citoplasmática de Sema5B, ou mesmo de Sema5B integral. Embora essa via proteolítica geralmente exista para simples degradação proteica, trabalhos vêm mostrando que a degradação de alguns substratos possui papel importante na plasticidade neural, estando também envolvida em alguns outros aspectos como desenvolvimento e direcionamento refinado das sinapses (HEGDE, 2010). Dessa forma, não podemos excluir a possibilidade do domínio citoplasmático da Sema5B estar ativando uma cascata sinalizadora mesmo após sua clivagem.

Há também a possibilidade de que a via de ubiquitina esteja envolvida na reciclagem de Sema5B. Já é conhecido que alguns receptores na membrana celular podem ser ubiquitinados e sofrer endocitose (através da ligação de adaptadores e clatrina). Essas proteínas podem então ser direcionadas ao processo de degradação via lisossomos. Se a ubiquitina do receptor endocitado for removida por uma

deubiquitinase, esse receptor pode retornar à membrana plasmática e ser reciclado (revisado por (HEGDE, 2010)). Com base neste mecanismo e na suposta interação entre Sema5B com Stub1 e com Usp3: Stub1 poderia adicionar ubiquitina ao domínio citoplasmático de Sema5B, induzindo sua endocitose; e Usp33, uma deubiquitinase, poderia remover essa modificação, induzindo a realocação de Sema5B na superfície celular.

Há também a possibilidade das interações obtidas de Sema5B com Stub1 e Usp33 agirem em outro contexto. Em trabalho recente, Yang e colaboradores (2013) relataram que as enzimas Usp47 e Stub1 são capazes de regular antagonicamente a degradação da proteína katanin-p60. Katanin-p60 é um heterodímero capaz de romper microtúbulos, apresentando papel fundamental no crescimento axonal. Enquanto que Usp47 age de forma a estabilizar katanin-p60 em neurônios hipocámpais de rato, através de deubiquitinação, Stub1 possui papel antagônico, promovendo degradação mediada por proteossomo (YANG et al., 2013). Assim, é possível que estas proteínas estejam envolvidas numa mesma cadeia de mecanismos relacionadas aos papéis de Sema5B, modulando a estabilidade desta e suas funções.

Ainda quanto à Usp33, foi visto que ela é responsável por controlar o cruzamento da linha média por axônios comissurais, através da sua ação em receptores Robo1 (YUASA-KAWADA et al., 2009). Estes últimos, assim como as semaforinas, estão envolvidos na navegação axonal, o que permite especular que a interação identificada entre Sema5B e Usp33 também possa estar envolvida nesse mecanismo.

Sabe-se ainda que vários outros fatores influenciam o desenvolvimento dos prolongamentos neurais, sendo um desses fatores a concentração de íons cálcio (GOMEZ; ZHENG, 2006). To e colaboradores (2007) mostraram que a própria porção extracelular de Sema5B é capaz de ativar as proteínas calpaina e calcineurina, modulando as concentrações de cálcio no interior celular. O ligante Cript já foi descrito em mecanismos relacionados à regulação de Ca^{+2} (TO et al., 2007) e assim, suas ligações com Sema5B podem estar envolvidas nessa via.

Cript interage com a proteína sináptica PSD-95/SAP90, através do domínio PDZ e está presente nas sinapses em dendritos, porém não é expressa em sinapses inibitórias e tem papel fundamental na formação de microtúbulos em regiões pré sinápticas (NIETHAMMER et al., 1998). O fato de já ter sido demonstrado que

Sema5B apresenta um papel na redução do número de sinapses e do tamanho de compartimentos pré e pós sinápticos, é possível supor que a interação entre Sema5B e Cript ocorra *in vivo*, provavelmente nas regiões de sinapses.

