

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LEONARDO HENRIQUE SOUZA REMER

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE RhoA ANTE A INTERAÇÃO PROTEICA
STI1-Rnd1

CURITIBA

2024

LEONARDO HENRIQUE SOUZA REMER

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE RhoA ANTE A INTERAÇÃO PROTEICA
STI1-Rnd1

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Marques Zanata

CURITIBA

2024

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Remer, L. H. S.

Avaliação da atividade de RhoA ante a interação proteica STI1-Rnd1. / Leonardo Henrique Souza Remer. – Curitiba, 2024.

1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Silvio Marques Zanata.

1. Proteínas rho de Ligação ao GTP. 2. Proteína rhoA de Ligação ao GTP. 3. Transdução de Sinais. 4. Proteínas – Análise. 5. Interação proteína-proteína. 6. Citoesqueleto. I. Zanata, Silvio Marques, 1974-. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. III. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR - 40001016007P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **LEONARDO HENRIQUE SOUZA REMER** intitulada: **Avaliação da atividade de RhoA ante a interação proteica STI1-Rnd1**, sob orientação do Prof. Dr. SILVIO MARQUES ZANATA, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 27 de Setembro de 2024.

Assinatura Eletrônica

30/09/2024 11:07:38.0

SILVIO MARQUES ZANATA

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

30/09/2024 10:23:19.0

PIERINA ALEXANDRA MARTINEZ HUAMANI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

30/09/2024 15:56:57.0

MARITZA ARAUJO TODO BOM

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo apoio, companheirismo e amor incondicionais. Me faltam palavras para descrever o quão importante vocês são para mim. Vocês são minha base. Obrigado por me aceitarem como sou. Como nós somos.

Às minhas amigas e amigos próximos. Vocês sabem quem são, eu sei quem vocês são. Obrigado por sempre torcerem e vibrarem por mim. Vocês têm um espaço especial em minha memória.

À minha companheira por tudo o que temos. Pelo companheirismo, parceria, respeito e amor que compartilhamos. O caminho seria muito mais difícil sem você.

Aos meus colegas de laboratório pelo auxílio e colaboração.

À Universidade Federal do Paraná pelo aprendizado ao longo desses anos.

Ao professor Dr. Silvio Marques Zanata pela oportunidade e confiança.

A teoria sem a prática de nada vale, a prática sem a teoria é cega.
(VLADIMIR LÊNIN)

RESUMO

As proteínas Rho constituem uma família de pequenas GTPases monoméricas que são reguladoras chave do citoesqueleto. Rho GTPases clássicas como RhoA atuam como *switches* moleculares, alternando entre um estado inativo de ligação ao difosfato de guanosina (GDP) e um estado ativo, de ligação ao trifosfato de guanosina (GTP). RhoA é uma proteína ubiquamente expressa e sua atividade tem sido diretamente associada à uma ampla gama de processos biológicos. Já Rnd1 é uma Rho GTPase atípica por ser constitutivamente ativa, e tem sido relacionada à regulação da atividade de RhoA. É bem estabelecido na literatura que Rnd1 reduz a contratilidade da actomiosina através da inibição de RhoA, via ativação da proteína ativadora de GTPase (GAP) p190RhoGAP. Rnd1 pode ligar-se a diferentes proteínas, sendo uma destas a proteína STI1. STI1 é reconhecida como uma co-chaperona que age em conjunto com as chaperonas Hsp70 e Hsp90, promovendo o dobramento correto de proteínas – sendo essencial à manutenção da proteostase celular. Nosso grupo de pesquisa demonstrou anteriormente a interação específica *in vitro* entre STI1-Rnd1, sendo que tal interação inibe o colapso do cone de crescimento em células COS-7, e aumenta a extensão de neuritos em células PC-12. Assim, o presente trabalho teve por objetivo elucidar se tal interação proteica é capaz de modular a atividade de RhoA através da via Rnd1-p190RhoGAP-RhoA. A transfecção com polietilenoimina (PEI) das construções utilizadas foi padronizada em células HEK-293T. Para realizar ensaios *pulldown*, as proteínas de fusão GST-RBD e GST-RhoAG14V foram expressas em bactéria, ligadas à resina Glutathione Sepharose-4B e foi quantificado quanto de cada proteína fora ligado. Ensaios *pulldown* de RhoA-GTP foram realizados utilizando a quimera GST-RBD como *bait*. Para confirmar a especificidade de ligação à forma ativa de RhoA, ensaios de ativação de RhoA com Fator de Crescimento Epidermal (EGF) foram padronizados em células HeLa. Por fim, a atividade de RhoA foi avaliada via ensaios *pulldown* em extratos de células HeLa co-transfectadas com RhoA, STI1 e Rnd1. A co-transfecção teve baixa eficiência e não foi possível determinar a influência da interação STI1-Rnd1 sobre a atividade de RhoA. No entanto, a porção de RhoA-GTP parece ser ligeiramente maior no grupo experimental expressando STI1 e menor em células expressando Rnd1 (quando comparados ao controle). O entendimento de tal via metabólica demonstra-se importante pela perspectiva da relação das proteínas estudadas com a oncogênese e a migração tumoral. Assim, espera-se que os resultados obtidos possam colaborar na construção do conhecimento acerca da regulação do citoesqueleto.

Palavras-chave: Rho GTPases; sinalização celular; STI1; interações proteicas; *pulldown*.

ABSTRACT

Rho proteins constitute a family of monomeric small GTPases that are key regulators of the cytoskeleton. Classical Rho GTPases such as RhoA act as molecular switches, alternating between an inactive guanosine diphosphate (GDP)-binding state and an active guanosine triphosphate (GTP)-binding state. RhoA is a ubiquitously expressed protein and its activity has been directly associated with a wide range of biological processes. Rnd1 is an atypical Rho GTPase as it is constitutively active, and has been related to the regulation of RhoA activity. It is well established in the literature that Rnd1 reduces actomyosin contractility through inhibition of RhoA, via activation of the GTPase-activating protein (GAP) p190RhoGAP. Rnd1 can bind to different proteins, one of which is the STI1 protein. STI1 is recognized as a co-chaperone that acts in conjunction with the Hsp70 and Hsp90 chaperones, promoting the correct folding of proteins – being essential for the maintenance of cellular proteostasis. Our research group previously demonstrated the specific *in vitro* interaction between STI1-Rnd1, with this interaction inhibiting growth cone collapse in COS-7 cells, and increasing neurite extension in PC-12 cells. Thus, the present work aimed to elucidate whether such protein interaction is capable of modulating RhoA activity through the Rnd1-p190RhoGAP-RhoA pathway. Polyethyleneimine (PEI) transfection of the used constructs was standardized in HEK-293T cells. To perform pulldown assays, GST-RBD and GST-RhoAG14V fusion proteins were expressed in bacteria, bound to Glutathione Sepharose-4B resin and how much of each protein was bound was quantified. RhoA-GTP pulldown assays were performed using the GST-RBD chimera as bait. To confirm the specific binding to the active form of RhoA, RhoA activation assays with Epidermal Growth Factor (EGF) were standardized in HeLa cells. Finally, RhoA activity was assessed via pulldown assays in extracts from HeLa cells co-transfected with RhoA, STI1 and Rnd1. Co-transfection had low efficiency and it was not possible to determine the influence of the STI1-Rnd1 interaction on RhoA activity. However, the portion of RhoA-GTP seems to be slightly bigger in the experimental group expressing STI1 and smaller in cells expressing Rnd1 (when compared to the control). Understanding this metabolic pathway is important from the perspective of the relationship between the studied proteins with oncogenesis and tumor migration. Thus, it is expected that the results obtained will contribute to the construction of knowledge about the regulation of the cytoskeleton.

Keywords: RhoGTPases; cell signaling; STI1; protein interactions; *pulldown*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DA MALHA FORMADA PELO CITOESQUELETO.....	21
FIGURA 2 - RESUMO DO CICLO DE ATIVAÇÃO E DESATIVAÇÃO DE RhoGTPases.....	23
FIGURA 3 - SINALIZAÇÃO DE RhoA SOBRE ALGUMAS PROTEÍNAS EFETORAS	25
FIGURA 4 - COMO Rnd1 ANTAGONIZA A ATIVIDADE DE RhoA ATRAVÉS DE p190RhoGAP	27
FIGURA 5 - Rnd1 ESTÁ ENVOLVIDA NA FORMAÇÃO DE CONEXÕES NERVOSAS	28
FIGURA 6 - ILUSTRAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO INVESTIGADA	32
FIGURA 7 - EXPRESSÃO DE EGFP-mRhoA EM CÉLULAS HEK-293T DETECTADA VIA <i>WESTERN BLOTTING</i>	49
FIGURA 8 - NÃO FOI POSSÍVEL DETECTAR A EXPRESSÃO DE c-Myc-mRhoA EM CÉLULAS HEK-293T VIA <i>WESTERN BLOTTING</i>	50
FIGURA 9 - EXPRESSÃO DE c-Myc-RhoA EM CÉLULAS HEK-293T DETECTADA VIA <i>WESTERN BLOTTING</i>	51
FIGURA 10 - EXPRESSÃO DE HA-Rnd1 EM CÉLULAS HEK-293T DETECTADA VIA <i>WESTERN BLOTTING</i>	52
FIGURA 11 - EXPRESSÃO DE EGFP-mSTI1 EM CÉLULAS HEK-293T DETECTADA VIA <i>WESTERN BLOTTING</i>	53
FIGURA 12 - GÊIS CONFIRMANDO AS EXPRESSÕES DE GST-RBD E GST-RhoAG14V	56
FIGURA 13 - QUANTIFICAÇÃO DE GST-RBD E GST-RhoAG14V LIGADAS ÀS BEADS	57
FIGURA 14 - NÃO FOI POSSÍVEL DETECTAR RhoA ENDÓGENA E AVALIAR A ATIVAÇÃO COM EGF	59
FIGURA 15 - A ATIVAÇÃO DE EGFP-mRhoA NÃO FOI EFICIENTE EM CÉLULAS HEK-293T	60
FIGURA 16 - A ATIVAÇÃO DE EGFP-mRhoA FOI EFICIENTE EM CÉLULAS HeLa	62

FIGURA 17 - CO-TRANSFECÇÃO DE CÉLULAS HeLa COM EGFP-mRhoA E HA-Rnd1 DIMINUIU A PORÇÃO DE RhoA ATIVA	64
FIGURA 18 - A TRIPLA CO-TRANSFECÇÃO FOI POUCO EFICIENTE EM CÉLULAS HeLa	66

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - ANÁLISE DENSITOMÉTRICA DEMONSTRA ATIVIDADE SIMILAR DE EGFP-mRhoA EM CÉLULAS HEK-293T ATIVADAS E NÃO- ATIVADAS	61
GRÁFICO 2 - ANÁLISE DENSITOMÉTRICA REVELA MAIOR ATIVIDADE DE EGFP-mRhoA EM CÉLULAS HeLa ATIVADAS	63
GRÁFICO 3 - ANÁLISE DENSITOMÉTRICA APONTA MENOR ATIVIDADE DE RhoA NO GRUPO CO-TRANSFECTADO COM HA-Rnd1	65

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ANTICORPOS UTILIZADOS.....	33
TABELA 2 - VETOR E CONSTRUÇÕES UTILIZADAS	34
TABELA 3 - ANTIBIÓTICOS DE SELEÇÃO DE CADA PLASMÍDIO	35
TABELA 4 - RESULTADOS OBTIDOS DA VALIDAÇÃO DE CONSTRUÇÕES	54
TABELA 5 - RESULTADOS OBTIDOS DA VALIDAÇÃO DE ANTICORPOS	55

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

C	Cisteína
C-terminal	Carboxi-terminal
Cdc42	Homólogo 42 da proteína de controle da divisão celular
DMEM	Meio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco
DTT	Ditiotreitol
EGF	Fator de crescimento epidermal
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidermal
EGFP	Proteína fluorescente verde aprimorada
EMT	Transição epitélio-mesenquimal
F-actina	Actina filamentosa
G	Glicina
G-actina	Actina globular
GAP	Proteína ativadora de GTPase
GDI	Inibidor de dissociação de nucleotídeo guanina
GDP	Difosfato de guanosina
GEF	Fator de troca de guanina
GTP	Trifosfato de guanosina
GST	Glutathione-S-Transferase
Hsp	Proteína de choque térmico
HRP	Peroxidase de raiz forte
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
LB	Luria Bertani
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
N-terminal	Amino-terminal
OD ₆₀₀	Densidade ótica a 600 nanômetros
PEI	Polietilenoimina
PBS	Tampão fosfato-salino
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
Rac1	Substrato 1 da toxina botulínica C3 relacionado a Ras
RBD	Domínio de ligação a Rho
Rho	Homólogo a Ras
RPM	Rotações por minuto

SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
shRNA	RNA <i>hairpin</i> pequeno
SNAI1	Gene da proteína dedo de zinco SNAI1
SNAI2	Gene da proteína dedo de zinco SNAI2
STI1	Proteína induzível por estresse 1
SV40	Vírus vacuolante símio 40
TBS	Solução salina tamponada com Tris
TWIST1	Gene da proteína 1 relacionada à torção
V	Valina
Y	Tirosina

LISTA DE SÍMBOLOS

™ - marca comercial não registrada

® - marca registrada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 OBJETIVOS	19
1.1.1 Objetivo geral	19
1.1.2 Objetivos específicos.....	19
1.1.3 JUSTIFICATIVA	20
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 PROTEÍNAS Rho E RhoA.....	22
2.2 UMA PROTEÍNA Rho ATÍPICA: Rnd1 E SEUS VÁRIOS LIGANTES	26
2.3 STI1: MUITO MAIS QUE UMA CO-CHAPERONA.....	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 ANTICORPOS E CONSTRUÇÕES UTILIZADAS	33
3.2 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA COM OS PLASMÍDIOS DE INTERESSE ..	35
3.3 PURIFICAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL.....	36
3.4 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE BRADFORD	36
3.5 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA DESNATURANTE (SDS-PAGE)	37
3.5.1 Coloração com Azul de Comassie	37
3.5.2 Imunodeteção proteica (<i>Western blotting</i>)	38
3.6 EXPRESSÃO EM PEQUENA ESCALA DE GST-RBD E GST-RhoAG14V	39
3.7 PRODUÇÃO DE GST-RBD LIGADA À GLUTATIONA SEPHAROSE 4B E QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA LIGADA À RESINA.....	39
3.8 PRODUÇÃO DE GST-RhoAG14V LIGADA À GLUTATIONA SEPHAROSE 4B E QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA LIGADA À RESINA.....	41
3.9 CULTIVO CELULAR	41
3.9.1 Cultivo celular de células HEK-293T e HeLa.....	41
3.9.2 Padronização de transfecção com polietilenoimina em células HEK-293T e validação de anticorpos.....	42
3.10 PADRONIZAÇÃO DO <i>PULLDOWN</i> DE RhoA-GTP	43
3.10.1 Padronização do <i>pulldown</i> de RhoA-GTP: ensaio de ativação com EGF em células HEK-293T	43
3.10.2 Padronização do <i>pulldown</i> de RhoA-GTP: ensaio de ativação com EGF em células HeLa.....	45

3.11 <i>PULLDOWN</i> DE RhoA-GTP EM CÉLULAS HeLa CO-TRANSFECTADAS EXPRESSANDO EGFP-mRhoA E HA-Rnd1	45
3.12 <i>PULLDOWN</i> DE RhoA-GTP EM CÉLULAS HeLa CO-TRANSFECTADAS EXPRESSANDO EGFP-mRhoA, EGFP-mSTI1 E HA-Rnd1	46
3.13 DENSITOMETRIA E ANÁLISE ESTATÍSTICA DE DADOS	47
4 RESULTADOS OBTIDOS	48
4.1 VALIDAÇÃO DE CONSTRUÇÕES E DE ANTICORPOS	48
4.2 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS DE FUSÃO GST-RBD E GST-RhoAG14V, LIGAÇÃO À RESINA E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA LIGADA.....	55
4.3 ENSAIO DE ATIVAÇÃO COM EGF EM CÉLULAS HEK-293T	58
4.4 ENSAIO DE ATIVAÇÃO COM EGF EM CÉLULAS HeLa	61
4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE RhoA EM CÉLULAS HeLa CO-TRANSFECTADAS COM EGFP-mRhoA E HA-Rnd1	63
4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE RhoA EM CÉLULAS HeLa CO-TRANSFECTADAS COM EGFP-mRhoA, EGFP-mSTI1 E HA-Rnd1	65
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
ANEXO 1 - AVALIAÇÃO VISUAL DA EFICIÊNCIA DE TRANSFEÇÃO	82
ANEXO 2 - DIGESTÃO ENZIMÁTICA PARA AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DO PLASMÍDIO pBK-CMV-c-Myc-RhoA.....	83

1 INTRODUÇÃO

O citoesqueleto é uma estrutura extremamente importante à estruturação e ao funcionamento celular adequado, sendo essencial a diversos processos da biologia celular (HOHMANN, 2019). As proteínas que o constituem formam uma rede complexa, altamente estruturada e dinâmica, que possui a capacidade de responder a estímulos intra e extracelulares (GAO, 2022). A malha do citoesqueleto é constituída através da polimerização e despolimerização de suas principais proteínas componentes, assim como pela interação entre estas (PAAVILAINEN, 2004).

Tais processos são regulados por diversas proteínas e moléculas acessórias, e culminam na formação de estruturas organizadas e funcionais (HOHMANN, 2019). Em enfermidades como o câncer, o descontrole da migração celular em células cancerígenas leva à invasão de tecidos adjacentes e da vasculatura, e, por fim, à metástase (HALL, 2009).

As proteínas Rho constituem uma família de GTPases monoméricas reguladoras cruciais do citoesqueleto. Tal família possui até o momento 20 membros identificados em humanos, e seus integrantes podem ser classificados ainda em clássicos e atípicos (MOULY, 2019). As Rho GTPases clássicas como RhoA atuam como interruptores moleculares, alternando entre um estado inativo de ligação GDP e um estado ativo, de ligação ao GTP. Quando ativas, as Rho GTPases se associam às membranas e interagem seletivamente com proteínas efetoras e outras proteínas de *scaffolding*, estimulando uma ampla gama de processos biológicos (PHUYAL, 2019).

Entre as proteínas Rho clássicas, uma das mais estudadas e conservadas entre os organismos é RhoA. Sendo uma proteína de expressão ubíqua, a RhoA humana possui aproximadamente 22 kDa, sendo responsável pela ativação de proteínas como as quinases associadas à Rho (ROCKs), LIM quinases (LIMKs) e mDia1 (HOHMANN, 2019; LESSEY, 2012). Assim, a atividade de RhoA tem sido diretamente associada à formação, maturação e regulação de estruturas como fibras de estresse, adesões focais e protrusões de membrana (HEASMAN, 2008; PELLEGRIN, 2007).

No contexto do câncer, RhoA geralmente aparece superexpressa (HAGA, 2016). As mutações em RHOA, presentes em diferentes tipos de câncer, acumulam-se em regiões importantes para a interação com reguladores e efetores, alterando o interatoma de RhoA. Isso prejudica algumas interações enquanto favorece outras, o

que leva à sinalização diferencial de RhoA em células mutantes no gene RHOA (CROSAS-MOLIST, 2022). Medicamentos que visam efetores à jusante de RhoA, como ROCK, estão sob investigação para potenciais usos como terapias contra o câncer.

A Rnd1 humana é uma proteína de aproximadamente 26 kDa, e sendo uma proteína Rho atípica, difere de outros membros da família proteica por possuir uma atividade GTPásica muito baixa – ou seja, se encontra constitutivamente ligada ao GTP (MOULY, 2019). Rnd1 ativa encontra-se associada à membrana plasmática, em domínios conhecidos como *lipid rafts* e tem sido relacionada na literatura à regulação da atividade de RhoA – e, portanto, à plasticidade do citoesqueleto. O primeiro efeito celular promovido por Rnd1 relatado foi sobre a morfologia celular, pois a superexpressão de Rnd1 em fibroblastos resulta em um fenótipo celular arredondado (NOBES, 1998).

O primeiro mecanismo descrito para explicar como Rnd1 reduz a contratilidade da actomiosina é através da inibição de RhoA (WENNERBERG, 2003). A ligação de Rnd1 a outras proteínas efetoras já foi demonstrada, revelando outros aspectos da sua função em relação ao citoesqueleto. Uma das proteínas com a qual Rnd1 pode interagir é STI1, sendo que tal interação inibe o colapso do cone de crescimento induzido pela interação Rnd1-Plexina A1 em células COS-7, e aumenta a extensão de neuritos em células PC-12 (DE SOUZA, 2014).

Assim como RhoA e outras GTPases (BUSTELO, 2018), a expressão dos transcritos RND1 é alterada em cânceres. As alterações da expressão de RND1 em tumores sugerem um papel potencial de RND1 na oncogênese. No tecido mamário, a perda de RND1 induz tumorigênese em células epiteliais mamárias (OKADA, 2015). Em contrapartida, a reintrodução do gene RND1 em células tumorais mamárias retarda o crescimento tumoral (OKADA, 2015).

Em células de carcinoma hepatocelular a depleção de RND1 causa transição epitélio-mesenquimal através da ativação de RhoA (QIN, 2018). No que diz respeito ao papel de RND1 na proliferação e migração de células tumorais, os resultados parecem depender do tipo de tumor (MOULY, 2019). Em células de carcinoma hepatocelular, o aumento da invasão induzida pela depleção de RND1 é mediada pela ativação de RhoA (QIN, 2018). RND1 também foi descrito como um fator prognóstico de sobrevivência para pacientes com câncer de mama negativo para receptor de estrogênio (OKADA, 2015), com carcinoma hepatocelular (QIN, 2018; KOMATSU,

2017) ou glioblastoma (BOYRIE, 2018). Nestes tumores, uma expressão fraca de RND1 está correlacionada com um mau prognóstico.

A proteína induzível por estresse (STI1), é uma co-chaperona expressa na maior parte dos tecidos. Em conjunto com as chaperonas Hsp70 e Hsp90, ela promovendo o dobramento correto de proteínas – sendo essencial à manutenção da homeostase e da proteostase celular (DA FONSECA, 2020). A STI1 humana é uma proteína de 543 aminoácidos com uma massa molecular de aproximadamente 62.6 kDa (HONORÉ, 1992).