Uba2 foi outro ligante encontrado e escolhido, sobretudo pela sua participação no mecanismo de SUMOilação. A SUMOilação é uma modificação pós traducional relacionada à ubiquitina (Small ubiquitin- related modifier). As proteínas SUMO possuem aproximadamente 11Kda e se assemelham tridimensionalmente a ubiquitina, porém compartilham apenas 20% de identidade e possuem diferentes distribuições de carga em sua superfície (GEISS-FRIEDLANDER; MELCHIOR, 2007). Assim como a ubiquitinação, a SUMOilação resulta na ligação isopeptídica entre os resíduos de glicina C terminal da proteína modificadora e resíduos de lisina da proteína alvo. Ambos os processos necessitam de uma cascata enzimática própria com proteínas ativadoras e conjugadoras. A via de SUMOilação tem vários passos, ativação, conjugação, e ligação (GEISS-FRIEDLANDER; MELCHIOR, 2007). A Uba2 é uma enzima tipo E1 ativadora, mesmo que ela não atue diretamente no substrato a ser ubiquitinado, ela pode ter papel principal na ativação da via (JOHNSON et al., 1997; GAREAU; LIMA, 2010).

O fato do domínio citoplasmático de Sema5B apresentar um sítio putativo para SUMOilação (**Figura 5** do Item 4.3 em Resultados), sugere que tal proteína possa ser alvo dessa modificação pós-traducional, possivelmente por Uba2. As consequências dessa modificação na Sema5B ainda precisam ser investigadas.

Mib2 foi outro ligante escolhido para ser melhor caracterizado quanto à sua interação com Sema5B. Mib2 é uma ubiquitina E3-ligase e está envolvida em compartimentos pós-sinápticos (LIN; MAN, 2013), endocitose e transdução de sinal para direcionamento axonal (SCHWARZ; PATRICK, 2012; KWON et al., 2013). Assim, é possível que a sua interação com Sema5B esteja envolvida nessas funções.

Entretanto, o vetor de expressão para Mib2 não foi obtido e essa interação não pode ser validada nos ensaios de *pull-down*. Novas tentativas para obter esse plasmídeo estão sendo realizadas.

A **Figura 25** apresenta um esquema que resume como os quatro ligantes selecionados e clonados em vetor de expressão, Usp33, Uba2, Stub1 e Cript podem estar associados à Sema5B.