Além do citosol e do núcleo, a localização subcelular de STI1 também já foi descrita no complexo de Golgi (HONORÉ, 1992) e na membrana celular (ZANATA, 2002b). O papel do complexo HSP70/HSP90/STI1 é importante em doenças neurodegenerativas e quando comprometida sua funcionalidade, é possível verificar o acúmulo de fibrilas amilóides (LACKIE, 2017).

Ademais, vários estudos já apontaram STI1 como um biomarcador de câncer – tanto para o diagnóstico quanto para o prognóstico da doença (LUO, 2018; ZHANG, 2018; BAINBUR-HUDSON, 2015; ERLICH, 2007) – e existem evidências crescentes que ligam tal proteína à migração celular, e portanto, à regulação do citoesqueleto de actina (YIN, 2019; WILLMER, 2013; TSAI, 2012). Sendo assim, STI1 parece ser um fator relevante na tumorigênese e na invasividade de cânceres.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Elucidar se a interação proteica STI1-Rnd1 possui efeito modulatório sobre a atividade da proteína RhoA.

1.1.2 Objetivos específicos

- Expressar proteínas de fusão *baît*, acoplá-las à resina Glutathione Sepharose 4B e quantificar quanta proteína fora acoplada;
- Padronizar a transfecção com polietilenoimina dos vetores utilizados em células HEK-293T;
- Validar e padronizar a diluição de anticorpos para detecção via *Western blotting*;

- Validar o *pulldown* da forma ativa de RhoA, avaliando a especificidade de interação da construção GST-RBD via ensaios de ativação de RhoA em células HeLa;
- Avaliar a atividade de RhoA em células HeLa co-transfectadas com RhoA, STI1 e Rnd1.

1.1.3 JUSTIFICATIVA

Nosso grupo de pesquisa demonstrou a interação específica *in vitro* entre STI1 e Rnd1, e já é bem estabelecido na literatura que Rnd1 diminui a atividade de RhoA. Considerando que as expressões de tais proteínas e seus respectivos transcritos estão alteradas em diferentes tipos de câncer, e ainda que, RhoA possui papéis relevantes na oncogênese, progressão e disseminação do câncer; a compreensão da regulação do citoesqueleto por tais proteínas é de suma importância. Entende-se que a elucidação da via metabólica investigada possibilitará a definição de potenciais alvos terapêuticos e biomarcadores do câncer, tanto para o diagnóstico quanto para o prognóstico.

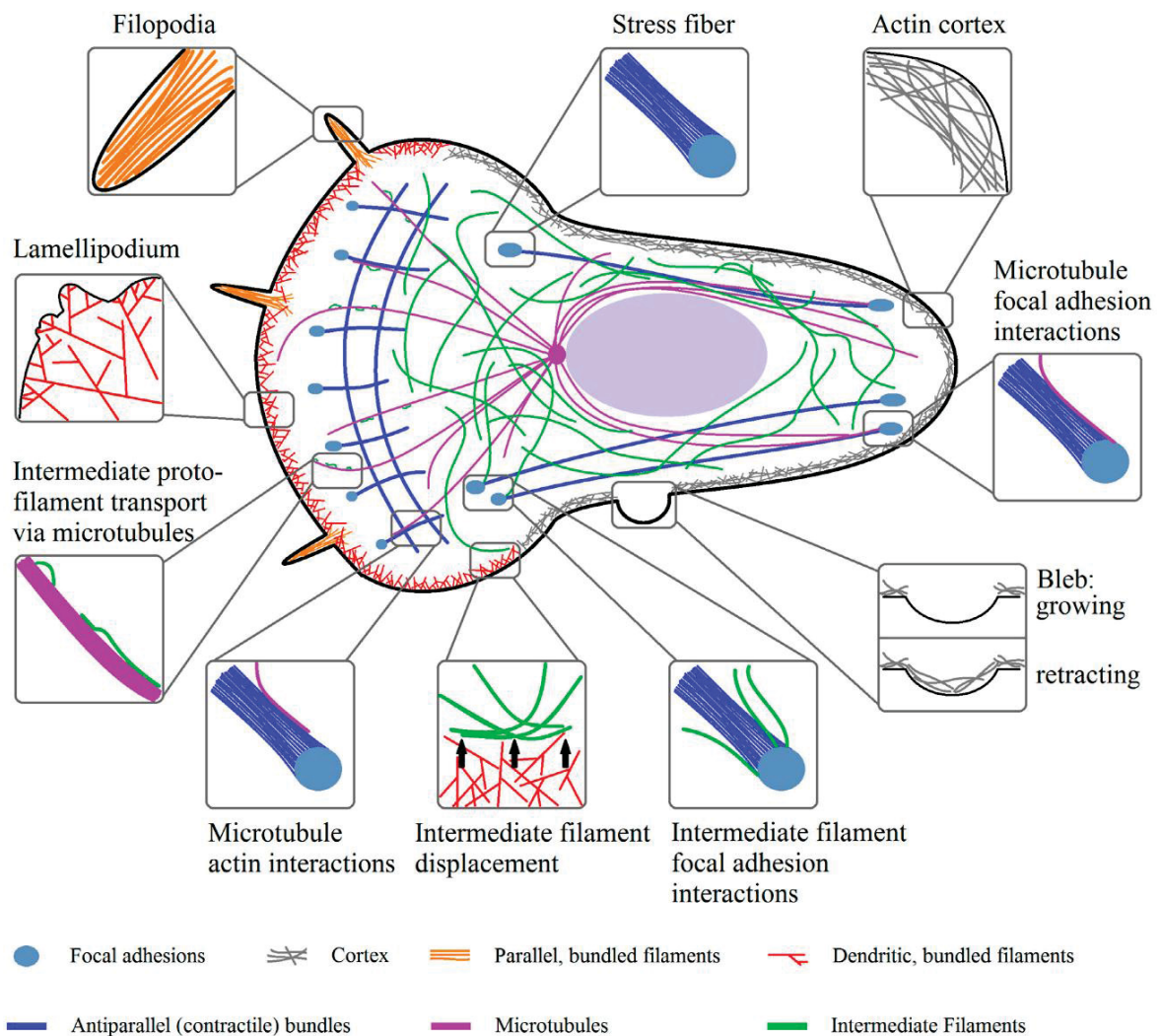
2 REVISÃO DE LITERATURA

O citoesqueleto é uma estrutura extremamente importante à estruturação e ao funcionamento celular adequado. Este tem como principais componentes os microfilamentos de actina, microtúbulos, filamentos intermediários e septinas (TANG, 2017; MOSTOWY, 2012). Sendo vital em diversos processos chave da biologia da célula, o citoesqueleto é responsável por conferir a esta sua morfologia, promover a migração celular, a citocinese, a organização de componentes e organelas intracelularmente, e permitir a aderência à matriz extracelular (HOHMANN, 2019).

As proteínas que o constituem formam uma rede complexa, altamente estruturada e dinâmica, que é capaz de responder a estímulos intra e extracelulares. Esta característica permite não só a comunicação intercelular, mas garante também a adaptabilidade necessária à sobrevivência da célula (GAO, 2022; HOHMANN, 2019). A malha do citoesqueleto é constituída através da polimerização/despolimerização de suas principais proteínas componentes, assim como pela interação entre estas (PAAVILAINEN, 2004). Tais processos são regulados

por diversas proteínas e moléculas acessórias, e culminam na formação de estruturas organizadas e funcionais como lamelipódios, filopódios, fibras de estresse, adesões focais e o córtex celular (HOHMANN, 2019).

FIGURA 1 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DA MALHA FORMADA PELO CITOESQUELETO



FONTE: Hohmann (2019).

LEGENDA: Estruturas organizacionais de actina, microtúbulos e filamentos intermediários dentro de uma célula e suas interações físicas. Estão destacadas estruturas organizadas e funcionais como lamelipódios, filopódios, fibras de estresse, adesões focais e o córtex de actina. Notavelmente, as três classes de proteínas que compõem o citoesqueleto interagem diretamente umas com as outras. Azul = filamentos de actina antiparalelos (contráteis); Laranja = filamentos de actina agrupados paralelamente entre si; Roxo = microtúbulos; Verde = filamentos intermediários; Vermelho = filamentos de actina agrupados em conformação dendrítica.

Dentre os componentes do citoesqueleto, a actina é um dos mais estudados pela sua importância em fenômenos celulares como a citocinese, migração e a endocitose. Em organismos multicelulares, o citoesqueleto de actina também gera a

força necessária para diferentes processos de morfogênese, como o dobramento de epitélios e a navegação axonal (MCCORMICK, 2020; PANTALONI, 2001). Já em enfermidades como o câncer, o descontrole da migração celular em células cancerígenas leva à invasão de tecidos adjacentes e da vasculatura, e, por fim, à metástase (HALL, 2009).

As proteínas associadas à actina atuam sobre a G-actina e a F-actina regulando suas dinâmicas e arquiteturas e, em última instância, controlam as estruturas e os processos celulares pelos quais o citoesqueleto de actina é responsável. As proteínas de ligação à actina podem ser consideradas um subgrupo dentre as proteínas associadas à actina. Proteínas que se ligam à F-actina controlam a nucleação, polimerização/despolimerização e o *crosslinking* dos microfilamentos, enquanto as proteínas de ligação à G-actina regulam o tamanho, localização e a dinâmica do grande *pool* de actina monomérica nas células (GAO, 2022; POLLARD, 2016). Portanto, sob a perspectiva da importância das proteínas associadas à actina, a presente pesquisa visa elucidar os efeitos moleculares e morfológicos de interações entre proteínas de tal classe.

2.1 PROTEÍNAS Rho E RhoA

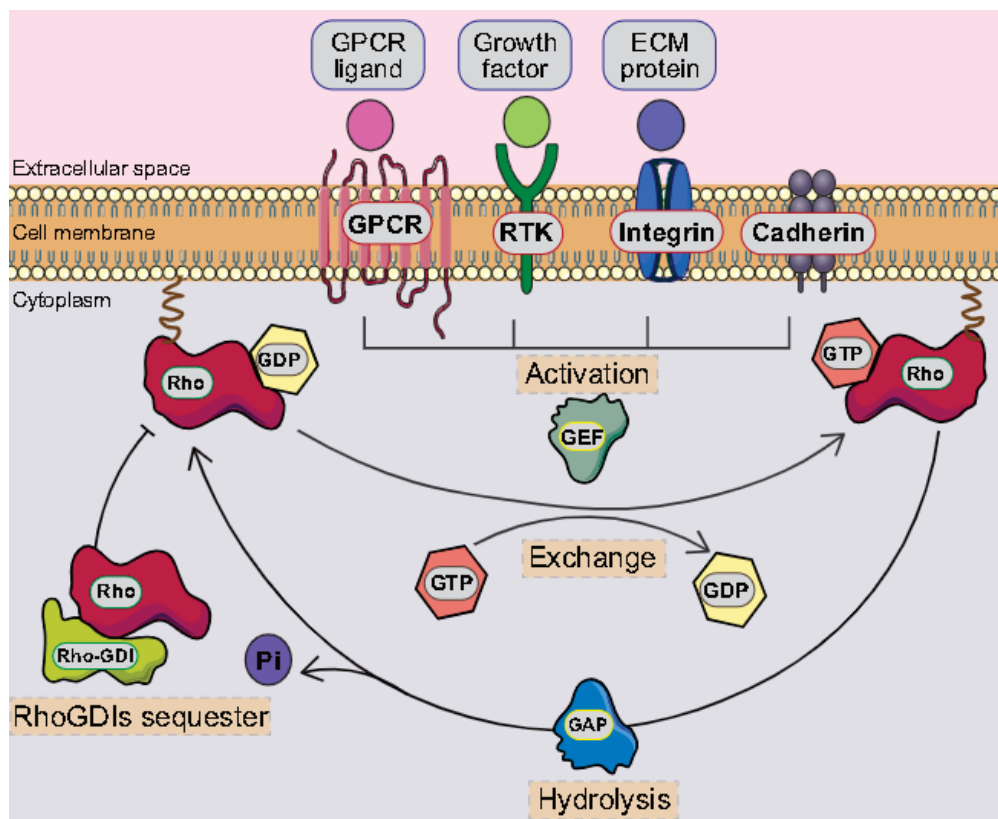
As proteínas Rho constituem uma família de pequenas GTPases monoméricas (20-30 kDa) que são reguladoras chave do citoesqueleto de actina. Tal família possui até o momento 20 membros identificados em humanos, e seus integrantes podem ser classificados ainda em clássicos e atípicos (MOULY, 2019). As Rho GTPases clássicas como RhoA, Cdc42 e Rac1, atuam como *switches* moleculares, alternando entre um estado inativo de ligação ao difosfato de guanosina (GDP) e um estado ativo, de ligação ao trifosfato de guanosina (GTP).

A ligação de um sinal extracelular a um receptor na superfície externa da membrana celular muda a conformação de tal receptor, levando à ativação intracelular das proteínas Rho. Tal sinal pode ser um ligante de um receptor acoplado à proteína G, um fator de crescimento que se liga a um receptor tirosina-quinase, ou ainda, uma proteína da matriz extracelular ligante de dada integrina (CROSAS-MOLIST, 2022). Quando ativas, as Rho GTPases se associam às membranas e interagem seletivamente com efetores a jusante e outras proteínas de *scaffolding*, estimulando uma ampla gama de processos biológicos, que incluem: reorganização do

citoesqueleto de actina, regulação do tráfego de membranas, motilidade celular, desenvolvimento neuronal, divisão celular e adesão (PHUYAL, 2019; HEASMAN, 2008).

O ciclo de ligação a GDP/GTP depende de três conjuntos de proteínas: fatores de troca de nucleotídeo guanina (GEFs), proteínas ativadoras de GTPase (GAPs) e inibidores de dissociação de nucleotídeo guanina (GDIs). Os GEFs facilitam a troca de GDP por GTP, enquanto as GAPs promovem a hidrólise de GTP em GDP através da estimulação da atividade GTPásica intrínseca das proteínas Rho clássicas. Já os GDIs, por sua vez, são fatores que interagem com as Rho-GDP cobrindo o grupo geranilgeranil presente no C-terminal destas, e formam um complexo Rho-GDP-GDI estável no citosol (PHUYAL, 2019; LESSEY, 2012).

FIGURA 2 - RESUMO DO CICLO DE ATIVAÇÃO E DESATIVAÇÃO DE RhoGTPases



FONTE: Crosas-Molist *et al* (2022).

LEGENDA: Ilustração do ciclo de ativação e desativação de uma proteína Rho clássica. Após um ligante extracelular ativar seu respectivo receptor, a conformação da porção intracelular do receptor é alterada e um GEF interage com tal porção, sendo ativado. O GEF ativa uma RhoGTPase associada à membrana, estimulando a troca de GDP por GTP. A GTPase ativada interage com um efetor à jusante e em seguida uma GAP liga-se a ela. A GAP estimula a atividade GTPásica de Rho, e esta hidrolisa GTP. A proteína pode ainda ser sequestrada no citosol por uma GDI, inibindo sua associação à membrana. Cadherin = caderina; Cell membrane = membrana celular; Cytoplasm = citoplasma;

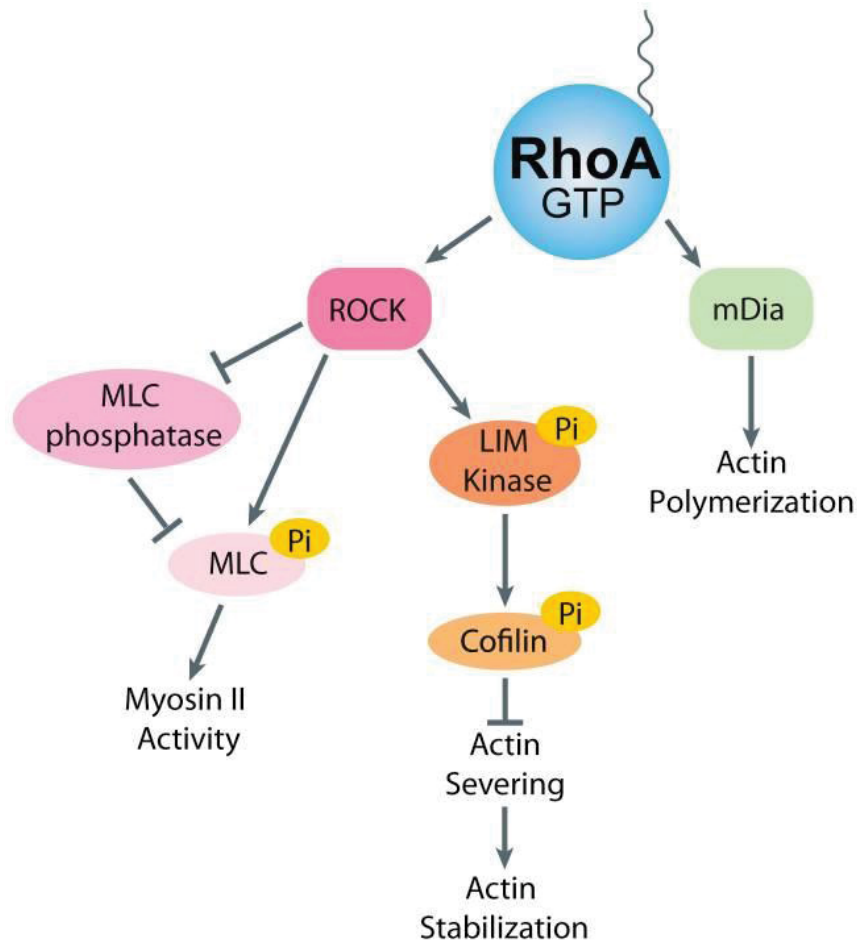
Extracellular space = espaço extracelular; GPCR = receptor acoplado à proteína G; Integrin = integrina; RTK = receptor tirosina quinase.

Entre as proteínas Rho clássicas, uma das mais estudadas e conservadas entre os organismos é RhoA. A RhoA humana é uma proteína ubiquamente expressa de aproximadamente 22 kDa, sendo responsável pela ativação de proteínas como as quinases associadas à Rho (ROCKs), LIM quinases (LIMKs) e mDia1 (HOHMANN, 2019; LESSEY, 2012). As proteínas efetoras geralmente são ativadas por mudanças conformacionais, desestruturando conformações autoinibitórias e expondo novos domínios funcionais – permitindo a ligação às proteínas subsequentes das respectivas vias (BISHOP, 2000).

Em linhas gerais, a ativação de ROCKs promove a atividade da miosina II, através do aumento do nível de fosforilação da cadeia leve reguladora da miosina (MLC). A fosforilação da MLC promove a montagem da miosina II em filamentos bipolares, e aumenta a atividade ATPásica da miosina. Juntos, esses efeitos aumentam a força contrátil gerada pela miosina II sobre os filamentos de actina (AMANO, 2010; NARUMIYA, 2009).

As ROCKs ativadas também fosforilam e ativam as LIMKs. Estas, por sua vez, fosforilam as cofilinas e inibem o mecanismo de quebra de F-actina destas. Por meio da inibição de tal atividade das cofilinas, a estabilidade dos filamentos de actina é aumentada. Já a ativação do fator de nucleação mDia1 por RhoA, estimula a polimerização de microfilamentos de actina. Assim, a atividade de RhoA tem sido diretamente associada à formação, maturação e regulação de estruturas como fibras de estresse, adesões focais e protrusões de membrana (HEASMAN, 2008; PELLEGRIN, 2007).

FIGURA 3 - SINALIZAÇÃO DE RhoA SOBRE ALGUMAS PROTEÍNAS EFETORAS



FONTE: Lessey *et al* (2012).

LEGENDA: RhoA ativa interage com proteínas efetoras para levar à contratilidade da actomiosina e estabilização da actina filamentosa. As ROCKs sinalizam através de fosforilação da cadeia leve da miosina e das LIM quinases, aumentando a atividade da miosina II e a estabilização da F-actina, respectivamente. RhoA ativada também interage com a formina mDia, que nucleia a polimerização de actina. Cofilin = cofilina; LIM Kinase = LIM quinase; MLC = cadeia leve da miosina; MLC phosphatase = fosfatase da cadeia leve da miosina; Pi = fosfato inorgânico; ROCK = quinase associada à Rho.

No contexto do câncer, RhoA geralmente aparece superexpressa em vez de ter sua expressão regulada negativamente (HAGA, 2016; DEL PULGAR, 2005). As mutações em RHOA, presentes em diferentes tipos de câncer, acumulam-se em regiões importantes para a interação com reguladores e efetores, alterando a capacidade de RhoA interagir com estas proteínas. Isso prejudica algumas interações enquanto favorece outras, o que leva à sinalização diferencial de RhoA em células mutantes no gene RHOA (CROSAS-MOLIST, 2022).

RHOA está mutado em 15-25% dos carcinomas gástricos difusos estudados, sendo Y42C a substituição mais comum (THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, 2014). Mutantes expressando RhoAY42C escaparam da

apoptose por anoikis e promoveram a formação de colônias organoides intestinais, independentemente do tratamento com Y27632 (WANG, 2014). O fármaco Y27632 inibe ROCK e PKN (proteína quinase N), entre outras quinases. Estudos seminais demonstraram que a mutação Y42C prejudica a ligação de RhoA a PKN, mas ainda permite a ligação a outros efetores, incluindo ROCK1 e mDIA2 (SAHAI, 1998).

Comumente, a atividade de RhoA é medida através da ligação a sua proteína efetora Rhotekina *in vitro* (REN, 1999). A proteína mutante RhoAY42C apresentou ligação reduzida ao domínio de ligação a Rho da Rhotekina (RBD) em ensaios *pulldown* (WANG, 2014). No carcinoma gástrico difuso, as mutações em RhoA são geralmente concomitantes com a perda das mutações em E-caderina ou P53 (WANG, 2014). RhoAY42C cooperou com a perda do supressor de tumor E-caderina, induzindo câncer gástrico difuso em um modelo murino, fornecendo validação de que RHOAY42C possa ser um oncogene (ZHANG, 2020).