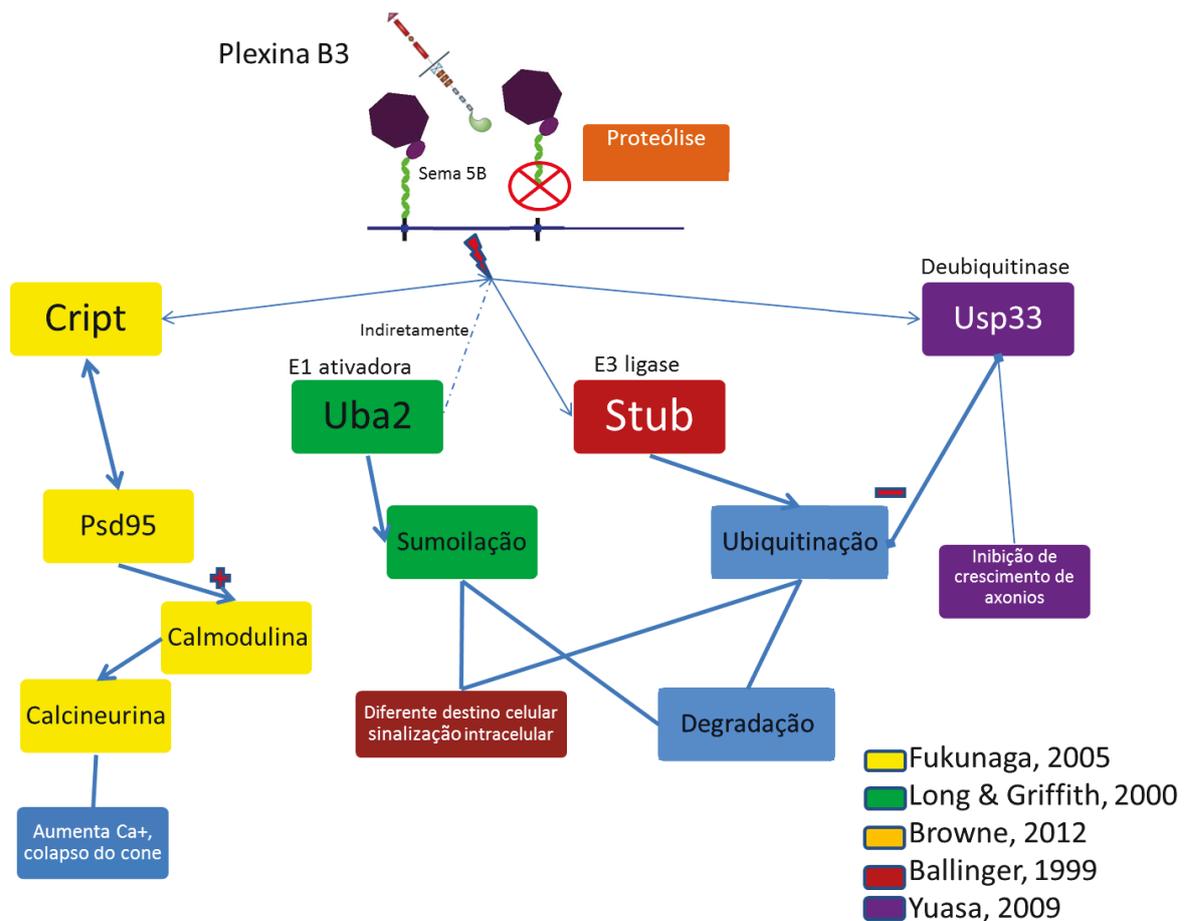


Figura 25 - Proposta da cascata bioquímica da Sema5B e o envolvimento dos ligantes selecionados.

Ação hipotética da porção citoplasmática da Sema5B após sinalização extracelular. A sinalização pode ser iniciada tanto pela interação da Sema5B com seu receptor clássico, uma plexina, quanto pela ocorrência de proteólise da porção extracelular.

Como demonstrado, as construções de vetores para expressão de Sema5B (integral e domínio citoplasmático com etiqueta His) e dos ligantes escolhidos (Cript, Uba2, Usp33, Stub1) foram bem sucedidas. Estas ferramentas encontram-se disponíveis e algumas já estão sendo utilizadas em outros trabalhos do laboratório.

Os ligantes foram expressos de forma adequada nas células HEK293T e a etiqueta myc adicionada favoreceu a detecção destes.

Não foi possível detectar a expressão dos domínios citoplasmáticos de Sema5B, nem o produzido em fusão com GFP, nem aquele contendo a etiqueta de 6xHis. É possível que estes domínios, quando expressos, sejam mais instáveis e rapidamente degradados. Já que vários dos ligantes identificados para esse domínio estão envolvidos nas vias de SUMOilação e ubiquitinação, pode-se supor que a degradação das proteínas recombinantes expressas seja feita por essas vias. O mesmo deve ocorrer com a Sema5B-His integral. A detecção desta recombinante é

possível após 12 e 24 horas de expressão. Após 48 h, essa proteína não é mais encontrada nos extratos celulares, sugerindo a sua degradação. Há também a possibilidade de que Sema5B esteja sendo clivada pela ADAM17 ou outras proteases, como já descrito por (BROWNE et al., 2012).

Foi desenvolvido ainda um plasmídeo capaz de expressar a Sema5B de forma integral sem qualquer etiqueta. Este plasmídeo não pôde ser validado por falta de anticorpos confiáveis contra a Sema5B. O produto de expressão deste plasmídeo poderá se tornar uma importante ferramenta para o estudo de função Sema5B, desde que seja disponibilizado um anticorpo de qualidade para essa proteína. É importante notar que os poucos trabalhos na literatura sobre Sema5B utilizaram anticorpos policlonais produzidos nos próprios laboratórios.

No presente trabalho foram identificados possíveis ligantes para a porção citoplasmática de Sema5B. Esses achados são inéditos na literatura e podem elucidar um provável papel de Sema5B como uma proteína receptora, capaz de mediar uma via de sinalização intracelular. Os ligantes encontrados participam de vários processos celulares, sendo que alguns deles puderam ser agrupados nas vias de ubiquitinação e SUMOilação.