RhoAY42C poderia direcionar sinais para funções pró-tumorigênicas específicas dirigidas por ROCK nesses cânceres, sendo que a mutação Y42C aumentou a estabilidade proteica de RhoA (LIU, 2019). RhoAY42C exibe hidrólise de GTP reduzida e um aumento de interação com seu efector ROCK, enquanto a capacidade de se ligar a GEFs ou GDIs permanece inalterada (ZHANG, 2020).

Tais dados indicam que os ensaios *pulldown* utilizando RBD podem não medir com precisão a atividade de RhoAY42C e que, em células cancerígenas, a cooperação com outras vias e a sinalização preferencial ainda precisam ser totalmente compreendidas. Medicamentos que visam efetores à jusante de RhoA, como ROCK, estão sob investigação para potenciais usos como terapias contra o câncer (CROSAS-MOLIST, 2022).

2.2 UMA PROTEÍNA Rho ATÍPICA: Rnd1 E SEUS VÁRIOS LIGANTES

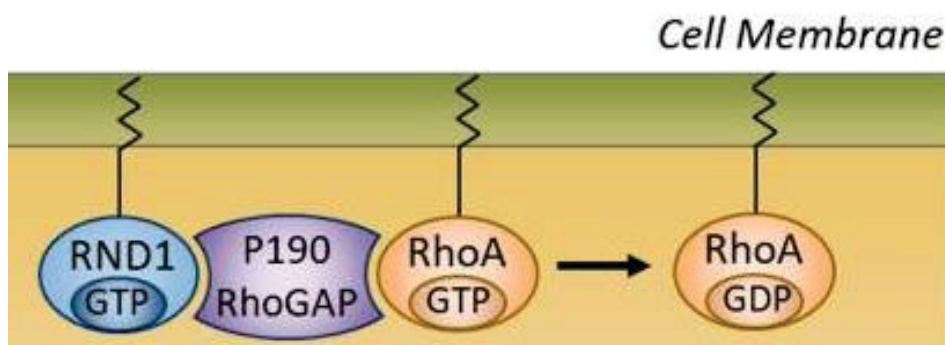
As proteínas Rho atípicas como Rnd1 diferem de outros membros da família proteica por possuírem uma atividade GTPásica muito baixa e, portanto, estarem constitutivamente ligadas ao GTP. Rnd1 ativa encontra-se associada à membrana plasmática, em domínios conhecidos como *lipid rafts*. Isso ocorre devido à sequência KERRA de aminoácidos em sua porção N-terminal e à sua farnesilação na extremidade C-terminal (OINUMA, 2012). Portanto, a atividade de Rnd1 parece ser

mais dependente de mecanismos de regulação epigenéticos, transcricionais, pós-transcricionais e pós-traducionais do que da troca de GDP/GTP (RIOU, 2010).

A Rnd1 humana é uma proteína de aproximadamente 26 kDa, e tem sido relacionada na literatura à regulação da atividade de RhoA – e, portanto, à plasticidade do citoesqueleto (MOULY, 2019). O primeiro efeito celular promovido por Rnd1 descrito foi sobre a morfologia celular, devido à redução de contratibilidade da actomiosina. A expressão de Rnd1 induz a perda de fibras de estresse e de adesões focais, estruturas que auxiliam na ancoragem de células à matriz extracelular. Consequentemente, as células tendem a se contrair. Tal observação deu origem ao nome da subfamília, sendo “Rnd” vindo de “redondo” (*round*), pois a superexpressão de Rnd1 e Rnd3 em fibroblastos resulta em um fenótipo celular arredondado (NOBES, 1998).

O primeiro mecanismo descrito para explicar como Rnd1 reduz a contratibilidade da actomiosina é através da inibição de RhoA. Rnd1 liga-se ao domínio central de p190RhoGAP, uma das principais GAPs responsáveis pela regulação da atividade de RhoA. Essa interação aumenta a atividade GAP de p190 sobre RhoA, resultando na diminuição da atividade desta e, assim, inibindo a formação de fibras de estresse (WENNERBERG, 2003). Como um mecanismo regulatório, a proteína ROCK1 pode fosforilar p190RhoGAP, o que diminui a ligação desta a Rnd1, evitando assim o efeito inibitório de Rnd1 em RhoA (MORI, 2009).

FIGURA 4 - COMO Rnd1 ANTAGONIZA A ATIVIDADE DE RhoA ATRAVÉS DE p190RhoGAP



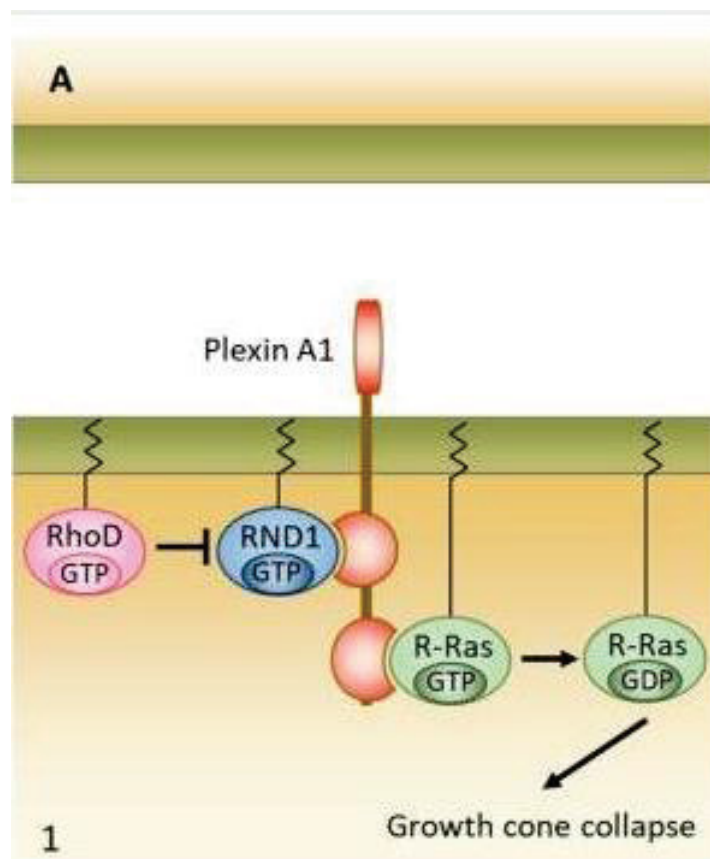
FONTE: Adaptado de Mouly *et al* (2019).

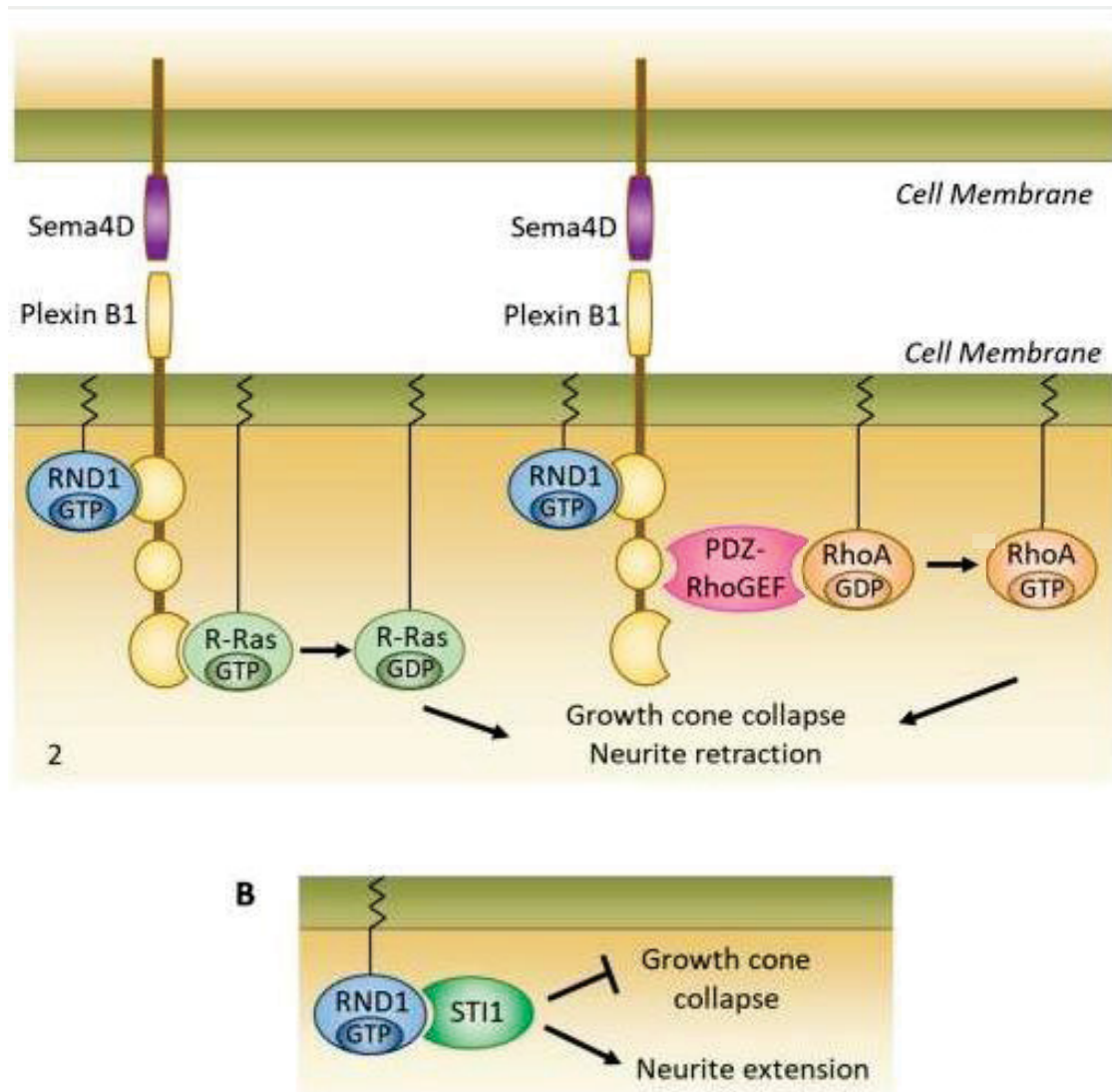
LEGENDA: Ao se ligar ao domínio central de p190RhoGAP, Rnd1 estimula a atividade GAP de p190 sobre RhoA, resultando na hidrólise de GTP em GDP e, consequentemente, na inativação de RhoA. Cell membrane = membrana celular.

A ligação de Rnd1 a outras proteínas efetoras já foi demonstrada, revelando outros aspectos da sua função em relação ao citoesqueleto. A proteína está envolvida na regulação da polaridade neuronal, tanto por mecanismos dependentes de plexina quanto por vias independentes (MOULY, 2019). Rnd1 é capaz de interagir com diferentes tipos de plexinas, que são receptores para as moléculas guia semaforinas.

Dependendo do tipo de molécula efetora que se liga à Rnd1, esta ativa ou diminui a extensão de neuritos, e induz ou inibe o colapso do cone de crescimento (YUKAWA, 2010; HARADA, 2005; OINUMA, 2003; ZANATA, 2002a). Uma das proteínas com a qual Rnd1 pode interagir é STI1, sendo que tal interação inibe o colapso do cone de crescimento induzido pela interação Rnd1-Plexina A1 em células COS-7, e aumenta a extensão de neuritos em células PC-12 (DE SOUZA, 2014).

FIGURA 5 - Rnd1 ESTÁ ENVOLVIDA NA FORMAÇÃO DE CONEXÕES NERVOSAS





FONTE: Adaptado de Mouly *et al* (2019).

LEGENDA: (A) Mecanismos moleculares dependentes de Plexina. 1: A interação de Rnd1 com a Plexina A1 estimula a atividade R-Ras GTPase desta, levando ao colapso do cone de crescimento. Esse efeito ocorre mesmo na ausência de um sinal de semaforina. Essa interação pode ser inibida por RhoD, que se liga à Plexina no mesmo sítio de ligação que Rnd1. 2: Após estimulação por Semaforina 4D (Sema4D), a interação de Rnd1 com a Plexina B1 estimula sua atividade R-Ras GTPase e sua ligação com PDZ-RhoGEF, resultando na inibição de R-Ras e na ativação de RhoA, respectivamente. Esses mecanismos contribuem para o colapso do cone de crescimento e a retração do neurito. (B) Mecanismos independentes de plexina. A interação de Rnd1 com STI1 inibe o colapso do cone de crescimento induzida pela associação Rnd1-Plexina A1 e aumenta a extensão de neuritos.

Assim como RhoA e outras GTPases, a expressão dos transcritos RND1 é alterada em cânceres (BUSTELO, 2018). RND1 está diminuído nos subtipos mais agressivos de câncer de mama (receptor de estrogênio negativo, triplo negativo e basal) (OKADA, 2015), no carcinoma hepatocelular (QIN, 2018; KOMATSU, 2017) e no glioma de alto grau (BOYRIE, 2018; CLARKE, 2015). Além disso, a expressão de Rnd1 é menor nos estágios avançados (grau III/IV) do que nos estágios iniciais (grau

I/II) de carcinoma hepatocelular (KOMATSU, 2017) e glioma (CLARKE, 2015). Por outro lado, os transcritos RND1 estão aumentados em estágios iniciais de tumores de mama (JIANG, 2003), em linhas celulares de câncer gástrico (NISHIGAKI, 2005) e em carcinoma espinocelular de esôfago (XIANG, 2016).

As alterações da expressão de RND1 em tumores e uma análise *in silico* que identificou RND1 como gene supressor de tumor (CHEN, 2018), sugerem um papel potencial de RND1 na oncogênese. No tecido mamário, a perda de RND1 induz tumorigênese em células epiteliais mamárias (OKADA, 2015). Em contrapartida, a reintrodução do gene RND1 em células tumorais mamárias retarda o crescimento do tumor (OKADA, 2015). A perda de RND1 em células epiteliais mamárias também contribui para a progressão tumoral através de: (I) indução de células à transição epitélio-mesenquimal (EMT), (II) indução de proliferação, e (III) indução de capacidade de migrar e metastatizar. Estes efeitos de progressão tumoral induzidos pela depleção de RND1 são mediados através da ativação das vias Ras e MAPK (OKADA, 2015).

Em células de carcinoma hepatocelular a depleção de RND1 também causa EMT, mas neste caso através da ativação de RhoA (QIN, 2018). Em células iniciadoras de glioblastoma, a expressão de RND1 está inversamente correlacionada com a expressão de genes mesenquimais, como TWIST1, SNAI1 e SNAI2 (BOYRIE, 2018), sugerindo que RND1 bloqueia o fenótipo mesenquimal. No que diz respeito ao papel de RND1 na proliferação e migração de células tumorais, os resultados parecem depender do tipo de tumor. A depleção de RND1 induz a proliferação em carcinoma hepatocelular (KOMATSU, 2017), enquanto diminui a mesma em carcinoma espinocelular do esôfago (XIANG, 2016).

O silenciamento de RND1 aumenta a migração *in vitro* e a invasão de células iniciadoras de glioblastoma (BOYRIE, 2018) e células de carcinoma hepatocelular (QIN, 2018; KOMATSU, 2017). Em células de carcinoma hepatocelular, o aumento da invasão induzida pela depleção de RND1 é mediada pela ativação de RhoA (QIN, 2018). RND1 também foi descrito como um fator prognóstico de sobrevivência para pacientes com câncer de mama negativo para receptor de estrogênio (OKADA, 2015), com carcinoma hepatocelular (QIN, 2018; KOMATSU, 2017) ou glioblastoma (BOYRIE, 2018). Nestes tumores, uma expressão fraca de RND1 está correlacionada com um mau prognóstico.

2.3 STI1: MUITO MAIS QUE UMA CO-CHAPERONA

A proteína induzível por estresse (STI1), também conhecida por proteína organizadora de Hsp70-Hsp90 (Hop), é uma co-chaperona expressa na maioria dos tecidos. Ela age em conjunto com as chaperonas Hsp70 e Hsp90 promovendo o dobramento correto de proteínas – sendo essencial à manutenção da homeostase e da proteostase celular (BHATTACHARYA, 2021; DA FONSECA, 2020). Tendo sido descrita primeiramente como uma proteína relacionada ao estresse térmico em *Saccharomyces cerevisiae* (NICOLET, 1989), a Hop humana é uma proteína de 543 aminoácidos com uma massa molecular de aproximadamente 62.6 kDa (HONORÉ, 1992).

A análise das sequências proteicas de STI1/Hop murina (mSTI1) e sua ortóloga humana revelou que estas possuem identidade de 97.4% e similaridade de 98.9% (BECKLEY, 2020). O estudo de Longshaw *et al* (2000) apontou dois sítios possíveis de fosforilação da STI1 murina (serina 189 e treonina 198), fosforilados pela caseína quinase II e pela quinase dependente de ciclina 1, respectivamente. Outra publicação do mesmo grupo demonstrou que a fosforilação de S189 promove a localização nuclear da proteína, enquanto a fosforilação em T198 faz com que esta permaneça no citosol (LONGSHAW, 2004). Sendo estas quinases específicas de certas fases do ciclo celular, levanta-se a possibilidade de que a localização e a função de STI1 dependam da fase do ciclo celular. Curiosamente, os sítios de fosforilação da STI1 humana parecem ser conservados em relação aos da mSTI1 – ainda que as funções de tais sítios não tenham sido descritas para a proteína humana.

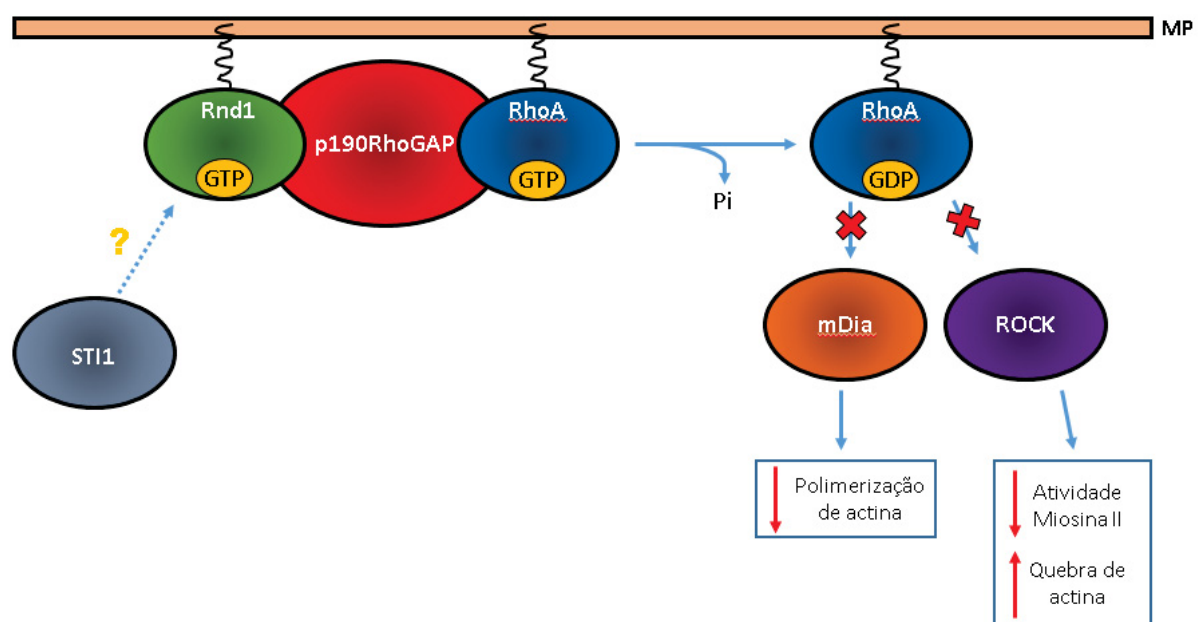
Além do citosol e do núcleo, a localização subcelular de STI1 também já foi descrita no complexo de Golgi (HONORÉ, 1992) e na membrana celular (ZANATA, 2002b). Astrócitos e células da glia secretam STI1 como um ligante neurotrófico, desencadeando a sinalização através da proteína príon (PrP^c) em neurônios e promovendo efeitos neuroprotetores (LACKIE, 2017; LIMA, 2007; ZANATA 2002b). O papel do complexo HSP70/HSP90/STI1 também é importante em doenças neurodegenerativas, considerando sua função na homeostase e proteostase tecidual. Quando comprometido seu desempenho, é possível verificar o acúmulo de fibrilas amilóides (LACKIE, 2017).

Diversos estudos também já apontaram STI1 como um biomarcador de câncer – tanto para o diagnóstico quanto para o prognóstico da doença. Tal proteína tem altos

níveis de expressão em diferentes tipos de câncer, como carcinomas, câncer colorretal, gástrico, oral, cerebral e de ovários (LUO, 2018; ZHANG, 2018; BAINDUR-HUDSON, 2015; ERLICH, 2007). A superexpressão de STI1 tem sido correlacionada à progressão tumoral (ZHAI, 2018; HAMBARDZUMYAN, 2016; TSAI, 2012), e o *knockdown/knockout* de tal proteína em diferentes células cancerígenas interfere em várias vias de sinalização, resultando em menor migração e proliferação celular (WANG, 2020; YIN, 2019; CHEN, 2017). Portanto, STI1 parece ser um fator importante na tumorigênese e invasividade de cânceres.

Assim, existem evidências crescentes que ligam STI1 à migração celular, e consequentemente, à regulação do citoesqueleto de actina (YIN, 2019; WILLMER, 2013; TSAI, 2012). No trabalho de 2020 publicado por Beckley e colaboradores, foi caracterizado que mSTI1 interage com a F-actina através dos domínios TPR2A e TPR2B. Neste mesmo estudo, foi caracterizado que o *knockdown* (utilizando silenciamento por shRNA) e o *knockout* do gene de STI1 alteraram os níveis de profilina, cofilina e F-actina nos modelos celulares utilizados. Em relação aos respectivos controles, os níveis de cofilina foram aumentados, enquanto os de profilina e F-actina diminuíram. Efeitos morfológicos também foram observados em células HEK-293T que tiveram seus níveis de STI1 diminuídos por *knockdown*.