Os ligantes Usp33, Uba2, Stub1 e Cript foram escolhidos e usados para a construção de vetores de expressão em células de mamíferos. Além disso, vetores para Sema5B também foram produzidos. As proteínas recombinantes resultantes foram empregadas em ensaios de *pull-down* e confirmaram as interações de Sema5B com Usp33 e com Stub1. Essas interações sugerem a estabilidade/reciclagem de Sema5B, que pode influenciar a formação de redes neurais.

Ensaio funcionais com as proteínas superexpressas podem indicar, por exemplo, a manutenção por um maior tempo da Semaforina 5B integral na presença de maiores concentrações de Usp33, uma enzima deubiquitinante, ou promover uma rápida degradação na presença de Stub1, uma E1 ligase de Ubiquitina.

Quanto aos ligantes Uba2 e Cript, outras técnicas como ensaios de colocalização poderão evidenciar se estas proteínas estão situadas na mesma localização celular *in vivo*, para este teste é necessário expressar em células de mamífero quantidades suficientes tanto do ligante quanto da Sema5B para que sejam passíveis de detecção utilizando-se anticorpos.

Ensaio de colocalização também podem ser executados para confirmação dos ligantes Rasgrp4, Lmcd1, Trappc6a e Trim27, outros ligantes encontrados no DH.

Para confirmar se a Sema5B é de fato SUMOilada, a produção de uma proteína com uma mutação induzida no sitio de SUMOilação putativo da Sema5B, pode ser usada para ensaios de estabilidade e localização. Um ensaio de SUMOilação em bactérias, pode ser usado para verificar o aumento da massa molecular aparente da Sema5B indicando se ela recebe esta modificação (WILKINSON et al., 2008).

7 CONCLUSÃO

Os vetores construídos ainda permitiram validar algumas das interações obtidas através do sistema de duplo-híbrido. Ensaios de *pull-down* realizados com Sema5B-His produzida em células HEK293 imobilizada em níquel-agarose foram capazes de confirmar as interações com os ligantes Stub1 e Usp33. Como discutido acima, essas interações podem estar envolvidas na estabilidade/reciclagem de Sema5B, ou ainda no crescimento axonal.

Quanto aos ligantes Uba2 e Cript, suas interações com Sema5B não puderam ser confirmadas nos ensaios de *pull-down*. É possível que estas interações de fato não ocorram. Ou então que nas condições do ensaio, essas ligações não tenham ocorrido.

REFERÊNCIAS

ADAMS, J. C.; TUCKER, R. P. The thrombospondin type 1 repeat (TSR) superfamily: diverse proteins with related roles in neuronal development. **Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 218, n. 2, p. 280–99, 2000.

ADAMS, R. H.; BETZ, H.; PÜSCHEL, A W. A novel class of murine semaphorins with homology to thrombospondin is differentially expressed during early embryogenesis. **Mechanisms of development**, v. 57, n. 1, p. 33–45, 1996.

ARTIGIANI, S.; CONROTTO, P.; FAZZARI, P.; et al. Plexin-B3 is a functional receptor for semaphorin 5A. **EMBO Reports**, v. 5, n. 7, p. 710–714, 2004.

BALLINGER, C.; CONNELL, P.; WU, Y. Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, n. 6, p. 4535–4545, 1999.

BRAUER, M. M.; RICHERI, A. Autonomic Neuroscience : Basic and Clinical Highlights in basic autonomic neuroscience : Semaphorins in the remodeling of autonomic innervation. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 174, n. 1-2, p. 1–4, 2013. Elsevier B.V.

BROWNE, K.; WANG, W.; LIU, R. Q.; PIVA, M.; O’CONNOR, T. P. Transmembrane semaphorin5B is proteolytically processed into a repulsive neural guidance cue. **Journal of neurochemistry**, v. 123, n. 1, p. 135–46, 2012.

BRÜCKNER, A.; POLGE, C.; LENTZE, N.; AUERBACH, D.; SCHLATTNER, U. Yeast Two-Hybrid, a Powerful Tool for Systems Biology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 6, p. 2763–2788, 2009.

CAFFERTY, W. B. J.; MCGEE, A. W.; STRITTMATTER, S. M. Axonal growth therapeutics: regeneration or sprouting or plasticity? **Trends in Neurosciences**, v. 31, n. 5, p. 215–220, 2008.

CONSORTIUM, T. U. UniProt: a hub for protein information. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D204–D212, 2015.

DICKSON, B. J. Molecular mechanisms of axon guidance. **Science (New York, N.Y.)**, v. 298, n. 5600, p. 1959–64, 2002.

DUAN, Y.; WANG, S.-H.; SONG, J.; et al. Semaphorin 5A inhibits synaptogenesis in early postnatal- and adult-born hippocampal dentate granule cells. **eLife**, v. 3, p. 1–24, 2014.

FAVARO, C. J. **Identificação de Ligantes de Semaforinas Classe 5 Através do Sistema de Duplo-Híbrido**, 2011. Universidade Federal do Paraná.

FIGLIORE, R.; RAHIM, B.; CHRISTOFFELS, V. M.; MOORMAN, A. F. M.; PÜSCHEL, A. W. Inactivation of the Sema5a Gene Results in Embryonic Lethality and Defective Remodeling of the Cranial Vascular System. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, n. 6, p. 2310–2319, 2005. American Society for Microbiology.

FRIEDMAN, H. V.; BRESLER, T.; GARNER, C. C.; ZIV, N. E. Assembly of New Individual Excitatory Synapses. **Neuron**, v. 27, n. 1, p. 57–69, 2000.

GAREAU, J. R.; LIMA, C. D. The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 11, n. 12, p. 861–71, 2010. Nature Publishing Group.

GEISS-FRIEDLANDER, R.; MELCHIOR, F. Concepts in sumoylation: a decade on. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 8, n. 12, p. 947–56, 2007.

GELFAND, M. V.; HONG, S.; GU, C. Guidance from above: common cues direct distinct signaling outcomes in vascular and neural patterning. **Trends in cell biology**, v. 19, n. 3, p. 99–110, 2009.

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

GODA, Y.; DAVIS, G. W. Mechanisms of Synapse Assembly and Disassembly. **Neuron**, v. 40, n. 2, p. 243–264, 2003.

GOMEZ, T. M.; ZHENG, J. Q. The molecular basis for calcium-dependent axon pathfinding. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 2, p. 115–125, 2006.

GOODMAN, C. .; KOLODKIN, A. .; LUO, Y.; PÜSCHEL, A. .; RAPER, J. . Unified Nomenclature for the Semaphorins/Collapsins. **Cell**, v. 97, n. 5, p. 551–552, 1999.

GRAS, C.; EIZ-VESPER, B.; JAIMES, Y.; et al. Secreted Semaphorin 5A Activates Immune Effector Cells and Is a Biomarker for Rheumatoid Arthritis. **Arthritis & Rheumatology**, v. 66, n. 6, p. 1461–1471, 2014.

GRILLO-BOSCH, D.; CHOQUET, D.; SAINLOS, M. Inhibition of PDZ domain-mediated interactions. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 10, n. 4, p. e531–e540, 2013.

GUNN, R. K.; HUENTELMAN, M. J.; BROWN, R. E. Are Sema5a mutant mice a good model of autism? A behavioral analysis of sensory systems, emotionality and cognition. **Behavioural Brain Research**, v. 225, n. 1, p. 142–150, 2011.

HALL, K. T.; BOUMSELL, L.; SCHULTZE, J. L.; et al. Human CD100, a novel leukocyte semaphorin that promotes B-cell aggregation and differentiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 21, p. 11780–11785, 1996.

HALLORAN, M. C.; WOLMAN, M. A. Repulsion or adhesion: receptors make the call. **Current opinion in cell biology**, v. 18, n. 5, p. 533–40, 2006.

HAYASHI, M.; NAKASHIMA, T.; TANIGUCHI, M.; et al. Osteoprotection by semaphorin 3A. **Nature**, v. 485, n. 7396, p. 69–74, 2012. Nature Publishing Group.

HEGDE, A. N. The ubiquitin-proteasome pathway and synaptic plasticity. **Learning & Memory**, v. 17, n. 7, p. 314–327, 2010.