FIGURA 6 - ILUSTRAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO INVESTIGADA



FONTE: O autor (2024).

LEGENDA: Rnd1 quando ativa (associada à *lipid rafts*) liga-se ao domínio central de p190RhoGAP, aumentando a atividade GAP desta sobre RhoA. A atividade de GTPase intrínseca de RhoA é estimulada e esta hidrolisa GTP em GDP + Pi, tornando-se inativa. Assim, RhoA-GDP não se liga às proteínas efetoras (exemplificadas na imagem por mDia e ROCK) e não as ativa. Isso tem por consequências as diminuições de polimerização de F-actina, da contratilidade de actomiosina e o aumento da quebra de F-actina. O presente trabalho teve por objetivo investigar o efeito da interação STI1-Rnd1 na via de sinalização descrita. MP = membrana plasmática; Pi = fosfato inorgânico.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANTICORPOS E CONSTRUÇÕES UTILIZADAS

Foram realizados experimentos de padronização das diluições a serem utilizadas dos anticorpos para detecção via *Western blotting*. Os anticorpos testados estão identificados na TABELA 1.

TABELA 1 - ANTICORPOS UTILIZADOS

Especificidade	Isotipo	Animal de origem	Fornecedor	Código de catálogo
c-Myc	Policlonal	Coelho	Sigma-Aldrich	C3956
GFP	Policlonal	Coelho	Doação Instituto Carlos Chagas	-
GST-Rnd1	Policlonal	Coelho	Laboratório de Neurobiologia	-
6His-Rnd1	Policlonal	Coelho	Laboratório de Neurobiologia	-
IgG de camundongo	Policlonal	Bode	Promega	W402B
IgG de coelho	Policlonal	Bode	Sigma-Aldrich	A0545
RhoA	IgG ₁	Camundongo	Santa Cruz Biotechnology	sc-418 (26C4)
Rnd1	IgG	Coelho	Laboratório de Neurobiologia	-
YPYDVPDYA (<i>tag</i> HA)	IgG ₁	Camundongo	BioLegend	901502
YPYDVPDYA (<i>tag</i> HA)	IgG	Coelho	Santa Cruz Biotechnology	sc-805 (Y-11)

FONTE: O autor (2024).

O vetor vazio e as construções utilizadas nos experimentos realizados estão descritas na TABELA 2.

TABELA 2 - VETOR E CONSTRUÇÕES UTILIZADAS

Construção	Vetor	Inserto	Sítio de inserção
pBK-CMV-EGFP-mRhoA	pBK-CMV (Stratagene)	cDNA RhoA murina + <i>tag</i> EGFP N-terminal	Informação indisponível
pBK-CMV-c-Myc-RhoA	pBK-CMV (Stratagene)	cDNA RhoA murina + <i>tag</i> c-Myc N-terminal	Informação indisponível
pcDNA 3.1 (-)	pcDNA 3.1 (-) (Invitrogen)	-	-
pcDNA3-HA-Rnd1	pcDNA3 (Invitrogen)	cDNA Rnd1 humana + <i>tag</i> HA N-terminal	Hind III - EcoRI
pEGFP-C1-mSTI1	pEGFP-C1 -contém <i>tag</i> EGFP (Clontech)	cDNA STI1 murina (<i>tag</i> N-terminal)	KpnI - Sal I
pGEX-4T-2-RBD	pGEX-4T-2-RBD - contém <i>tag</i> GST (Pharmacia Biotech)	cDNA equivalente aos aminoácidos 2-89 da Rhotekina murina (<i>tag</i> N-terminal)	BamHI - EcoRI
pGEX-4T-2-RhoAG14V	pGEX-4T-2-RBD - contém <i>tag</i> GST (Pharmacia Biotech)	cDNA RhoA humana com substituição da glicina do códon 14 por valina (<i>tag</i> N-terminal)	BamHI - NotI
pRK5-c-Myc-RhoA	pRK5 - contém <i>tag</i> c-Myc	cDNA RhoA humana (<i>tag</i> N-terminal)	BamHI - EcoRI

FONTE: O autor (2024)

As construções pBK-CMV-EGFP-mRhoA e pBK-CMV-c-Myc-RhoA foram gentilmente doadas pelo Prof. Dr. Andreas Püschel do Laboratório de Mecanismos Celulares de Diferenciação Neuronal, Universidade de Münster (Alemanha). O vetor pcDNA 3.1 (-) foi doado pela Prof. Dra. Bettina Malnic do Departamento de Bioquímica, Instituto de Química da Universidade de São Paulo. As construções pcDNA3-HA-Rnd1, pGEX-4T-2-RBD e pGEX-4T-2-RhoAG14V foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Hironori Katoh do Laboratório de Neurobiologia Molecular, Universidade de Kyoto (Japão).

A construção pEGFP-C1-mSTI1 foi doada pela Dra. Vilma Regina Martins do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Por fim, a construção pRK5-c-Myc-RhoA foi primeiramente descrita no artigo de Nobes e colaboradores (1999), e posteriormente depositada pelo Prof. Dr. Alan Hall no banco de dados da Addgene, de onde tal construção foi adquirida (plasmídio #15899).

3.2 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA COM OS PLASMÍDIOS DE INTERESSE

Para fazer soluções estoque dos plasmídios (utilizadas posteriormente em transfecções), as construções foram transformadas separadamente em *Escherichia coli* TOP10. Já para expressão proteica em bactérias, as construções pGEX-4T-2-RBD e pGEX-4T-2-RhoAG14V foram transformadas individualmente em *Escherichia coli* Rosetta 2 (DE3) pLySs – o antibiótico cloranfenicol (35 µg/mL) também foi utilizado na seleção de colônias transformantes de tal *strain*. Na TABELA 3 estão especificadas tais construções, seus respectivos antibióticos de seleção e a concentração de trabalho utilizada.

TABELA 3 - ANTIBIÓTICOS DE SELEÇÃO DE CADA PLASMÍDIO

Construção	Antibiótico de seleção	Concentração de trabalho
pBK-CMV-EGFP-mRhoA	Kanamicina	50 µg/mL
pBK-CMV-c-Myc-RhoA	Kanamicina	50 µg/mL
pcDNA3.1 (-)	Ampicilina	100 µg/mL
pcDNA3-HA-Rnd1	Ampicilina	100 µg/mL
pEGFP-C1-mSTI1	Kanamicina	50 µg/mL
pGEX-4T-2-RBD	Ampicilina	100 µg/mL
pGEX-4T-2-RhoAG14V	Ampicilina	100 µg/mL
pRK5-c-Myc-RhoA	Ampicilina	100 µg/mL

FONTE: O autor (2024)

Brevemente, a uma alíquota de células bacterianas quimiocompetentes foi adicionado 1 µL de um estoque contendo o DNA plasmidial a 10 ng/µL. Em seguida, tal *mix* foi incubado em gelo por 30 minutos. Ao fim da incubação foi realizado o choque térmico a 42 °C em termobloco por 90 segundos, e a reação foi colocada novamente em gelo por 5 minutos. Logo após, 400 µL de meio LB (NaCl 1% m/v, peptona 1% m/v, extrato de levedura 0.5 % m/v) foi adicionado e a mistura incubada em estufa a 37 °C, por 45 minutos.

Depois a reação foi centrifugada a 4000 x g por 5 minutos, e o *pellet* de bactérias ressuspendido em 200 µL de meio LB. A ressuspensão foi vertida e espalhada com o auxílio de uma alça de Drigalski em placa de LA (meio LB + ágar 1.5% m/v) contendo o antibiótico de seleção apropriado, em concentração adequada

– de acordo com o plasmídio que estivesse sendo transformado. Tal placa foi incubada *overnight* (12h-16h) em estufa a 37 °C. Assim, checkou-se a presença de colônias transformantes, a placa foi selada e armazenada a 4 °C, protegida de luz, até o momento de utilização.

3.3 PURIFICAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

Utilizando uma colônia transformante selecionada, foi feito um pré-inóculo em meio Circle Grow® (MP Biomedicals) contendo o antibiótico de seleção adequado. Tal pré-inóculo possuía volume equivalente a 5% do volume final do inóculo. O pré-inóculo foi incubado por 6h–8h em estufa a 37 °C, sob agitação de 180 RPM. Após tal incubação, o pré-inóculo foi vertido em meio Circle Grow contendo o antibiótico de seleção necessário (inóculo) e cresceu *overnight* em estufa a 37 °C, sob agitação de 180 RPM.

A partir de tal inóculo foi purificado o plasmídio de interesse, utilizando os kits de maxiprep PureLink™ Quick Plasmid Maxiprep Kit (Invitrogen) ou QIAGEN Plasmid Maxi Kit (QIAGEN), segundo as instruções de cada fabricante. O DNA plasmidial purificado teve sua concentração medida e sua pureza analisada por espectrofotometria no aparelho NanoDrop™ Lite (Thermo Fisher Scientific).

Uma razão A_{260}/A_{280} entre 1,8 e 1,95 foi considerada satisfatória. A concentração de plasmídio necessária a posterior transfecção era de 0,5–1 µg/µL. Deste modo, caso a solução de DNA plasmidial estivesse mais diluída, esta foi concentrada em um concentrador Savant™ SPD1010 SpeedVac™ (Thermo Fisher Scientific). Os plasmídios purificados foram armazenados a -20 °C.

3.4 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE BRADFORD

Com a finalidade de quantificar as proteínas totais presentes nos extratos celulares, as amostras foram submetidas ao ensaio de Bradford. Brevemente, 200 µL de reagente de Bradford (0.01% m/v Coomassie Brilliant Blue G-250, 4.7% m/v etanol, 8.5% m/v ácido fosfórico) foi adicionado por poço de uma placa de 96 poços. Quantidades crescentes (0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 µL) de uma solução de albumina sérica bovina (BSA) 1 µg/µL foram adicionadas aos poços contendo o reagente, sendo a curva-padrão feita em triplicata.

1 μ L de cada extrato celular foi aplicado em poços contendo reagente de Bradford. Os extratos também foram quantificados em triplicata. A absorbância foi medida a 595 nm em espectrofotômetro Multiskan (Thermo Fisher Scientific), e em posse dos dados, a regressão linear foi realizada para quantificação de proteínas.

3.5 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA DESNATURANTE (SDS-PAGE)

Boa parte dos experimentos realizados tiveram como método de separação de proteínas o método de SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970). Géis de empilhamento e de separação foram preparados seguindo as proporções de reagentes descritas por Harlow e Lane (1988), contendo 4% e 12% de poliacrilamida respectivamente. Foi adicionado tampão de amostra 5X (250 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% m/v SDS, 25% m/v glicerol, 40 mM DTT, 0.05% m/v azul de bromofenol) às amostras (extratos de células de mamífero ou *pellets* de bactéria) e estas fervidas a 95 °C, por 10 minutos.

Logo após, entre 10 μ g e 30 μ g (a depender do experimento) de proteínas foram aplicados ao gel de poliacrilamida, e separadas por eletroforese em sistema Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell (Bio-Rad). A separação eletroforética foi conduzida utilizando 95 V para o gel de empilhamento (até a linearização da frente de migração proteica) e 180 V para o gel de resolução/separação. Como marcador molecular foi utilizado Prestained™ Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific).

3.5.1 Coloração com Azul de Coomassie

Concluído o SDS-PAGE, a depender da análise, dado gel seguiu à coloração com Coomassie Blue R250 para detecção de proteínas totais. Os géis que foram corados foram incubados com solução de Coomassie Blue R250 (0.1% m/v Coomassie Blue R250, 10% v/v ácido acético, 50% v/v metanol) por 30 minutos sob leve agitação. A solução corante foi removida e substituída por uma solução descorante (50% v/v metanol, 10% ácido acético), e novamente tais géis foram incubados por 1 hora, sob leve agitação - até a visualização adequada das bandas de proteína.

3.5.2 Imunodeteção proteica (*Western blotting*)

Os géis que seguiram à imunodeteção tiveram suas proteínas transferidas para membranas de nitrocelulose com poros de 0,45 µm (Amersham) em sistema Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad). Um tampão específico para transferência *semi-dry* foi utilizado (48 mM Tris base, 39 mM Glicina, 0.036% m/v SDS, 20% v/v metanol, pH 9.2). Após 1h de transferência eletroforética a 10 V, a membrana foi corada com Ponceau S 0,2% m/v para que se conferisse a eficiência da transferência. Quando necessário, dada membrana foi seccionada para incubá-la com diferentes anticorpos.

Logo após, o corante Ponceau S foi retirado por breve agitação da membrana em tampão TBS-T (140 mM NaCl, 50mM Tris-HCl, 0.05% v/v Tween® 20, pH 7.3). Em seguida, a membrana foi incubada por 1 hora sob agitação com solução 5% m/v de leite delipidado (Bio-Rad) em TBS-T, para bloqueio de sítios inespecíficos. Ao final de tal incubação, a membrana foi lavada 5 vezes por 5 minutos com TBS-T. O anticorpo primário selecionado para detecção (especificados na TABELA 1) foi diluído a dada concentração em TBS-T 0,5% m/v leite, e adicionado de modo a cobrir a membrana. A membrana ficou incubada *overnight* sob agitação com tal anticorpo, a 4 °C.

No dia seguinte, foram feitas 5 lavagens de 5 minutos cada com TBS-T, e adicionou-se o anticorpo secundário apropriado diluído em TBST 0,1% m/v leite (anti-camundongo Promega 1:5000 ou anti-coelho Sigma 1:10000). A membrana ficou incubada 1 hora sob agitação, à temperatura ambiente. Ao fim desta, novamente 5 lavagens com TBS-T foram feitas e seguiu-se à revelação.

A membrana foi incubada com reagente de detecção ECL™ *Start* ou ECL™ *Prime* (Amersham) por 3 minutos. A quimioluminescência emitida pela reação da HRP com o substrato foi captada por um dos seguintes métodos: revelação em quarto escuro ou captação em fotodocumentador Amersham Imager 600 (GE Healthcare). Para revelação em quarto escuro foram utilizados fixador e revelador radiográfico (Carestream) em filme de raio-X Autoradiography Film – UltraCruz® (Santa Cruz Biotechnology).

3.6 EXPRESSÃO EM PEQUENA ESCALA DE GST-RBD E GST-RhoAG14V

Visando purificar através de ensaios *pulldown* as formas ativadas das proteínas RhoA e p190RhoGAP, foram expressas as proteínas *bait* GST-RBD e GST-RhoAG14V, respectivamente. Os plasmídios utilizados (pGEX-4T-2-RBD e pGEX-4T-2-RhoAG14V) foram transformados separadamente em *Escherichia coli* Rosetta 2 (DE3) pLySs, como descrito na seção 3.2.

Para conferir a eficiência da expressão proteica, foram feitos experimentos de mini expressão para cada construção, a partir de 4 colônias transformantes selecionadas. Tais colônias foram inoculadas separadamente em 10 mL de meio LB contendo ampicilina (100 µg/mL) e cloranfenicol (35 µg/mL), e crescidas em estufa a 37 °C, sob agitação de 180 RPM. Após os inóculos atingirem uma OD₆₀₀ de 0.6, foi adicionado IPTG a uma concentração final de 0.5 mM à metade do volume de cada inóculo. O restante do volume de cada inóculo serviu como controle negativo – expressão não induzida por IPTG.

Tais inóculos foram incubados por 2 horas em estufa a 37 °C sob agitação de 180 RPM – para expressão de GST-RBD ou GST-RhoAG14V. Ao fim da incubação, estes foram centrifugados a 4000 x g por 5 minutos e os sobrenadantes descartados. Foi adicionado a cada *pellet* de bactéria 15 µL de água deionizada, 15 µL de uréia 8M em tampão PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.3) e 10 µL de tampão de amostra 5X.

As amostras foram vortexadas até ressuspensão completa dos *pellets* e aquecidas a 95 °C por 10 minutos. 15 µL de cada amostra foi aplicado em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, conforme descrito na seção 3.4) para confirmação da expressão de GST-RBD ou GST-RhoAG14V.

3.7 PRODUÇÃO DE GST-RBD LIGADA À GLUTATIONA SEPHAROSE 4B E QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA LIGADA À RESINA

O plasmídio a utilizado na expressão de GST-RBD (pGEX-4T-2-RBD) foi transformado em *Escherichia coli* Rosetta 2 (DE3) pLySs como descrito na seção 3.2. A partir de uma colônia transformante selecionada, foi feito o pré-inóculo em 200 mL de meio LB contendo ampicilina (100 µg/mL) e cloranfenicol (35 µg/mL). Este pré-

inóculo foi crescido em estufa a 37 °C sob agitação de 180 RPM, até que se atingisse uma OD₆₀₀ de 0.6.

Em seguida, tal pré-inóculo foi inoculado em 2L de LB (adicionado dos mesmos antibióticos anteriormente citados) e este inóculo foi crescido em estufa, sob as mesmas condições de temperatura e agitação utilizadas para o pré-inóculo. Após atingida uma OD₆₀₀ de 0.8, adicionou-se IPTG 0.5 mM e a expressão foi induzida em estufa a 37 °C, sob agitação de 180 RPM por 2 horas. Subsequentemente, a amostra foi centrifugada a 4000 x *g* por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de bactérias ressuspendido em 20 mL de tampão de lise A gelado (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% m/v Triton X-100, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.2 mM PMSF).

A amostra foi lisada em French Press (4 ciclos) e em seguida centrifugada a 17000 x *g* por 30 minutos, a 4 °C. Durante tal centrifugação, 0.3 mL de resina Glutathione Sepharose 4B fora equilibrada em tampão de lise A (3 lavagens). Cada lavagem consistiu em: resuspendar as *beads* em 0.5 mL de tampão de lise A via inversão do microtubo, recuperar a resina por centrifugação (500 x *g* por 1 min, 4 °C) e remover o sobrenadante. Ao fim da centrifugação, o lisado bacteriano clarificado foi transferido a um tubo falcon de 50 mL resfriado, ao qual também foram adicionadas as *beads* da resina já equilibrada. O falcon foi rotacionado em homogeneizador vertical por 1 hora a 4 °C, para ligação de GST-RBD à resina.

Em seguida as *beads* foram recuperadas por centrifugação (500 x *g* por 1 minuto, 4 °C) e o sobrenadante descartado. A resina foi ressuspendida em 6 mL de tampão de lavagem A gelado (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5% m/v Triton X-100, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.2 mM PMSF) e transferida a um tubo falcon de 15 mL resfriado. Assim, outras 5 lavagens com 6 mL de tampão de lavagem A foram realizadas. Após uma última etapa de lavagem com tampão de lavagem A + 10% v/v glicerol, a resina ligada à GST-RBD foi ressuspendida em 4 mL de tampão de lavagem A + 10% glicerol.

Uma alíquota de 32 µL da resina em tampão de lavagem A + 10% v/v glicerol foi adicionada de 8 µL de tampão de amostra 5X, e fervida a 95 °C por 10 minutos. Diferentes volumes de tal amostra – correspondentes a 15, 10 e 5 µL da suspensão de *beads* – foram aplicados em um gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE, conforme descrito na seção 3.5). Após a separação eletroforética, o gel foi corado para detectar proteínas conforme detalhado na seção 3.5.1. A quantificação de GST-RBD ligada à

resina se deu pela comparação com variadas quantidades de BSA. O restante da resina ligada à GST-RBD foi aliquotado em microtubos (100 µL por alíquota) e armazenada a -80 °C.

3.8 PRODUÇÃO DE GST-RhoAG14V LIGADA À GLUTATIONA SEPHAROSE 4B E QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA LIGADA À RESINA

A expressão de GST-RhoAG14V em *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLySs e ligação desta proteína à resina especificada se deu de modo similar ao descrito na seção 3.7. As únicas diferenças passíveis de nota são a construção e o método de lise utilizados.

Após a expressão de RhoAG14V pela bactéria transformada com o plasmídio pGEX-4T-2-RhoAG14V, o *pellet* bacteriano foi ressuspendido em 20 mL de tampão de lise A gelado e a lise por sonicação realizada. A amostra foi sonicada em tubo falcon de 50 mL gelado por 20 segundos, 15 vezes. Entre cada etapa de sonicação a amostra foi resfriada em gelo.

3.9 CULTIVO CELULAR

3.9.1 Cultivo celular de células HEK-293T e HeLa

Células HEK-293T (ATCC: CRL-1573™, isoladas de rim de embrião humano) e células HeLa (ATCC: CCL-2™, isoladas de carcinoma cervical humano) foram cultivadas separadamente *in vitro* em placas de cultivo de 60 mm, 100 mm ou 150 mm (Sarstedt). Tais placas foram mantidas em incubadora umidificada contendo 5% de CO₂ na atmosfera, a 37 °C. As células foram nutridas com meio DMEM baixa glicose (1g/L - Gibco), suplementado de 2 mM de glutamina, 10% (v/v) soro fetal bovino inativado por aquecimento a 60 °C (Gibco), penicilina (100 U.I./mL) e estreptomicina (100 µg/mL).

O grau de confluência celular foi observado diariamente, a fim de se evitar inibição por contato. Quando dada placa atingiu a confluência limite estimada (70% - 90%) foi realizada a tripsinização utilizando uma solução de tripsina-EDTA 0.25% m/v (Gibco) para dar sequência ao subcultivo. Não foram utilizadas linhagens com mais de 20 passagens para os experimentos descritos no presente estudo.

3.9.2 Padronização de transfecção com polietilenoimina em células HEK-293T e validação de anticorpos

Transfecções em células HEK-293T foram realizadas objetivando avaliar a expressão proteica das construções utilizadas e padronizar a imunodetecção. Tal linhagem foi transfectada utilizando um polímero catiônico como carreador de DNA – a polietilenoimina (PEI). Inicialmente, 5×10^5 células HEK-293T foram plaqueadas com meio DMEM baixa glicose completo em placas de 60 mm. Aproximadamente 24h após o plaqueamento, quando atingida uma confluência de 60%-80%, seguiu-se à transfecção.