HILARIO, J. D.; RODINO-KLAPAC, L. R.; WANG, C.; BEATTIE, C. E. Semaphorin 5A is a bifunctional axon guidance cue for axial motoneurons in vivo. **Developmental biology**, v. 326, n. 1, p. 190–200, 2009. Elsevier Inc.

HOTA, P. K.; BUCK, M. Plexin structures are coming: Opportunities for multilevel investigations of semaphorin guidance receptors, their cell signaling mechanisms, and functions. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 69, n. 22, p. 3765–3805, 2012.

HUBER, A. B.; KOLODKIN, A. L.; GINTY, D. D.; CLOUTIER, J.-F. Signaling at the growth cone: ligand-receptor complexes and the control of axon growth and guidance. **Annual review of neuroscience**, v. 26, n. 1, p. 509–63, 2003.

INAGAKI, S.; OHOKA, Y.; SUGIMOTO, H.; et al. Sema4c, a transmembrane semaphorin, interacts with a post-synaptic density protein, PSD-95. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 12, p. 9174–81, 2001.

IVANIC, J.; YU, X.; WALLQVIST, A.; REIFMAN, J. Influence of protein abundance on high-throughput protein-protein interaction detection. **PloS one**, v. 4, n. 6, p. e5815, 2009.

JANSSEN, B. J. C.; MALINAUSKAS, T.; WEIR, G. A.; et al. Neuropilins lock secreted semaphorins onto plexins in a ternary signaling complex. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 19, n. 12, p. 1293–1299, 2012.

JOHNSON, E.; SCHWIENHORST, I.; DOHMEN, R.; BLOBEL, G. The ubiquitin-like protein Smt3p is activated for conjugation to other proteins by an Aos1p/Uba2p heterodimer. **The EMBO journal**, v. 16, n. 18, p. 5509–5519, 1997.

JONGBLOETS, B. C.; PASTERKAMP, R. J. Semaphorin signalling during development. **Development**, v. 141, n. 17, p. 3292–3297, 2014.

KANTOR, D. B.; CHIVATAKARN, O.; PEER, K. L.; et al. Semaphorin 5A is a bifunctional axon guidance cue regulated by heparan and chondroitin sulfate proteoglycans. **Neuron**, v. 44, n. 6, p. 961–75, 2004.

KELLER, R. Cell migration during gastrulation. **Current opinion in cell biology**, v. 17, n. 5, p. 533–41, 2005.

KENNEDY, T. E. Cellular mechanisms of netrin function: long-range and short-range actions. **Biochemistry and cell biology Biochimie et biologie cellulaire**, v. 78, n. 5, p. 569–75, 2000.

KOLK, S. M.; GUNPUT, R.-A. F.; TRAN, T. S.; et al. Semaphorin 3F is a bifunctional guidance cue for dopaminergic axons and controls their fasciculation, channeling, rostral growth, and intracortical targeting. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 29, n. 40, p. 12542–57, 2009.

KOLODKIN, A. L.; MATTHES, D. J.; O'CONNOR, T. P.; et al. Fasciclin IV: sequence, expression, and function during growth cone guidance in the grasshopper embryo. **Neuron**, v. 9, n. 5, p. 831–45, 1992.

KOLONIN, M. G.; ZHONG, J.; FINLEY, R. L. [3] Interaction mating methods in two-hybrid systems. **Methods in enzymology**. v. 328, p.26–46, 2000.

KOROPOULI, E.; KOLODKIN, A. L. Semaphorins and the dynamic regulation of synapse assembly, refinement, and function. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 27, p. 1–7, 2014. Elsevier Ltd.

KWON, D. Y.; DIMITRIADI, M.; TERZIC, B.; et al. The E3 ubiquitin ligase mind bomb 1 ubiquitinates and promotes the degradation of survival of motor neuron protein. **Molecular biology of the cell**, v. 24, n. 12, p. 1863–71, 2013.

LEE, J. Protein tyrosine phosphatase PTPRT as a regulator of synaptic formation and neuronal development. **BMB Reports**, v. 48, n. 5, p. 249–255, 2015.

LEMMON, M. A.; SCHLESSINGER, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. **Cell**, v. 141, n. 7, p. 1117–34, 2010.

LETT, R. L. M.; WANG, W.; O'CONNOR, T. P. Semaphorin 5B is a novel inhibitory cue for corticofugal axons. **Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)**, v. 19, n. 6, p. 1408–21, 2009.

LIN, A. W.; MAN, H.-Y. Ubiquitination of neurotransmitter receptors and postsynaptic scaffolding proteins. **Neural plasticity**, v. 2013, n. Figure 1, p. 432057, 2013.

LIU, R. Q.; WANG, W.; LEGG, A.; ABRAMYAN, J.; O'CONNOR, T. P. Semaphorin 5B is a repellent cue for sensory afferents projecting into the developing spinal cord. **Development (Cambridge, England)**, v. 141, n. 9, p. 1940–9, 2014.

LONG, X.; GRIFFITH, L. C. Identification and characterization of a SUMO-1 conjugation system that modifies neuronal calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in *Drosophila melanogaster*. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 52, p. 40765–76, 2000.

MATSUOKA, R. L.; CHIVATAKARN, O.; BADEA, T. C.; et al. Class 5 transmembrane semaphorins control selective mammalian retinal lamination and function. **Neuron**, v. 71, n. 3, p. 460–473, 2011.

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

MUELLER, B. K. Growth cone guidance: first steps towards a deeper understanding. **Annual review of neuroscience**, v. 22, n. 1, p. 351–88, 1999. Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA.

NIETHAMMER, M.; VALTSCHANOFF, J. G.; KAPOOR, T. M.; et al. CRIPT, a novel postsynaptic protein that binds to the third PDZ domain of PSD-95/SAP90. **Neuron**, v. 20, n. 4, p. 693–707, 1998.

O'CONNOR, T. P.; COCKBURN, K.; WANG, W.; et al. Semaphorin 5B mediates synapse elimination in hippocampal neurons. **Neural development**, v. 4, p. 18, 2009.

OSTER, S. F.; BODEKER, M. O.; HE, F.; SRETAVAN, D. W. Invariant Sema5A inhibition serves an ensheathing function during optic nerve development. **Development Cambridge England**, v. 130, n. 4, p. 775–784, 2003.

PASTERKAMP, R. J. Getting neural circuits into shape with semaphorins. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 13, n. 9, p. 605–618, 2012. Nature Publishing Group.

PUROHIT, A.; SADANANDAM, A.; MYNENI, P.; SINGH, R. K. Semaphorin 5A mediated cellular navigation: Connecting nervous system and cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1846, n. 2, p. 485–493, 2014.

RAPER, J. A. Semaphorins and their receptors in vertebrates and invertebrates. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 10, n. 1, p. 88–94, 2000.

REVIE, D.; SMITH, D.; YEE, T. Kinetic analysis for optimization of DNA ligation reactions. **Nucleic acids research**, v. 16, n. 21, p. 10301–10321, 1988.

RODRIGUEZ, M. S. SUMO-1 Conjugation in Vivo Requires Both a Consensus Modification Motif and Nuclear Targeting. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 16, p. 12654–12659, 2001.

ROHM, B.; RAHIM, B.; KLEIBER, B.; HOVATTA, I.; PÜSCHEL, A. W. The semaphorin 3A receptor may directly regulate the activity of small GTPases. **FEBS letters**, v. 486, n. 1, p. 68–72, 2000.

ROLLMANN, S. M.; YAMAMOTO, A.; GOOSSENS, T.; et al. The Early Developmental Gene Semaphorin 5c Contributes to Olfactory Behavior in Adult *Drosophila*. **Genetics**, v. 176, n. 2, p. 947–956, 2007. Copyright © 2007 by the Genetics Society of America.

SADANANDAM, A.; ROSENBAUGH, E. G.; SINGH, S.; VARNEY, M.; SINGH, R. K. Semaphorin 5A promotes angiogenesis by increasing endothelial cell proliferation, migration, and decreasing apoptosis. **Microvascular Research**, v. 79, n. 1, p. 1–9, 2010.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCHWARZ, L.; PATRICK, G. Ubiquitin-dependent endocytosis, trafficking and turnover of neuronal membrane proteins. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 49, n. 3, p. 387–393, 2012.