Assim, 9 µg de DNA plasmidial (cada plasmídio separadamente) e 27 µg de PEI (solução 1µg/µL, pH 7.0) foram diluídos em 400 µL de meio Opti-MEM™ (Gibco). Tal mistura foi vortexada por 10 segundos e, em seguida, incubada por 15 minutos a temperatura ambiente. Logo após, tal *mix* foi adicionado por gotejamento à placa de cultivo (transfecção), que em sequência foi incubada por 12h em incubadora de cultivo. Após tal incubação, o meio foi trocado por meio DMEM completo e uma nova incubação por 16h em estufa de cultivo se seguiu.

Quando células foram transfectadas com uma construção contendo a *tag* EGFP, a eficiência de transfecção foi avaliada visualmente em microscópio de fluorescência Olympus (exemplificado no Anexo 1). Após a última incubação as células foram lavadas duas vezes com tampão TBS 1X (140 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.3), e seguiu-se à lise. As placas foram mantidas sobre gelo e foi adicionado 150 µL de tampão de lise B gelado (50 mM Tris-HCl pH 7.2, 1% m/v Triton X-100, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.2 mM PMSF) a cada placa, sendo a lise realizada utilizando raspadores de células (Sarstedt).

Os lisados foram transferidos para microtubos estéreis gelados e mantidos em gelo por 15 minutos. Em seguida, estes foram centrifugados a 13500 x *g* por 15 minutos, a 4 °C. Os *pellets* formados foram descartados e os sobrenadantes transferidos a novos microtubos estéreis gelados. Para cada amostra (extrato de células transfectadas com dado plasmídio), 40 µL de sobrenadante foi adicionado de 10 µL de tampão de amostra 5X e em seguida fervido a 95 °C por 10 minutos. Seguiu-se ao SDS-PAGE (descrito na seção 3.5) e à posterior imunodetecção de proteínas (descrita na seção 3.5.2).

3.10 PADRONIZAÇÃO DO *PULLDOWN* DE RhoA-GTP

3.10.1 Padronização do *pulldown* de RhoA-GTP: ensaio de ativação com EGF em células HEK-293T

Para garantir um ensaio *pulldown* eficiente, as *beads* ligadas à GST-RBD precisavam ser validadas quanto a capacidade de ligação à forma ativa de RhoA (RhoA-GTP). Assim, adaptando o protocolo descrito por Pellegrin e Mellor (2008), ensaios de ativação de RhoA via Fator de Crescimento Epidermal (EGF) foram executados em células HEK-293T. A principal adaptação foi a mudança de linhagem celular – o protocolo original relata o uso de células HeLa.

Além disso, era necessário esclarecer se a expressão endógena de RhoA em células HEK-293T seria suficiente à imunodetecção nos experimentos que se seguiram. No design experimental foram delimitados dois grupos experimentais, sendo cada um composto por duas placas de cultivo de 100 mm contendo células. O grupo controle foi composto por células não transfectadas (avaliação da expressão endógena de RhoA), e o grupo transfectado por células transfectadas com o plasmídeo pBK-CMV-EGFP-mRhoA. Uma placa de cada grupo experimental foi submetida posteriormente à ativação com EGF.

Inicialmente, em cada placa de 100 mm foram plaqueadas 1.2×10^6 células HEK-293T em meio DMEM completo. Aproximadamente 24h após o plaqueamento, quando atingida uma confluência de 60%-80%, seguiu-se à transfecção do grupo transfectado. Para cada placa, 24 µg de DNA plasmidial e 72 µg de PEI foram diluídos em 800 µL de meio Opti-MEM. O restante da transfecção ocorreu como descrito na seção 3.9.2.

12h após a transfecção, as placas de ambos os grupos experimentais tiveram seus meios retirados e foram lavadas duas vezes com tampão PBS. Foi adicionado meio DMEM 0.1% v/v SFB, e uma nova incubação *overnight* em estufa de cultivo se seguiu. A baixa concentração de soro fetal bovino serviu para diminuir a porção de RhoA e EGFP-mRhoA ativas. O EGF está presente no soro em concentrações expressivas e ativa seu respectivo receptor tirosina-quinase (EGFR). A ativação de tal receptor regula a atividade de RhoA através de diferentes vias (TONG, 2016; MATEUS, 2007).

No dia seguinte, foi realizada a ativação com EGF. Uma placa de cada grupo experimental teve seu meio retirado e foi lavada duas vezes com PBS. Em seguida, foi adicionado 4 mL de DMEM contendo EGF (Sigma) diluído a 100 ng/mL. Tais placas foram incubadas em estufa de cultivo por 3 minutos. Logo após, o meio foi retirado de todas as placas e estas foram lavadas duas vezes com tampão TBS gelado (pH 7.3). As placas foram mantidas sobre gelo e seguiu-se à lise.

A cada uma foi adicionado 500 µL de tampão de lise C gelado (50 mM Tris-HCl pH 7.2, 1% v/v Triton X-100, 0.1% m/v SDS, 500 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.2 mM PMSF). A lise foi feita utilizando raspadores de células. Os lisados foram transferidos para microtubos estéreis e mantidos em gelo por 15 minutos. Em seguida, estes foram centrifugados a 13500 x *g* por 15 minutos, a 4 °C. Os *pellets* foram descartados e os sobrenadantes transferidos a novos microtubos estéreis gelados.

Em seguida, as proteínas presentes nos lisados foram quantificadas via ensaio de Bradford (como descrito na seção 3.4). Durante tal quantificação, as *beads* ligadas à GST-RBD foram descongeladas em gelo. Ao final da quantificação, foram retirados dos lisados volumes equivalentes a 15 µg de proteína total. Essas alíquotas recuperadas serviram como *inputs* (controles de RhoA total) e foram processadas para SDS-PAGE conforme descrito na seção 3.5.

Do restante dos lisados, volumes equivalentes a 500 µg de proteína foram transferidos a microtubos estéreis. A estes foi adicionado volume de resina equivalente a 50 µg de GST-RBD, e quando necessário, tampão de lise C gelado até o volume total do conteúdo do microtubo ser ≈ 0,9 mL. Tais microtubos foram então incubados em rotação vertical por 1 hora, a 4 °C (*pulldown*).

Em seguida, as *beads* foram lavadas 4 vezes com tampão de lavagem B gelado (50 mM Tris-HCl pH 7.2, 1% m/v Triton X-100, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.2 mM PMSF). Cada lavagem consistiu em: resuspendar as *beads* em 0.5 mL de tampão de lavagem B via inversão do microtubo, recuperar a resina por centrifugação (500 x *g* por 1 min, 4 °C) e remover o sobrenadante. Ao fim das lavagens, o excesso de tampão de lavagem B foi cuidadosamente retirado utilizando uma seringa.

As proteínas ligadas às *beads* foram eluídas pela adição de 25 µL de tampão de amostra 2x e subsequente aquecimento a 95 °C, por 10 minutos. As amostras de controle de RhoA total (*inputs*) e de *pulldown* de RhoA-GTP foram detectadas via *Western blotting*, conforme descrito nas seções 3.5 e 3.5.2. No *blotting* 1º foi utilizado anticorpo anti-RhoA sc-418 (Santa Cruz Biotechnology) diluído a 1:1000.

3.10.2 Padronização do *pulldown* de RhoA-GTP: ensaio de ativação com EGF em células HeLa

Os ensaios de ativação com EGF em células HeLa ocorreram de forma similar ao descrito para células HEK-293T, na seção 3.10.1. A principal diferença foi no design experimental, onde houve apenas o grupo experimental transfectado com pBK-CMV-EGFP-mRhoA – composto por duas placas de cultivo de 100 mm contendo células HeLa. Uma das placas deste grupo foi posteriormente ativada com EGF, sendo a outra placa um controle de células não ativadas.

Houveram outras distinções na execução dos experimentos que são dignas de nota. O número de células plaqueadas por placa foi de 1×10^6 . Para diminuir a porção ativa de RhoA/EGFP-mRhoA, as células HeLa foram incubadas *overnight* em meio DMEM sem SFB. Por fim, na imunodeteção para o *blotting* 1º foi utilizado anticorpo anti-GFP (doação ICC) diluído a 1:2000.

3.11 PULLDOWN DE RhoA-GTP EM CÉLULAS HeLa CO-TRANSFECTADAS EXPRESSANDO EGFP-mRhoA E HA-Rnd1

O experimento foi realizado com a finalidade de reproduzir um resultado já demonstrado na literatura (OINUMA, 2012). No contexto do artigo citado, tal experimento ajudou a demonstrar que Rnd1 diminui a porção de RhoA-GTP. Foram delimitados dois grupos experimentais de células HeLa a serem co-transfectadas. O grupo controle expressaria EGFP-mRhoA, e o segundo grupo EGFP-mRhoA e HA-Rnd1.

Inicialmente, 1×10^6 células foram plaqueadas por placa de 100 mm. Aproximadamente 24h após o plaqueamento, quando atingida uma confluência de 60%–80%, seguiu-se às transfecções. Para cada placa, 30 µg de DNA plasmidial total e 90 µg de PEI foram diluídos em 800 µL de meio Opti-MEM. O vetor pcDNA3.1(-) serviu para completar a massa total de DNA plasmidial quando necessário.

Para o grupo controle, células HeLa foram co-transfectadas com a construção pBK-CMV-EGFP-mRhoA e o vetor vazio. Volumes equivalentes a 15 µg da construção e 15 µg do vetor foram utilizados no *mix* de transfecção. Já para o grupo que expressaria ambas as GTPases, as células foram co-transfectadas com as

construções pBK-CMV-EGFP-mRhoA e pcDNA3-HA-Rnd1. Volumes equivalentes a 15 µg de cada construção foram utilizados.

Tais transfecções ocorreram como descrito na seção 3.9.2. A lise das células foi realizada de modo similar ao descrito na seção 3.9.2, sendo a única diferença o volume de tampão de lise B utilizado por placa (500 µL). As concentrações de proteína total nos lisados obtidos foram quantificadas pelo método de Bradford, conforme descrito na seção 3.4.

Dos lisados dos referidos grupos experimentais, alíquotas equivalentes a 15 µg de proteína foram retiradas como controles de EGFP-mRhoA total (*inputs*). O restante dos lisados foram processados em ensaios *pulldown* de RhoA-GTP – de modo semelhante ao descrito na seção 3.10.1. A adaptação foi o tampão utilizado para completar volume no microtubo antes do *pulldown*, que foi tampão de lise B. As amostras foram detectadas via *Western blotting*, conforme descrito nas seções 3.5 e 3.5.2. No *blotting* 1º foi utilizado anticorpo anti-GFP (doação ICC) diluído a 1:2000.

3.12 PULLDOWN DE RhoA-GTP EM CÉLULAS HeLa CO-TRANSFECTADAS EXPRESSANDO EGFP-mRhoA, EGFP-mSTI1 E HA-Rnd1

Visando compreender como a superexpressão de EGFP-mSTI1 e HA-Rnd1 afetaria a atividade de RhoA, células HeLa foram co-transfectadas. Foram delimitados quatro grupos experimentais: o grupo controle expressaria EGFP-mRhoA; o grupo (I) EGFP-mRhoA e HA-Rnd1; o (II) EGFP-mRhoA e EGFP-mSTI1; e por fim o (III) EGFP-mRhoA, EGFP-mSTI1 e HA-Rnd1.

Inicialmente, 3.5×10^6 células foram plaqueadas por placa de 150 mm. Aproximadamente 24h após o plaqueamento, quando atingida uma confluência de 60%–80%, seguiu-se às transfecções. Para cada placa, 63 µg de DNA plasmidial total e 189 µg de PEI foram diluídos em 2.5 mL de meio Opti-MEM.

Para o grupo controle, células HeLa foram co-transfectadas com a construção pBK-CMV-EGFP-mRhoA e o vetor pcDNA3.1(-). Volumes equivalentes a 21 µg da construção e a 42 µg do vetor foram utilizados no *mix* de transfecção. O grupo (I) foi co-transfectado com as construções pBK-CMV-EGFP-mRhoA, pcDNA3-HA-Rnd1 e o vetor. Volumes equivalentes a 21 µg de cada construção e do vetor foram utilizados no *mix* de transfecção.

O grupo (II) foi co-transfectado com as construções pBK-CMV-EGFP-mRhoA, pEGFP-C1-mSTI1 e o vetor. Volumes equivalentes a 21 µg de cada construção e do vetor foram utilizados no *mix* de transfecção. Por último, o grupo (III) foi co-transfectado com as construções pBK-CMV-EGFP-mRhoA, pEGFP-C1-mSTI1 e pcDNA3-HA-Rnd1. Volumes equivalentes a 21 µg de cada construção foram utilizados no *mix* de transfecção.

Tais transfecções ocorreram como descrito na seção 3.9.2. A lise das células foi realizada de modo similar ao descrito na seção 3.9.2, sendo a única diferença o volume de tampão de lise B utilizado por placa (1 mL). As concentrações de proteína total nos lisados obtidos foram quantificadas pelo método de Bradford, conforme descrito na seção 3.4.

Dos lisados dos referidos grupos experimentais, alíquotas equivalentes a 15 µg de proteína foram retiradas como controles de EGFP-mRhoA total (*inputs*). O restante dos lisados foram processados em ensaios *pulldown* de RhoA-GTP – de modo semelhante ao descrito na seção 3.10.1. A adaptação foi o tampão utilizado para completar volume no microtubo antes do *pulldown*, que foi tampão de lise B. As amostras foram detectadas via *Western blotting*, conforme descrito nas seções 3.5 e 3.5.2. No *blotting* 1º foi utilizado anticorpo anti-GFP (doação ICC) diluído a 1:2000.

3.13 DENSITOMETRIA E ANÁLISE ESTATÍSTICA DE DADOS

Os experimentos descritos nas seções 3.10 e 3.11 foram submetidos à densitometria de bandas via *software* ImageJ. A porção de EGFP-mRhoA ativa para dado grupo experimental em cada repetição foi calculada pela fórmula:

$$\frac{A_{pulldown}}{A_{input}} = P_{ativ}$$

$A_{pulldown}$ = área em pixels quadrados de lisado que passou por *pulldown*

A_{input} = área em pixels quadrados de lisado total

P_{ativ} = razão correspondente à porção ativa de EGFP-mRhoA

Em posse do valor da porção ativa de EGFP-mRhoA (P_{ativ}), os “tratamentos” de cada experimento foram normalizados em relação aos seus respectivos controles.

Para os experimentos descritos na seção 3.10, células (HEK-293T ou HeLa) ativadas com EGF foram consideradas tratadas, enquanto as não tratadas (somente privadas de SFB) foram os controles. Já no experimento detalhado na seção 3.11, células HeLa expressando EGFP-mRhoA foram consideradas o controle, e células expressando EGFP-mRhoA e HA-Rnd1 foram assinaladas como tratamento.

Assim, as porções ativas de EGFP-mRhoA foram normalizadas segundo a fórmula:

$$\frac{P_{ativ}}{P_{controle}} = P_N$$

P_{ativ} = razão correspondente à porção ativa de EGFP-mRhoA (grupo tratado)

$P_{controle}$ = razão correspondente à porção ativa de EGFP-mRhoA (controle)

P_N = razão correspondente à porção ativa de EGFP-mRhoA normalizada

Por fim, a partir destes dados foram realizadas análises estatísticas e gerados gráficos utilizando o *software* GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, EUA). Os desvios-padrão foram plotados em tais gráficos. Para os experimentos descritos em 3.10, foram realizados testes T de Student bicaudais, com valor de p significativo ≤ 0.05 .

4 RESULTADOS OBTIDOS

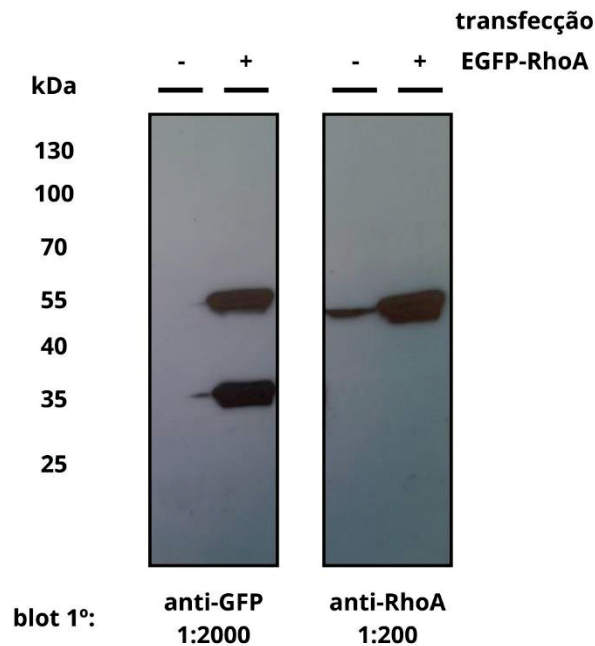
4.1 VALIDAÇÃO DE CONSTRUÇÕES E DE ANTICORPOS

Inicialmente, para avaliar a expressão das construções a serem usadas nos experimentos posteriores foram realizadas transfecções em células HEK-293T, e subsequente detecção via *Western blotting*. Tais experimentos serviram também para validar a especificidade e padronizar as diluições dos anticorpos testados.

A Figura 7 corresponde à imunodetecção de EGFP-mRhoA em extrato de células HEK-293T transfectadas com pBK-CMV-EGFP-mRhoA. Um extrato de células não transfectadas foi utilizado como controle. É possível verificar bandas específicas da construção EGFP-mRhoA em torno de 55 kDa, detectadas nos extratos celulares transfectados – tanto pelo anticorpo anti-GFP, quanto pelo anti-RhoA.

A banda detectada por volta de 35 kDa pelo anticorpo anti-GFP, no extrato celular transfectado, é equivalente à clivagem da *tag* EGFP. Por fim, a banda em 55 kDa detectada pelo anticorpo anti-RhoA no extrato não transfectado não é correspondente à RhoA endógena da linhagem, mas sim a um erro de pipetagem – ou seja, veio do poço adjacente.

FIGURA 7 - EXPRESSÃO DE EGFP-mRhoA EM CÉLULAS HEK-293T DETECTADA VIA *WESTERN BLOTTING*

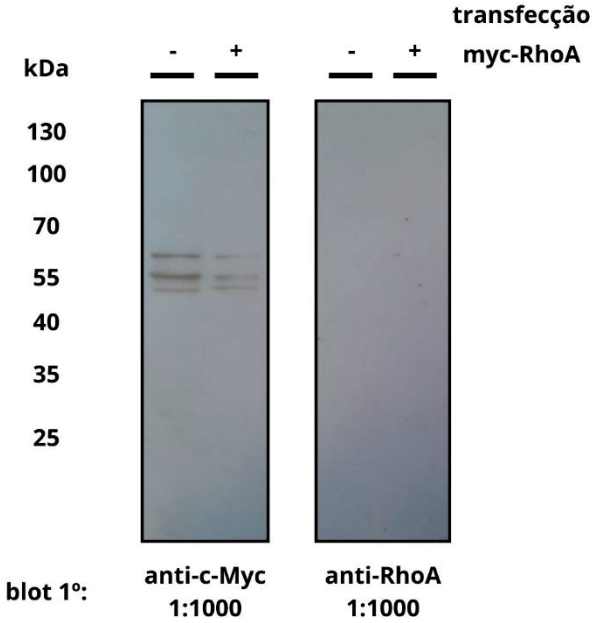


FONTE: O autor (2024)

LEGENDA: *Western blotting* demonstrando a eficiência de expressão da construção pBK-CMV-EGFP-mRhoA. Na parte superior da imagem estão especificados os extratos celulares não-transfectados (-) e transfectados (+). À esquerda estão representadas as massas moleculares de proteínas de referência do marcador molecular. Na parte inferior estão descritos os anticorpos primários testados em cada reação de imunodeteção.

A Figura 8 corresponde à imunodeteção de c-Myc-mRhoA em extrato de células HEK-293T transfectadas com pBK-CMV-c-Myc-mRhoA. Um extrato de células não transfectadas foi utilizado como controle. É possível verificar bandas inespecíficas em torno de 55 kDa, detectadas pelo anticorpo anti-c-Myc em ambos os extratos celulares (não-transfectado e transfectado). A imunodeteção com anticorpo anti-RhoA não apresentou nenhum sinal. A falha na detecção da construção c-Myc-RhoA (≈ 26 kDa) pode ser indicativo de ineficiência de transfecção ou de expressão.

FIGURA 8 - NÃO FOI POSSÍVEL DETECTAR A EXPRESSÃO DE c-Myc-mRhoA EM CÉLULAS HEK-293T VIA *WESTERN BLOTTING*

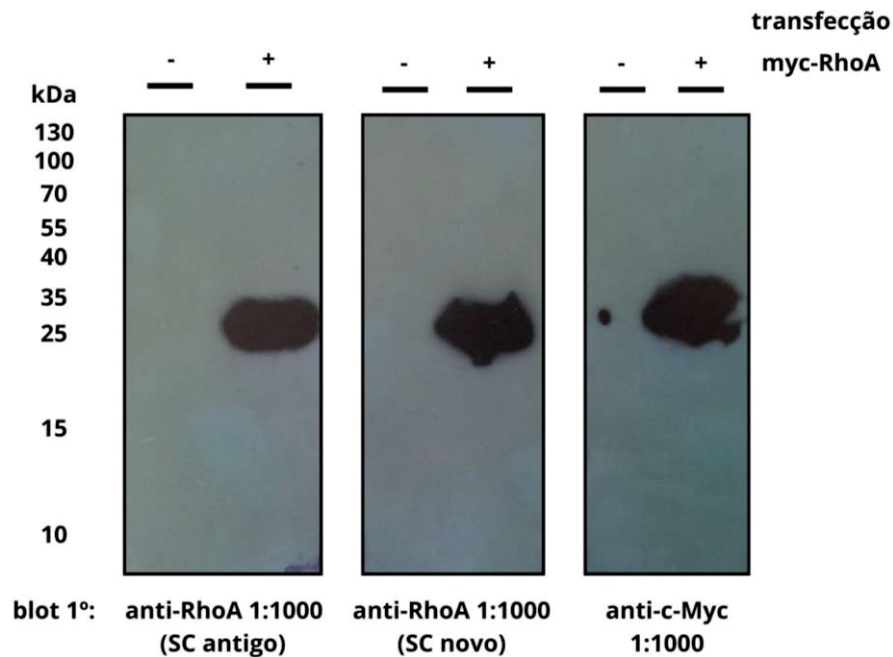


FONTE: O autor (2024)

LEGENDA: *Western blotting* demonstrando a ineficiência de expressão da construção pBK-CMV-c-Myc-mRhoA. Na parte superior da imagem estão especificados os extratos celulares não-transfectados (-) e transfectados (+). À esquerda estão representadas as massas moleculares de proteínas de referência do marcador molecular. Na parte inferior estão descritos os anticorpos primários testados em cada reação de imunodeteção.

A Figura 9 corresponde à imunodeteção de c-Myc-RhoA em extrato de células HEK-293T transfectadas com pRK5-c-Myc-mRhoA. Um extrato de células não transfectadas foi utilizado como controle. É possível verificar bandas específicas entre 25 – 35 kDa detectadas por todos os anticorpos testados, e presentes apenas nos extratos celulares transfectados. Dois lotes diferentes do anticorpo anti-RhoA foram avaliados.

FIGURA 9 - EXPRESSÃO DE c-Myc-RhoA EM CÉLULAS HEK-293T DETECTADA VIA *WESTERN BLOTTING*



FONTE: O autor (2024)

LEGENDA: *Western blotting* demonstrando a eficiência de expressão da construção pRK5-c-Myc-RhoA. Na parte superior da imagem estão especificados os extratos celulares não-transfectados (-) e transfectados (+). À esquerda estão representadas as massas moleculares de proteínas de referência do marcador molecular. Na parte inferior estão descritos os anticorpos primários testados em cada reação de imunodeteção.

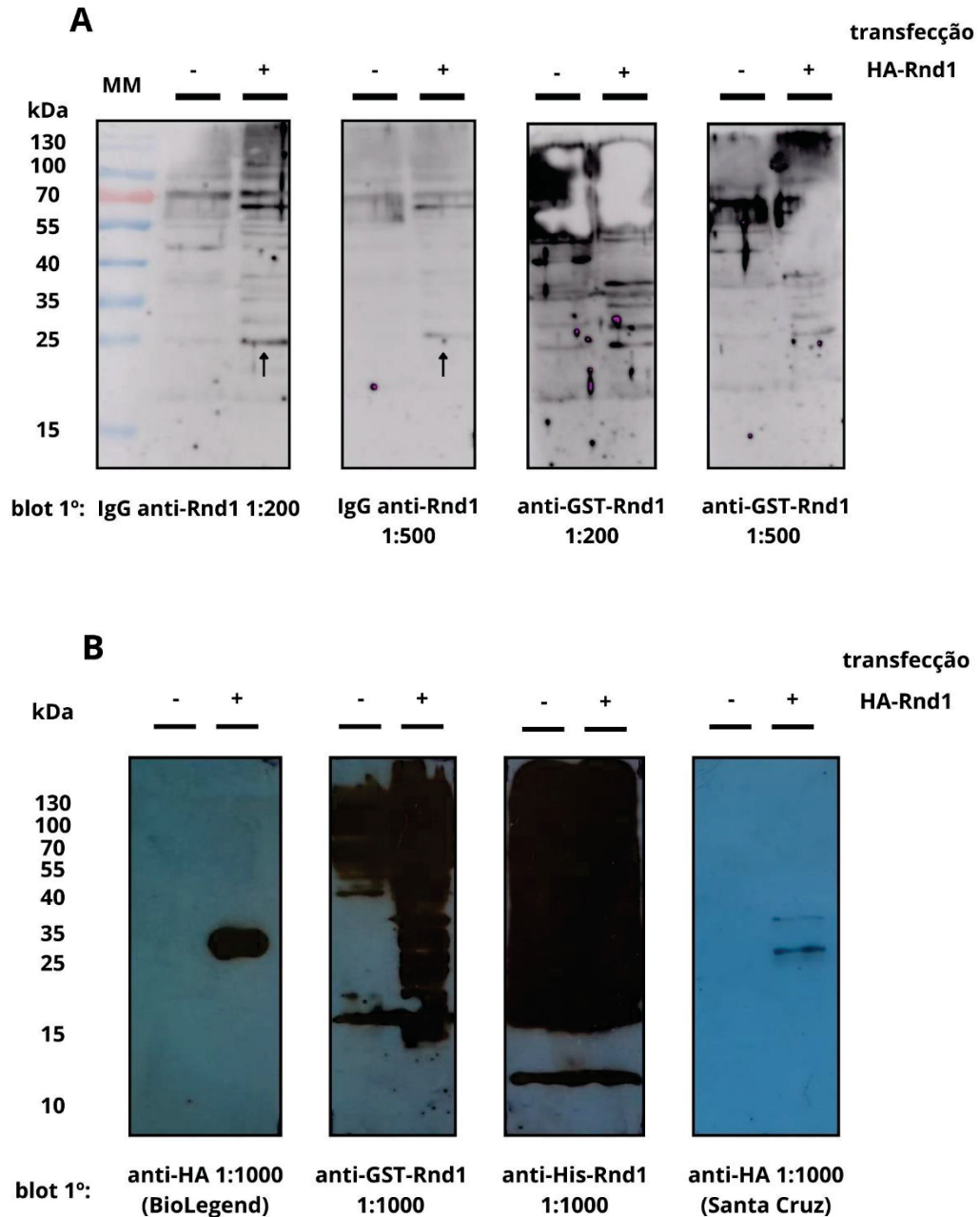
A Figura 10 corresponde à imunodeteção de HA-Rnd1 em extrato de células HEK-293T transfectadas com pcDNA3-HA-Rnd1. Um extrato de células não transfectadas foi utilizado como controle. Diferentes anticorpos anteriormente feitos pela equipe do Laboratório de Neurobiologia estavam disponíveis para detectar tal construção (descritos na Tabela 1). Estes foram testados, como mostrado na Figura 10.

Em 10A é possível verificar uma banda específica correspondente à HA-Rnd1 em 25 kDa, detectada pelo anticorpo IgG anti-Rnd1 nos extratos de células transfectadas, conforme indicado pelas setas. Ainda em 10A é possível constatar que dado lote do anticorpo policlonal anti-GST Rnd1 não demonstrou sinal específico nas diluições testadas.

Já em 10B, nota-se que os anticorpos comerciais anti-HA (BioLegend e Santa Cruz) detectaram especificamente HA-Rnd1 no extrato de células transfectadas (entre

25-35 kDa). Os anticorpos policlonais anti-GST-Rnd1 (outro lote) e anti-His₆-Rnd1 não apresentaram especificidade significativa nas diluições testadas.

FIGURA 10 - EXPRESSÃO DE HA-Rnd1 EM CÉLULAS HEK-293T DETECTADA VIA *WESTERN BLOTTING*

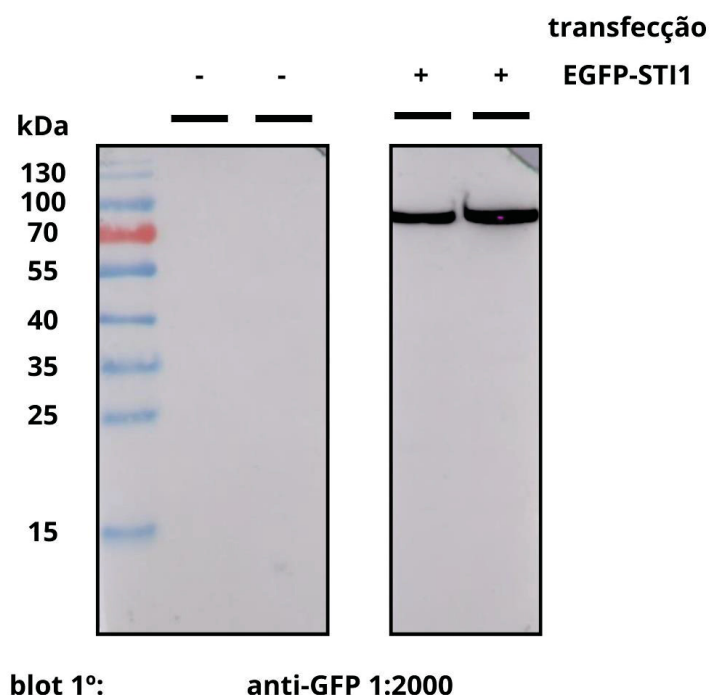


FONTE: O autor (2024)

LEGENDA: *Western blotting* demonstrando a eficiência de expressão da construção pcDNA3-HA-Rnd1. Na parte superior da imagem estão especificados os extratos celulares não-transfectados (-) e transfectados (+). À esquerda estão representadas proteínas de referência do marcador molecular. Na parte inferior estão descritos os anticorpos primários testados em cada reação de imunodeteção.

A Figura 11 corresponde à imunodeteção de EGFP-mSTI1 em extrato de células HEK-293T transfectadas com pEGFP-C1-mSTI1. Um extrato de células não transfectadas foi utilizado como controle. É possível verificar bandas específicas próximas a 100 kDa, presentes apenas nos extratos celulares transfectados.

FIGURA 11 - EXPRESSÃO DE EGFP-mSTI1 EM CÉLULAS HEK-293T DETECTADA VIA *WESTERN BLOTTING*



FONTE: O autor (2024)

LEGENDA: *Western blotting* demonstrando a eficiência de expressão da construção pEGFP-C1-mSTI1. Na parte superior da imagem estão especificados os extratos celulares não-transfectados (-) e transfectados (+). À esquerda estão representadas as massas moleculares de proteínas de referência do marcador molecular. Na parte inferior estão descritos os anticorpos primários testados em cada reação de imunodeteção.

A TABELA 4 resume os resultados obtidos dos testes de expressão das construções utilizadas. As proteínas recombinantes expressas em células de mamífero (linhagens HEK-293T e HeLa) foram detectadas adequadamente após 12-16h de expressão (incubação em estufa de cultivo *overnight*). Já as proteínas expressadas em bactéria puderam ser detectadas 2h após a indução de expressão com IPTG 0.5 mM.

TABELA 4 - RESULTADOS OBTIDOS DA VALIDAÇÃO DE CONSTRUÇÕES

Construção	Proteína recombinante	Sistema de expressão testado	Método de detecção	Expressão validada?
pBK-CMV-EGFP-mRhoA	EGFP-RhoA (RhoA murina)	HEK-293T e HeLa	Imunodeteção	Sim, em HEK-293T e HeLa
pBK-CMV-c-Myc-RhoA	c-Myc-RhoA (RhoA murina)	HEK-293T	Imunodeteção	Não
pcDNA3-HA-Rnd1	HA-Rnd1 (Rnd1 humana)	HEK-293T e HeLa	Imunodeteção	Sim, somente em HEK-293T
pEGFP-C1-mSTI1	EGFP-STI1 (STI1 murina)	HEK-293T e HeLa	Imunodeteção	Sim, em HEK-293T e HeLa
pGEX-4T-2-RBD	GST-RBD (domínio da Rhotekina murina)	<i>E. coli</i> Rosetta 2 (DE3) pLySs	Coloração com Azul de Comassie	Sim
pGEX-4T-2-RhoAG14V	GST-RhoAG14V (RhoAG14V humana)	<i>E. coli</i> Rosetta 2 (DE3) pLySs	Coloração com Azul de Comassie	Sim
pRK5-c-Myc-RhoA	c-Myc-RhoA (RhoA humana)	HEK-293T	Imunodeteção	Sim

FONTE: O autor (2024)

Na TABELA 5 encontram-se compilados os resultados da validação de anticorpos. Na coluna intitulada “Intensidade de sinal” foram utilizados “+” e “-” para representar a quantidade de sinal detectada à partir de dado anticorpo. O símbolo “+” representa um sinal fraco, enquanto “++” simboliza um sinal adequado e “+++” um demasiadamente intenso. O símbolo “-” representa nenhum sinal ou a ausência de especificidade do anticorpo avaliado.

TABELA 5 - RESULTADOS OBTIDOS DA VALIDAÇÃO DE ANTICORPOS

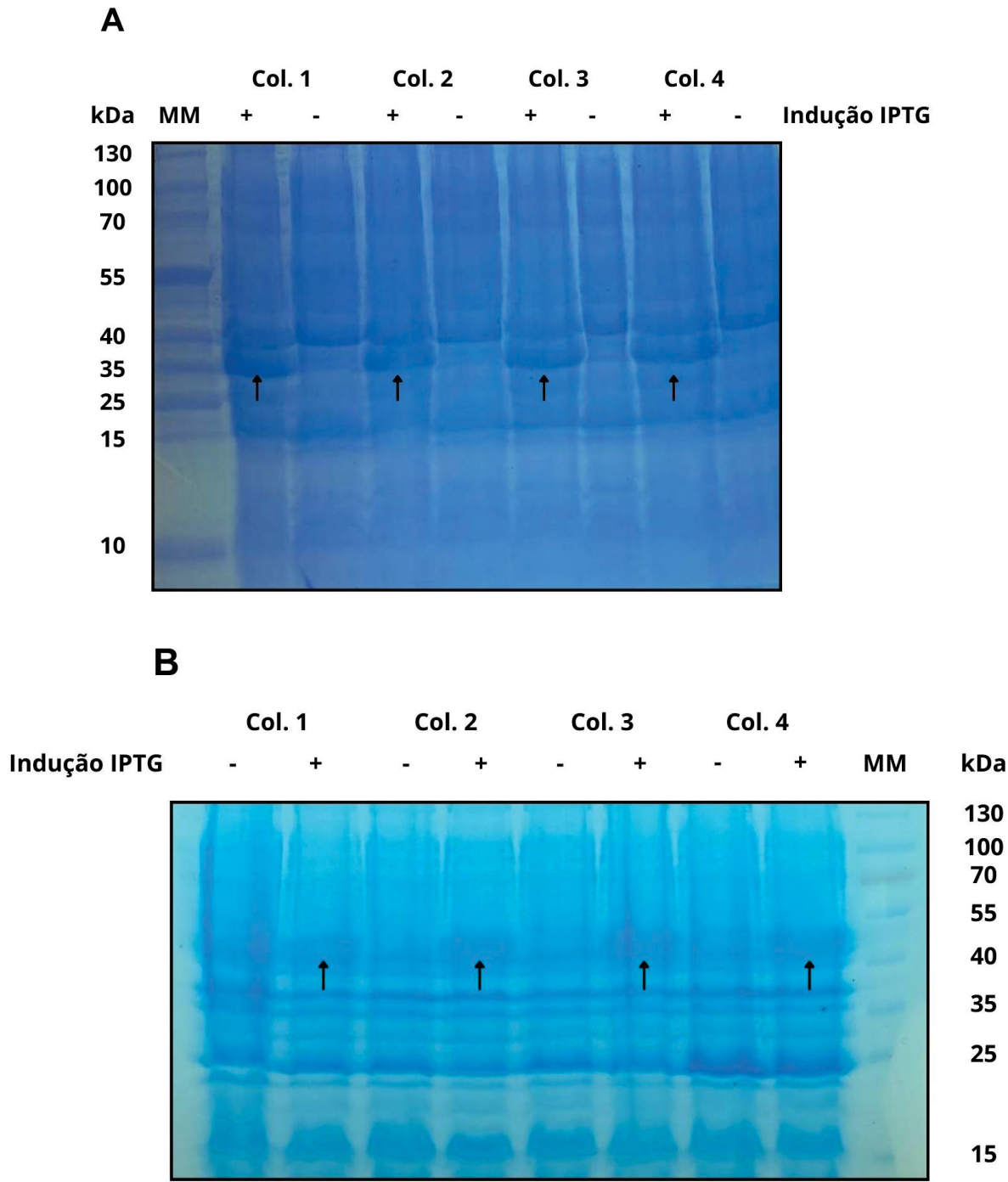
Anticorpo testado	Diluições de uso	Proteínas detectadas	Intensidade de sinal
anti-c-Myc (Sigma-Aldrich)	1:1000	c-Myc-RhoA (RhoA humana)	+++
anti-GFP (doação ICC)	1:2000	EGFP-RhoA e EGFP-STI1	++
anti-GST-Rnd1 (Lab. Neurobiologia)	1:200, 1:500 e 1:1000	Não demonstrou especificidade	-
anti- ϵ His-Rnd1 (Lab. Neurobiologia)	1:1000	Não demonstrou especificidade	-
anti-RhoA (Santa Cruz Biotechnology)	1:1000	c-Myc-RhoA (RhoA humana) e EGFP-RhoA	++
anti-Rnd1 (Lab. Neurobiologia)	1:200 e 1:500	HA-Rnd1 (com baixa especificidade)	+
anti-HA (BioLegend)	1:1000	HA-Rnd1	++
anti-HA (Santa Cruz Biotechnology)	1:1000	HA-Rnd1	+

FONTE: O autor (2024)

4.2 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS DE FUSÃO GST-RBD E GST-RHOAG14V, LIGAÇÃO À RESINA E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA LIGADA

Foram realizados experimentos de mini expressão com 4 colônias transformadas com pGEX-4T-2-RBD ou pGEX-4T-2-RhoAG14V (conforme descrito na seção 3.6). A Figura 12 mostra dois géis de SDS-PAGE com tais colônias de *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS transformadas expressando GST-RBD (A) e GST-RhoAG14V (B). Em 12A as setas indicam as bandas de GST-RBD expressado (≈ 35 kDa), já em 12B as setas apontam as bandas de GST-RhoAG14V expressado (entre 40-55 kDa, ≈ 48 kDa).

FIGURA 12 - GÉIS CONFIRMANDO AS EXPRESSÕES DE GST-RBD E GST-RhoAG14V



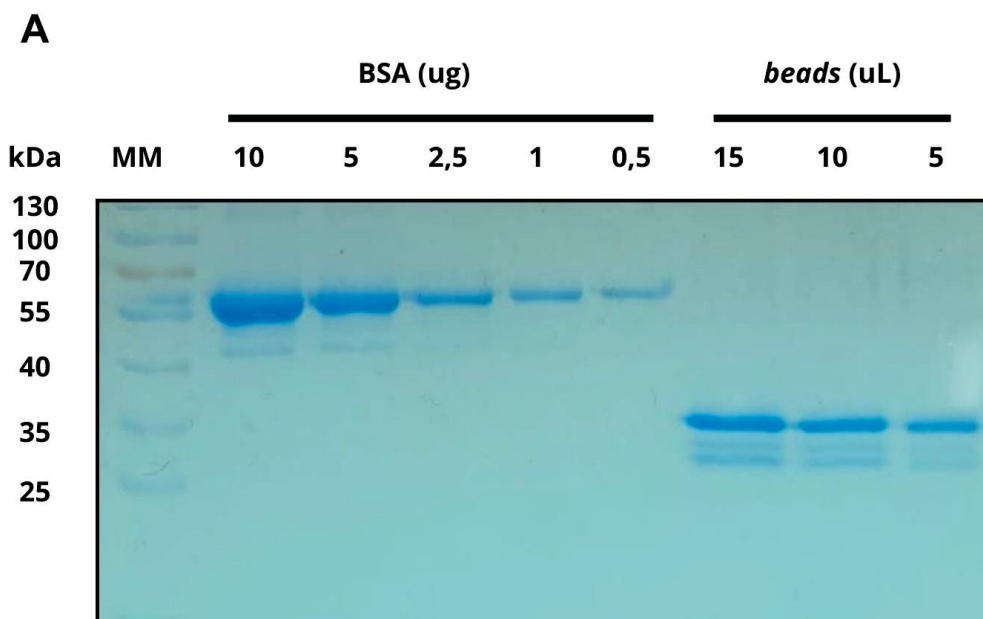
FONTE: O autor (2024)

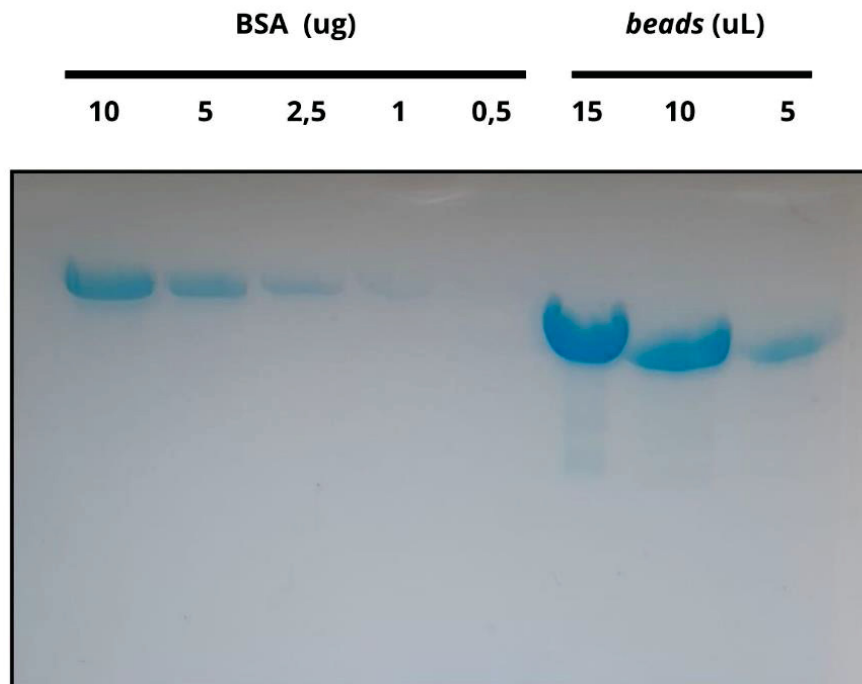
LEGENDA: Géis de SDS-PAGE demonstrando a eficiência de expressão das construções pGEX-4T-2-RBD (A) e pGEX-4T-2-RhoAG14V (B). Na parte superior de cada imagem estão especificadas as colônias transformantes selecionadas (1, 2, 3 e 4), bem como os inóculos que tiveram a expressão proteica induzida com IPTG (+) e os sem adição de IPTG (-). À esquerda em (A) e à direita em (B) estão representadas as massas moleculares de proteínas de referência do marcador molecular.