SPENCER, A. Y.; LALLIER, T. E. Mechanical tension alters semaphorin expression in the periodontium. **Journal of periodontology**, v. 80, n. 10, p. 1665–73, 2009.

SWEENEY, L. B.; CHOU, Y.-H.; WU, Z.; et al. Secreted Semaphorins from Degenerating Larval ORN Axons Direct Adult Projection Neuron Dendrite Targeting. **Neuron**, v. 72, n. 5, p. 734–747, 2011.

TAMAGNONE, L.; COMOGLIO, P. M. Signalling by semaphorin receptors: cell guidance and beyond. **Trends in cell biology**, v. 10, n. 9, p. 377–83, 2000.

TAMAGNONE, L.; COMOGLIO, P. M. To move or not to move? Semaphorin signalling in cell migration. **EMBO reports**, v. 5, n. 4, p. 356–61, 2004.

TO, K. C. W.; CHURCH, J.; O'CONNOR, T. P. Combined activation of calpain and calcineurin during ligand-induced growth cone collapse. **Molecular and cellular neurosciences**, v. 36, n. 4, p. 425–34, 2007.

TOYOFUKU, T.; ZHANG, H.; KUMANOGOH, A.; et al. Guidance of myocardial patterning in cardiac development by *Sema6D* reverse signalling. **Nature cell biology**, v. 6, n. 12, p. 1204–1211, 2004.

TRENTIN, J. A. M. **Produção de domínios recombinantes de semaforina5B e identificação de seus ligantes**, 2008. UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ.

VIDAL, M.; FIELDS, S. The yeast two-hybrid assay: still finding connections after 25 years. **Nature Methods**, v. 11, n. 12, p. 1203–1206, 2014. Nature Publishing Group.

VOGRIG, A.; DORR, L.; BOUZIDI, N.; et al. Structure-Based Design of PDZ Ligands as Inhibitors of 5-HT 2A Receptor/PSD-95 PDZ1 Domain Interaction Possessing Anti-hyperalgesic Activity. **ACS Chemical Biology**, v. 8, n. 10, p. 2209–2216, 2013.

WEISS, L. A.; ARKING, D. E.; DALY, M. J.; et al. A genome-wide linkage and association scan reveals novel loci for autism. **Nature**, v. 461, n. 7265, p. 802–808, 2009.

WILKINSON, K. A.; NISHIMUNE, A.; HENLEY, J. M. Analysis of SUMO-1 modification of neuronal proteins containing consensus SUMOylation motifs. **Neuroscience letters**, v. 436, n. 2, p. 239–44, 2008.

WINBERG, M. L.; NOORDERMEER, J. N.; TAMAGNONE, L.; et al. Plexin A is a neuronal semaphorin receptor that controls axon guidance. **Cell**, v. 95, n. 7, p. 903–916, 1998.

WIT, J. DE; VERHAAGEN, J. Role of semaphorins in the adult nervous system. **Progress in neurobiology**, v. 71, n. 2-3, p. 249–67, 2003.

YANG, S. W.; OH, K. H.; PARK, E.; et al. USP47 and C Terminus of Hsp70-Interacting Protein (CHIP) Antagonistically Regulate Katanin-p60-Mediated Axonal Growth. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 31, p. 12728–12738, 2013.

YAZDANI, U.; TERMAN, J. R. The semaphorins. **Genome biology**, v. 7, n. 3, p. 211, 2006.

YOSHIDA, Y. Semaphorin Signaling in Vertebrate Neural Circuit Assembly. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, Jan. 2012.

YUASA-KAWADA, J.; KINOSHITA-KAWADA, M.; WU, G.; RAO, Y.; WU, J. Y. Midline crossing and Slit responsiveness of commissural axons require USP33. **Nature neuroscience**, v. 12, n. 9, p. 1087–9, 2009. Nature Publishing Group.

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. 471–7, 2002.