Após confirmadas as expressões de GST-RBD e GST-RhoAG14V, ambas as proteínas foram expressas em um volume de cultura maior e acopladas à resina Glutathiona Sepharose 4B (processos descritos nas seções 3.7 e 3.8). A Figura 13 mostra dois géis de SDS-PAGE, feitos para quantificar GST-RBD (13A) e GST-RhoAG14V (13B). As *lanes* à esquerda em ambas as imagens contém diferentes quantidades de BSA, que serviram como padrões de comparação de quantidade de proteína.

Tanto em 13A quanto em 13B, as *lanes* à direita mostram diferentes quantidades de suspensão da resina ligada às respectivas proteínas, que foram separadas por eletroforese. Comparando as bandas de GST-RBD em 13A com os padrões de BSA, chegou-se à conclusão de que a concentração de proteína na suspensão de resina era de aproximadamente 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. A concentração de GST-RhoAG14V foi aferida de modo similar em 13B, e estimada em 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

FIGURA 13 - QUANTIFICAÇÃO DE GST-RBD E GST-RhoAG14V LIGADAS ÀS BEADS



B

FONTE: O autor (2024)

LEGENDA: Géis de SDS-PAGE para quantificação de GST-RBD (A) e GST-RhoAG14V (B) ligadas à resina Glutathiona Sepharose 4B. Na parte superior de cada imagem estão especificadas as amostras aplicadas a cada *lane*. À esquerda em (A) estão representadas as massas moleculares de proteínas de referência do marcador molecular.

Deste modo, GST-RBD acoplada à resina Glutathiona Sepharose 4B foi utilizada posteriormente em ensaios *pull-down* para purificação de RhoA-GTP. A construção GST-RhoAG14V, também acoplada à resina, seria utilizada em ensaios *pull-down* para captura da forma ativa de p190RhoGAP. No entanto, não foi possível realizar tais experimentos dentro do prazo do estudo.

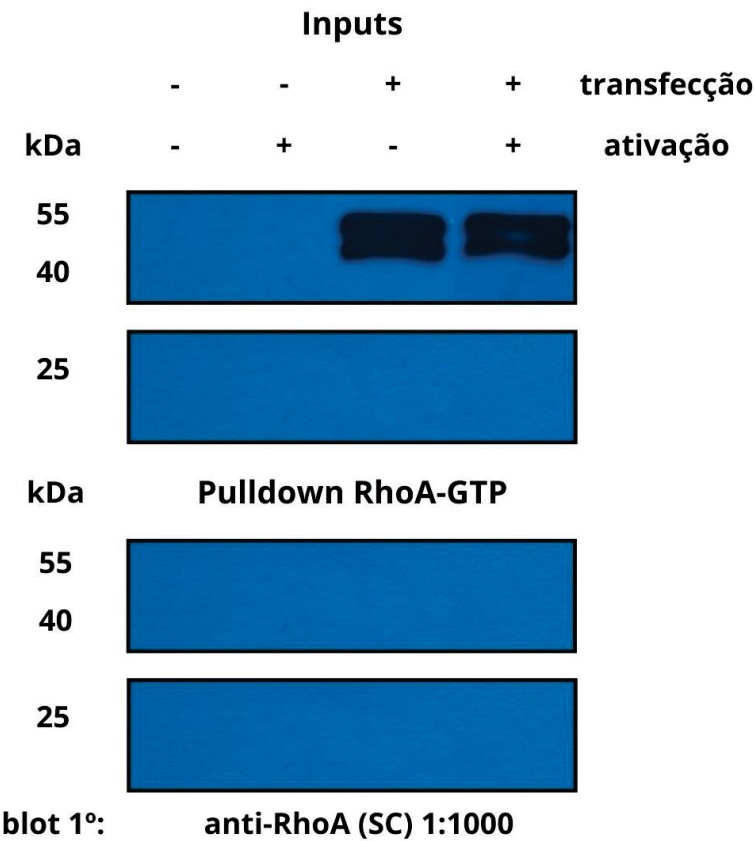
4.3 ENSAIO DE ATIVAÇÃO COM EGF EM CÉLULAS HEK-293T

A Figura 14 mostra a imunodeteção em lisados de células HEK-293T transfectadas e não transfectadas com pBK-CMV-EGFP-mRhoA. Além disso, tais grupos experimentais também foram submetidos à ativação por EGF (descrito na seção 3.10.1).

Bandas específicas correspondentes a EGFP-mRhoA podem ser vistas em torno de 55 kDa apenas nos *inputs* do grupo transfectado. Não foi possível detectar RhoA endógena (≈ 22 kDa) nos *inputs* não transfectados. Os lisados que passaram

por *pulldown* com GST-RBD não apresentaram bandas de RhoA-GTP endógena e nem de EGFP-mRhoA-GTP. Deste modo, não foi possível avaliar se a ativação com EGF foi efetiva.

FIGURA 14 - NÃO FOI POSSÍVEL DETECTAR RhoA ENDÓGENA E AVALIAR A ATIVAÇÃO COM EGF



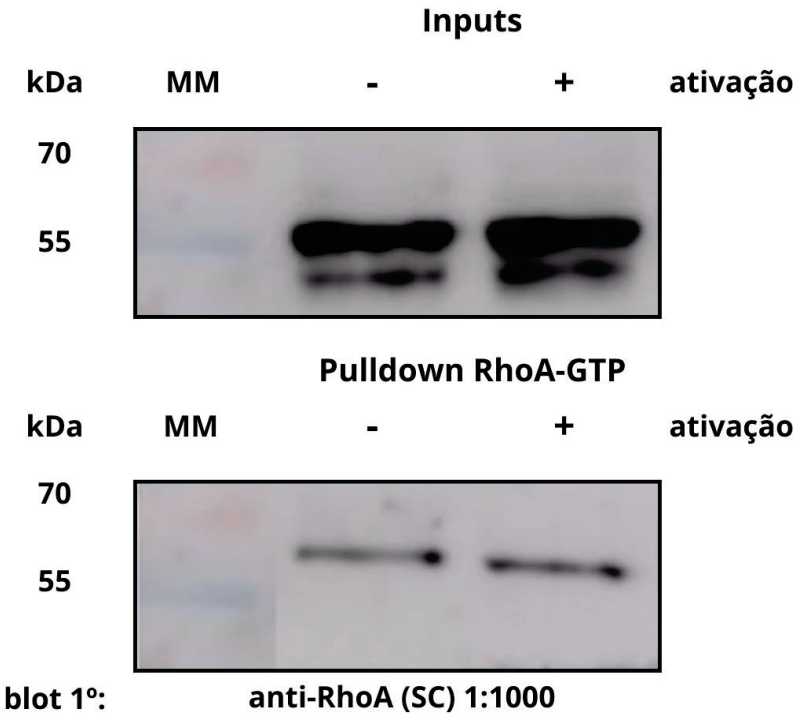
FONTE: O autor (2024)

LEGENDA: *Western blotting* demonstrando a detecção apenas de EGFP-mRhoA em células HEK-293T transfectadas. Na parte superior da imagem estão especificados os extratos celulares não transfectados e transfectados, assim como quais foram ativados com EGF. Ainda na parte superior estão mostrados os *inputs* (controles de RhoA e EGFP-mRhoA totais). Logo abaixo estão os *pulldowns* de RhoA-GTP e EGFP-mRhoA-GTP. À esquerda estão representadas as massas moleculares de proteínas de referência do marcador molecular. Na parte inferior está indicado o anticorpo primário de detecção.

Foram realizadas duas repetições do experimento descrito na seção 3.10.1, e os resultados destas foram semelhantes (representados na Figura 14). Visto que apenas EGFP-mRhoA foi detectada, os ensaios subsequentes de ativação com EGF foram realizados apenas em células transfectadas.

A Figura 15 mostra a imunodetecção de EGFP-mRhoA em células HEK-293T transfectadas com a construção correspondente. Bandas específicas podem ser vistas nos *inputs* (controles de EGFP-mRhoA total), em torno de 55 kDa. Os extratos que passaram por *pulldown* apresentam bandas específicas entre 55 e 70 kDa, representativas da porção de EGFP-mRhoA-GTP.

FIGURA 15 - A ATIVAÇÃO DE EGFP-mRhoA NÃO FOI EFICIENTE EM CÉLULAS HEK-293T



FONTE: O autor (2024)

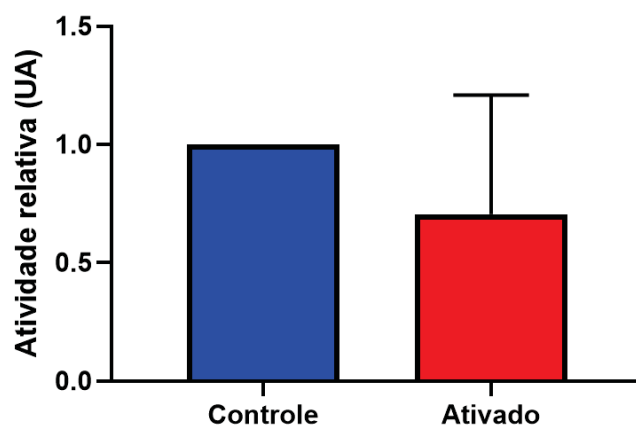
LEGENDA: Imunodetecção de EGFP-mRhoA e EGFP-mRhoA-GTP em células HEK-293T. Na parte superior da imagem estão especificados os lisados de células ativadas (+) e não ativadas (-) com EGF. Também na parte superior estão mostrados os *inputs*. Logo abaixo estão os *pulldowns* de EGFP-mRhoA-GTP. À esquerda estão representadas as massas moleculares de proteínas de referência do marcador molecular. Na parte inferior está indicado o anticorpo primário de detecção.

Foram realizadas duas repetições deste experimento, e resultados semelhantes foram obtidos. Foi feita a densitometria de bandas, o processamento de dados e em seguida a análise estatística (descrito na seção 3.13). O Gráfico 1 foi gerado com a finalidade de ilustrar a diferença entre as porções ativas de EGFP-mRhoA em células ativadas e não ativadas.

Os resultados obtidos sugerem que a ativação de RhoA via EGF em células HEK-293T é ineficiente, visto que a densitometria de EGFP-mRhoA-GTP foi similar

entre os grupos controle e ativado. Caso a ativação tivesse sido eficiente, esperava-se uma banda mais intensa no *pulldown* do grupo experimental ativado – ou seja, uma porção maior de EGFP-mRhoA-GTP.

GRÁFICO 1 - ANÁLISE DENSITOMÉTRICA DEMONSTRA ATIVIDADE SIMILAR DE EGFP-mRhoA EM CÉLULAS HEK-293T ATIVADAS E NÃO-ATIVADAS



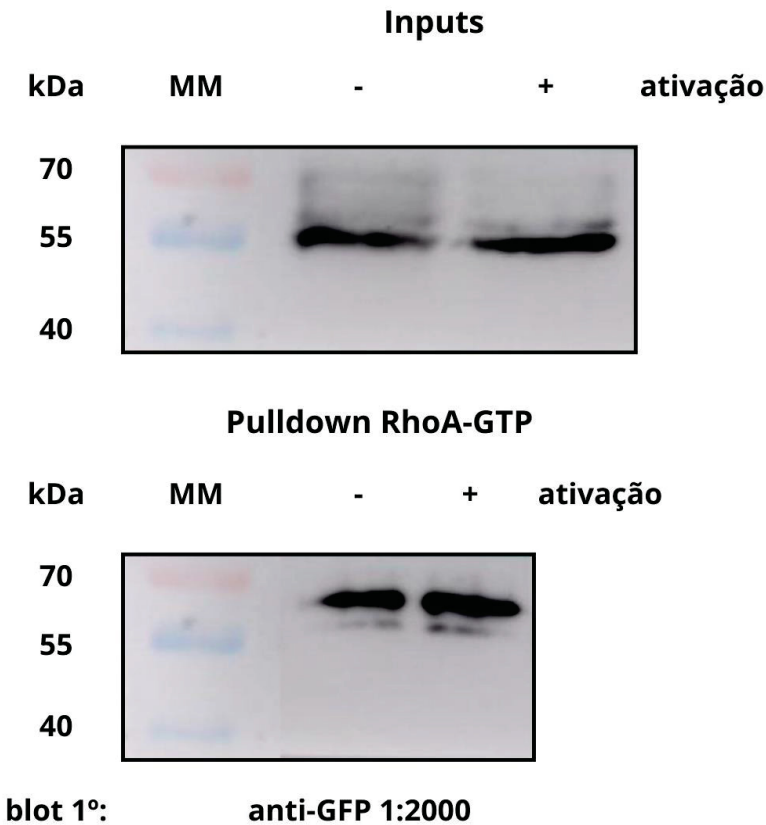
FONTE: O autor (2024).

LEGENDA: Segundo o teste T de Student aplicado não houve diferença significativa entre as médias do grupo controle e tratado (valor p significativo ≤ 0.05 , $n = 2$). A barra representa o desvio padrão. UA = unidade arbitrária.

4.4 ENSAIO DE ATIVAÇÃO COM EGF EM CÉLULAS HeLa

Após a obtenção dos resultados anteriormente detalhados, ensaios de ativação em células HeLa foram realizados – como descreve o protocolo usado como base (PELLEGRIN, 2008). A Figura 16 mostra a imunodeteção de EGFP-mRhoA em células HeLa transfectadas com a construção correspondente. Bandas específicas são observáveis nos *inputs*, em torno de 55 kDa. Os extratos que passaram por *pulldown* apresentam bandas específicas entre 55 e 70 kDa, representativas de EGFP-mRhoA-GTP.

FIGURA 16 - A ATIVAÇÃO DE EGFP-mRhoA FOI EFICIENTE EM CÉLULAS HeLa

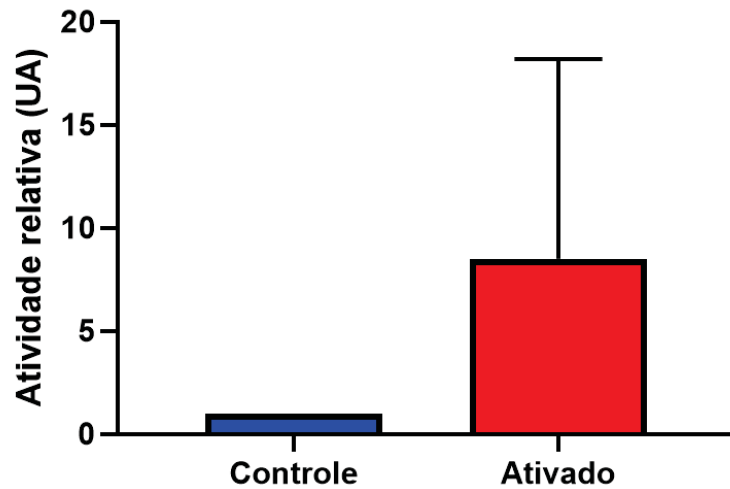


FONTE: O autor (2024).

LEGENDA: Imunodeteção de EGFP-mRhoA e EGFP-mRhoA-GTP em células HeLa. Na parte superior da imagem estão especificados os lisados de células ativadas (+) e não ativadas (-) com EGF. Também na parte superior estão mostrados os *inputs*. Logo abaixo estão os *pulldowns* de EGFP-mRhoA-GTP. À esquerda estão representadas as massas moleculares de proteínas de referência do marcador molecular. Na parte inferior está indicado o anticorpo primário de detecção.

Foram realizadas duas repetições deste experimento e resultados um pouco distintos foram obtidos – ainda que ambos, aparentemente, indiquem que a ativação tenha funcionado. O processamento de dados ocorreu como descrito na seção 3.13. O Gráfico 2 foi gerado com a finalidade de ilustrar a diferença entre as porções ativas de EGFP-mRhoA de células ativadas e não ativadas. Os resultados obtidos sugerem que a ativação de RhoA via EGF em células HeLa foi eficiente, visto que a densitometria de EGFP-mRhoA-GTP foi maior no grupo ativado do que no controle.

GRÁFICO 2 - ANÁLISE DENSITOMÉTRICA REVELA MAIOR ATIVIDADE DE EGFP-mRhoA EM CÉLULAS HeLa ATIVADAS



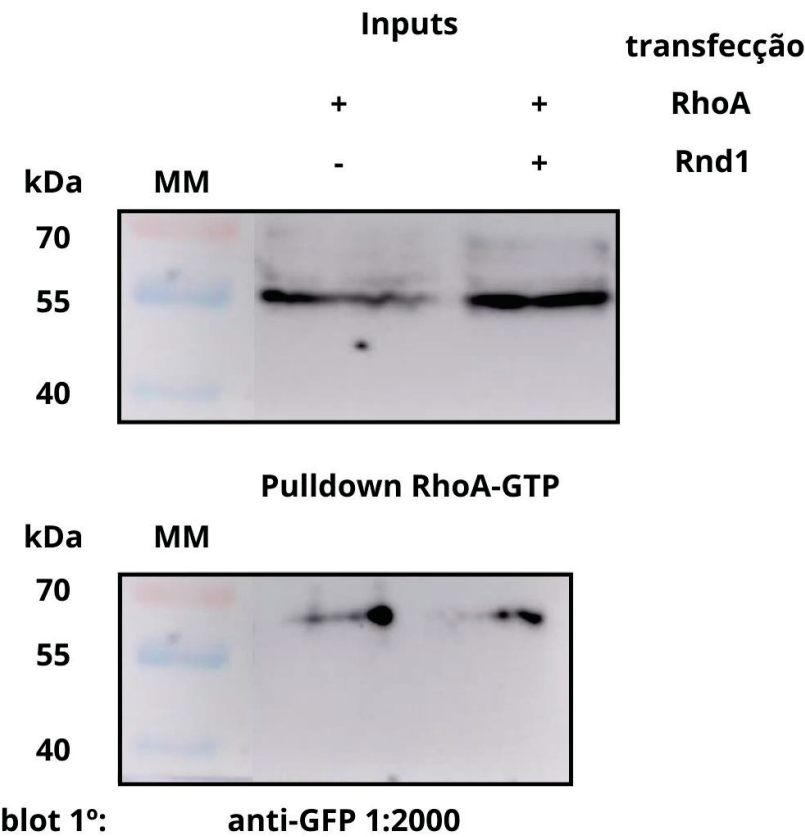
FONTE: O autor (2024).

LEGENDA: Segundo o teste T de Student aplicado não houve diferença significativa entre as médias do grupo controle e tratado (valor p significativo ≤ 0.05 , $n = 2$). A barra representa o desvio padrão. UA = unidade arbitrária.

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE RhoA EM CÉLULAS HeLa CO-TRANSFECTADAS COM EGFP-mRHOA E HA-Rnd1

Como descrito na seção 3.11, células HeLa foram co-transfectadas com as construções correspondentes às proteínas EGFP-mRhoA e HA-Rnd1. A Figura 17 mostra a imunodeteção de EGFP-mRhoA nestes grupos experimentais. É possível ver bandas específicas nos *inputs*, em torno de 55 kDa. Os lisados que passaram por *pulldown* apresentam bandas específicas entre 55 e 70 kDa - equivalentes a EGFP-mRhoA-GTP.

FIGURA 17 - CO-TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS HeLa COM EGFP-mRhoA E HA-Rnd1 DIMINUIU A PORÇÃO DE RhoA ATIVA

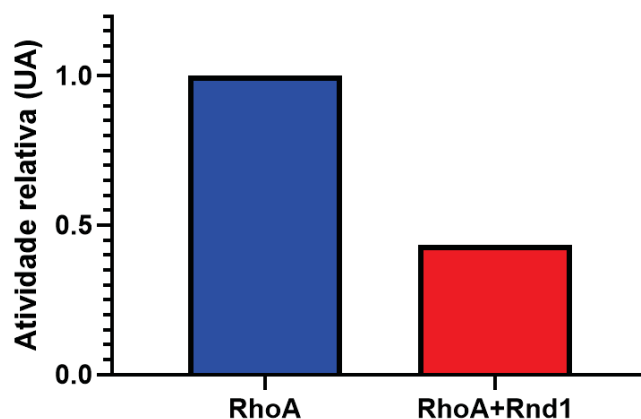


FONTE: O autor (2024).

LEGENDA: Imunodetecção de EGFP-mRhoA e EGFP-mRhoA-GTP em células HeLa co-transfectadas com EGFP-mRhoA e HA-Rnd1. Na parte superior da imagem estão especificadas as transfecções realizadas. Também na parte superior estão mostrados os *inputs*. Logo abaixo estão os pulldowns de EGFP-mRhoA-GTP. À esquerda estão representadas as massas moleculares de proteínas de referência do marcador molecular. Na parte inferior está indicado o anticorpo primário de detecção.

Foi realizada uma repetição deste experimento. O processamento de dados ocorreu conforme detalhado na seção 3.13. O Gráfico 3 foi gerado com a finalidade de ilustrar a diferença entre as porções ativas de EGFP-mRhoA de células expressando apenas EGFP-mRhoA e células expressando também HA-Rnd1. O resultado obtido sugere que a superexpressão de HA-Rnd1 diminuiu a atividade de EGFP-mRhoA.

GRÁFICO 3 - ANÁLISE DENSITOMÉTRICA APONTA MENOR ATIVIDADE DE RhoA NO GRUPO CO-TRANSFECTADO COM HA-Rnd1



FONTE: O autor (2024).

LEGENDA: UA = unidade arbitrária.

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE RhoA EM CÉLULAS HeLa CO-TRANSFECTADAS COM EGFP-mRHOA, EGFP-mSTI1 E HA-Rnd1

Visando elucidar uma possível função de STI1 na via Rnd1-p190RhoGAP-RhoA, células HeLa foram co-transfectadas com as construções correspondentes às proteínas EGFP-mRhoA, EGFP-mSTI1 e HA-Rnd1 (detalhado na seção 3.12). Pouco antes da lise, a eficiência de transfecção foi avaliada visualmente. Nesta etapa foi constatado que $20\% \leq$ das células possuíam fluorescência de EGFP – o que indicaria baixa eficiência. Duas repetições deste experimento foram feitas e resultados semelhantes foram obtidos.

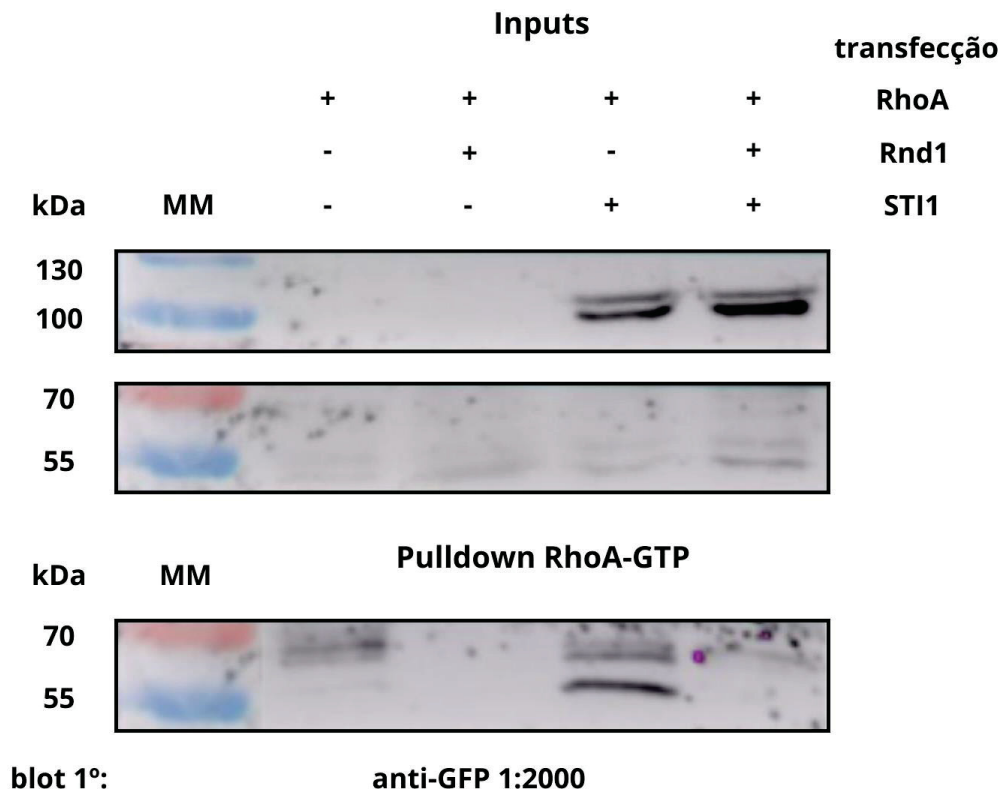
A Figura 18 mostra a imunodetecção de EGFP-mRhoA, EGFP-mRhoA-GTP e EGFP-mSTI1 nos grupos experimentais delimitados. Bandas específicas nos *inputs* próximas à 100 kDa equivalem à EGFP-mSTI1. As bandas dos *inputs* correspondentes à EGFP-mRhoA, em torno de 55 kDa, estão muito fracas – corroborando com a baixa eficiência de transfecção observada. Não foi possível detectar HA-Rnd1 nos *inputs* (≈ 26 kDa).

Os lisados que passaram por *pulldown* apresentam bandas específicas entre 55 e 70 kDa - equivalentes a EGFP-mRhoA-GTP. É possível afirmar que a atividade de EGFP-mRhoA foi similar no controle (transfectado apenas com EGFP-mRhoA) e no grupo experimental que expressou EGFP-mRhoA e EGFP-mSTI1. Para o grupo co-transfectado com as GTPases (EGFP-mRhoA e HA-Rnd1) não houve uma

quantidade detectável de EGFP-mRhoA ativa. Uma porção diminuta de EGFP-mRhoA-GTP no grupo transfectado com as três proteínas pode ser observada.

Não foi possível seguir às análises descritas na seção 3.13 devido ao fraco sinal de EGFP-mRhoA nos *inputs* e ao sinal de *background* nos *pulldowns* de EGFP-mRhoA-GTP.

FIGURA 18 - A TRIPLA CO-TRANSFEÇÃO FOI POUCO EFICIENTE EM CÉLULAS HeLa



FONTE: O autor (2024).

LEGENDA: Imunodeteção de EGFP-mRhoA e EGFP-mRhoA-GTP em células HeLa co-transfectadas com EGFP-mRhoA, EGFP-mSTI1 e HA-Rnd1. Na parte superior da imagem estão especificadas as transfeções realizadas. Também na parte superior estão mostrados os *inputs*. Logo abaixo estão os *pulldowns* de EGFP-mRhoA-GTP. À esquerda estão representadas as massas moleculares de proteínas de referência do marcador molecular. Na parte inferior está indicado o anticorpo primário de detecção.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Três construções foram testadas nesse trabalho para expressão de RhoA: pBK-CMV-c-Myc-RhoA, pBK-CMV-EGFP-mRhoA e pRK5-c-Myc-RhoA. Como visto nas Figuras 7, 8 e 9 (seção 4.1), a única construção que não demonstrou uma expressão satisfatória foi pBK-CMV-c-Myc-RhoA. Para avaliar a integridade de tal plasmídio, este

foi digerido com a enzima de restrição XbaI e separado eletroforéticamente em gel de agarose 1 % m/v (Anexo 2). Obteve-se uma banda de tamanho ligeiramente menor que o ao esperado (≈ 5 kb $\rightarrow$ 4,5 kb do *backbone* pBK-CMV + 0,5 kb do inserto myc-RhoA) e não haviam outras bandas, indicando ausência de contaminação. Tal diferença de tamanho pode indicar algum problema na inserção do cDNA no sítio de clonagem múltipla do vetor.

Foram realizadas duas tentativas de sequenciamento do inserto do plasmídio (dados não apresentados), utilizando BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) e os *primers* M13 (*Forward* e *Reverse*). Em ambas as tentativas resultados semelhantes foram obtidos: cromatogramas com baixa resolução (picos com grandes porções sobrepostas), picos de fluorescência fora do intervalo de detecção, amplificação de $\approx 1,5$ kb a partir do *primer Forward* e de 30 b partindo do *Reverse*.

As transfecções com pBK-CMV-EGFP-mRhoA e pRK5-c-Myc-RhoA foram eficientes em células HEK-293T (Figuras 7 e 9), sendo bandas específicas de EGFP-mRhoA ($\approx 48,7$ kDa $\rightarrow$ 21.7 kDa de mRhoA + 26.9 kDa da *tag* EGFP) e c-Myc-RhoA (≈ 22.9 kDa $\rightarrow$ 21.7 kDa de RhoA + 1.2 kDa de c-Myc) reveladas. Os anticorpos anti-GFP, anti-RhoA e anti-c-Myc demonstraram especificidade de ligação, e tiveram suas diluições de uso padronizadas (anti-GFP = 1:2000, anti-RhoA = 1:1000 e anti-c-Myc = 1:1000). Nos experimentos de co-transfecção que se seguiram foi utilizado o plasmídio pBK-CMV-EGFP-mRhoA, pois o plasmídio pRK5-Myc-RhoA ainda não havia chegado após aquisição.

A transfecção com pcDNA3-HA-Rnd1 também foi eficiente (Figura 10), sendo uma banda específica e de tamanho aproximado ao da construção revelada (≈ 27.1 kDa $\rightarrow$ 26 kDa de Rnd1 + 1.1 kDa da *tag* HA). Os anticorpos anti-HA comerciais foram os que demonstraram maior especificidade na diluição 1:1000, como visto na Figura 10B. Deste modo, nos experimentos posteriores de co-transfecção os *blots* para detecção de HA-Rnd1 foram realizados com o anticorpo anti-HA da Santa Cruz, pois o anticorpo BioLegend chegou apenas ao final do presente estudo.

Três anticorpos produzidos anteriormente no Laboratório de Neurobiologia também foram avaliados para detecção de HA-Rnd1: anti-GST-Rnd1, anti-His-Rnd1 e IgG anti-Rnd1. O anticorpo IgG anti-Rnd1 apresentou uma banda específica no extrato de células HEK-293T transfectadas (indicada pelas setas na Figura 10B, em torno de 25 kDa). Apesar da grande quantidade de ligações inespecíficas (parte

superior da membrana), é possível que este seja útil desde que se otimize a diluição do anticorpo e as lavagens ao longo do processo de *Western blotting*.

Por fim, a transfecção de HEK-293T com pEGFP-C1-mSTI1 foi eficaz e uma banda específica correspondente à EGFP-mSTI1 ($\approx 89.4 \text{ kDa} \rightarrow 62.5 \text{ kDa}$ de mSTI1 + 26.9 kDa de EGFP) pôde ser detectada pelo anticorpo anti-GFP (Figura 11). As expressões de GST-RBD e GST-RhoAG14V em *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS foram confirmadas por experimentos de mini expressão (Figuras 12A e 12B, respectivamente). Tais proteínas foram expressas em larga escala (separadamente) e ligadas à resina Glutathione Sepharose 4B. Logo após, quantificou-se as proteínas recombinantes ligada às *beads* (Figuras 13A e 13B). As bandas abaixo de $\approx 35.7 \text{ kDa}$ (em 13A) e $\approx 48.7 \text{ kDa}$ (em 13B) são produtos de degradação proteica, comuns em preparações deste tipo e não afetaram os ensaios de *pulldown* posteriores (PELLEGRIN, 2008; BENARD, 2002).

Os ensaios iniciais de ativação de RhoA com EGF em células HEK-293T demonstraram que a RhoA endógena da linhagem não é suficiente à imunodetecção (Figura 14). Deste modo, os ensaios subsequentes foram realizados somente com células transfectadas com EGFP-mRhoA. Na Figura 15 observam-se bandas em torno de 55 kDa nos *inputs* (RhoA total) e, um pouco mais acima, nos extratos que passaram por *pulldown* (RhoA-GTP). No entanto, não foi constatada diferença significativa entre as porções de RhoA-GTP de células ativadas e não ativadas com EGF (Gráfico 1).

Visto que os ensaios de ativação utilizaram EGF como ativador, uma explicação plausível para tal observação é de que o nível de expressão de Receptor de Fator de Crescimento Epidermal (EGFR) é muito baixo em células HEK-293T (THE HUMAN PROTEIN ATLAS, [s.d.]). O protocolo utilizado como base para tais ensaios de ativação descreve uma ativação robusta de RhoA utilizando EGF em células HeLa (PELLEGRIN, 2008). No entanto, como os experimentos até então planejados de avaliação da atividade de RhoA em células co-transfectadas seriam realizados em células HEK-293T, decidiu-se utilizar tal modelo celular nos ensaios de ativação.

Segundo consulta na base de dados *The Human Protein Atlas*, a expressão de EGFR em células HeLa é aproximadamente 7.8 vezes maior do que a expressão em células HEK-293 (26.4 nTPM HeLa contra $3.4 \text{ nTPM HEK-293} \rightarrow \text{nTPM} = \text{número de transcritos por milhão}$). Considerando que a principal diferença entre células HEK-293 e HEK-293T é que as últimas expressam o antígeno T grande de SV40 (o que aumenta a eficiência de transfecção destas), pode-se afirmar que o transcriptoma de

ambas as linhagens é muito similar. Assim, parece válida a hipótese de que o baixo nível de expressão de EGFR em células HEK-293T não permitiu uma ativação robusta de RhoA.

Assim, os ensaios posteriores de ativação com EGF foram realizados em células HeLa, conforme descrito no protocolo de referência original. Na Figura 16 é possível observar um discreto aumento de EGFP-mRhoA-GTP quando comparadas células ativadas e o controle. A repetição apresentada na Figura 16, quando quantificada, demonstrou um aumento na porção de EGFP-mRhoA-GTP em relação ao controle de 1.6 vezes. Já na outra repetição, o extrato de células ativadas apresentou um aumento de RhoA-GTP bem mais robusto em relação ao controle, de 15.3 vezes.

A grande variabilidade dos resultados entre as repetições e o número amostral pequeno contribuíram para que o teste T não apontasse diferença significativa entre os grupos controle e tratado. Tais resultados também explicam o grande desvio padrão apontado (Gráfico 2). Apesar disso, os resultados parecem indicar que a ativação de RhoA via EGF funcionou. Portanto, o aumento na porção de EGFP-mRhoA-GTP em células HeLa ativadas demonstra a ligação específica de GST-RBD à forma ativa da proteína.

A co-transfecção de EGFP-mRhoA e HA-Rnd1 foi realizada em células HeLa por duas razões: para ser fidedigna ao experimento original retratado no artigo de Oinuma e colaboradores (2012), e pela maior facilidade de manipulação de tal linhagem em relação às células HEK-293T, que são pouco aderentes. Como visto na Figura 17, aparentemente a porção de EGFP-mRhoA-GTP foi diminuída no grupo co-transfectado com as GTPases (em relação ao grupo controle). A densitometria de tal experimento (Gráfico 3) confirma tal observação, ainda que não seja possível determinar se há significância estatística – pois apenas uma repetição foi realizada.

Devido a um erro experimental não foi possível detectar via *Western blotting* a expressão de HA-Rnd1. Deste modo, não seria correto afirmar que a superexpressão de HA-Rnd1 foi responsável pela diminuição na porção de EGFP-mRhoA – ainda que a literatura existente corrobore com tal alegação.

A co-transfecção de EGFP-mRhoA, EGFP-mSTI1 e HA-Rnd1 foi realizada em células HeLa também por estas serem mais aderentes do que a linhagem HEK-293T, visto que tal experimento foi realizado em placas de 150 mm – o que dificultava a manipulação. Na Figura 18 é possível visualizar nos *inputs* em torno de 100 kDa que

a transfecção com EGFP-mSTI1 foi eficiente. Isso contrasta com a imunodetecção de EGFP-mRhoA nos *inputs* e de EGFP-mRhoA-GTP (*pulldown*), que foi muito próxima ao limite de detecção da técnica. Estes dados corroboram com a observação pré-lise das placas, que apontou poucas células com fluorescência de EGFP – ou seja, a eficiência de transfecção de pBK-CMV-EGFP-mRhoA foi baixa diante da tripla co-transfecção. Não foi possível imunodetectar HA-Rnd1 utilizando anticorpo anti-HA (Santa Cruz), não sendo confirmada a co-transfecção de tal construção.

Analisando visualmente os *pulldowns* e considerando o grupo de células transfectadas com EGFP-mRhoA como controle, é possível inferir que a co-transfecção com EGFP-mSTI1 aumentou ligeiramente a atividade de EGFP-mRhoA. Uma suposição que explicaria tal observação é que a ligação de EGFP-mSTI1 a Rnd1 endógena impossibilitaria a ligação desta a p190RhoGAP – diminuindo o estímulo à atividade hidrolítica de RhoA. Considerando que nosso grupo de pesquisa demonstrou anteriormente a interação *in vitro* entre STI1 e Rnd1, e que na literatura a inibição de RhoA por Rnd1 já é bem estabelecida (OINUMA, 2012; WENNERBERG, 2003), essa seria uma hipótese a se considerar.

Apesar da co-transfecção com HA-Rnd1 não ter sido comprovada/detectada, ela parece ter diminuído bastante a porção de EGFP-mRhoA ativa – o que ratificaria o resultado obtido na Figura 17. Por último, a co-transfecção com ambas as proteínas (Rnd1 e STI1) também aparenta ter diminuído a atividade de RhoA – ainda que tal atividade seja um pouco maior do que a exibida por células co-transfectadas apenas com HA-Rnd1. Uma hipótese seria que a interação entre EGFP-mSTI1 e HA-Rnd1 diminuiu a porção de HA-Rnd1 que se ligou à p190RhoGAP – em comparação com o grupo co-transfectado apenas com HA-Rnd1. Para confirmar tais suposições, mais experimentos são necessários.

5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Foram encontradas grandes dificuldades ao manipular células HEK-293T transfectadas com as GTPases. Os protocolos utilizados incluem lavagens pré-lise, nas quais várias células foram perdidas. Considerando a baixa aderência de tal linhagem aliada à transfecção com proteínas relativas à sinalização de modulação do citoesqueleto, aumentar a aderência das células cultivadas parece essencial para otimizar os experimentos propostos.

Já foi demonstrado que o revestimento com PEI e poli-D-lisina aumentam a aderência de células HEK-293 (FAUSSNER, 2022; VANCHI, 2004). Faussner e colaboradores (2022) desenvolveram um protocolo no qual PEI e poli-D-lisina são adicionados diretamente ao meio de cultivo, sem a necessidade de um pré-revestimento com estes reagentes. Ademais, o uso de PEI como fator de adesão também aumenta a eficiência de transfecção por reagentes lipídicos (VANCHI, 2004).

Uma conclusão importante tirada a partir da padronização do ensaio de ativação de RhoA é de que a expressão endógena de RhoA em células HEK-293T não é suficiente à detecção experimental. Portanto, se mostra necessária a tripla co-transfecção com EGFP-mRhoA, EGFP-mSTI1 e HA-Rnd1 ao experimento de avaliação da atividade de RhoA em células HEK-293T.

As transfecções transientes fornecem um método para induzir perturbação genética em experimentos de biologia molecular e constituem um meio para estudar a resposta dos sistemas observados. No entanto, a eficiência de transfecção tem uma faixa ótima limitada, dependendo da formação do complexo de DNA-reagente, pH da solução, condição da membrana celular e tipo de célula (KIM, 2010). Além disso, diferenças na eficiência de transfecção e no número de cópias de DNA podem confundir os resultados experimentais. Outra possível fonte de variabilidade reside no fato de que células individuais do mesmo lote podem exibir capacidades diferentes de expressar proteína recombinante (VITOR, 2018).

Todas as construções utilizadas no presente estudo possuíam o mesmo promotor forte (CMV) e origens de replicação derivadas do vetor pUC, que geram um alto número de cópias plasmidiais. O trabalho de Frei e colaboradores (2020) demonstrou que, no mínimo, tanto a transcrição quanto a tradução são afetadas pela disponibilidade de recursos intracelulares. No mesmo estudo foi constatado que, à medida que a quantidade total de cópias plasmidiais aumenta, a expressão proteica atinge um platô.

O trabalho pioneiro em bactérias de Scott e colaboradores (2010) revelou que as células possuem uma quantidade finita de recursos intracelulares disponíveis para expressão gênica (por exemplo RNA polimerases, ribossomos, proteases e fontes de energia), e a competição pela utilização de tais recursos ocorre tanto entre genes exógenos, quanto entre genes exógenos e endógenos. A competição por recursos implica que se uma unidade transcricional utiliza mais recursos, isso leva a uma diminuição nos recursos disponíveis para operar os processos fisiológicos celulares,

ou ainda, para expressar outras unidades transcricionais sintéticas – o que leva a uma diminuição artificial em seus níveis de expressão (DI BLASI, 2021). Assim, os cassetes de expressão, outrora regulados de forma independente, acabam por se tornar interligados pelo uso de recursos.

Se negligenciados e não incluídos na análise experimental, os efeitos da competição por recursos, tanto no nível da célula hospedeira quanto da construção, podem representar uma fonte de variabilidade de dados. Deste modo, sugere-se a reavaliação do design experimental de co-transfecção. Caso se deseje manter tal modelo, a quantidade de DNA plasmidial total por grupo experimental e o tempo de expressão (pós-troca do meio contendo *mix* de transfecção) devem ser otimizados, com o intuito de aprimorar a detecção de EGFP-mRhoA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMANO, M.; NAKAYAMA, M.; KAIBUCHI, K. Rho-kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. **Cytoskeleton**, [s. l.], v. 67, n. 9, p. 545–554, 2010. DOI: 10.1002/cm.20472. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3038199/pdf/cm0067-0545.pdf>. Acesso em: 12 dez. 2023.

BAINDUR-HUDSON, S.; EDKINS, A. L.; BLATCH, G. L. Hsp70/Hsp90 Organising Protein (Hop): Beyond Interactions with Chaperones and Prion Proteins. *In*: BLATCH, G.; EDKINS, A. (org.). **The Networking of Chaperones by Co-Chaperones**. Nova Iorque: Springer, 2015. p. 69–90. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-11731-7_3. Acesso em: 21 jul. 2024.

BECKLEY, S. J. *et al.* STIP1/HOP Regulates the Actin Cytoskeleton through Interactions with Actin and Changes in Actin-Binding Proteins Cofilin and Profilin. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 21, n. 9, p. 3152, 2020. DOI: 10.3390/ijms21093152. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/9/3152>. Acesso em: 11 dez. 2022.

BENARD, V.; BOKOCH, G.M. Assay of Cdc42, Rac, and Rho GTPase activation by affinity methods. **Methods in Enzymology**, [s. l.], v. 345, p. 349-59, 2002. DOI: 10.1016/s0076-6879(02)45028-8.

BISHOP, A. L.; HALL, A. Rho GTPases and their effector proteins. **Biochemical Journal**, Grã-Bretanha, v. 348, n. 2, p. 241-55, 2000. PMID: 10816416. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1221060/pdf/10816416.pdf>. Acesso em: 18 jul. 2024.

BHATTACHARYA, K.; PICARD, D. The Hsp70–Hsp90 go-between Hop/Stip1/Sti1 is a proteostatic switch and may be a drug target in cancer and neurodegeneration. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [s. l.], v. 78, p. 7257–7273, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03962-z>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-021-03962-z>. Acesso em: 11 dez. 2022.

BOYRIE, S.; DELMAS, C.; LEMARIÉ, A.; LUBRANO, V.; DAHAN, P.; MALRIC, L.; LUIS, J.; GILHODES, J.; TOSOLINI, M.; MOULY, L. *et al.* RND1 regulates migration of human glioblastoma stem-like cells according to their anatomical localization and defines a prognostic signature in glioblastoma. **Oncotarget**, [s. l.], v. 9, p. 33788–33803, 2018. DOI: 10.18632/oncotarget.26082. Disponível em: <https://www.oncotarget.com/article/26082/text/>. Acesso em: 30 jul. 2024.

BUSTELO, X.R. Rho GTPases in cancer: known facts, open questions, and therapeutic challenges. **Biochemical Society Transactions**, [s. l.], v. 46, n. 3, p. 741-760, 2018. DOI: 10.1042/BST20170531. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7615761/>. Acesso em: 2 ago. 2024.

CHEN, L.; ZHANG, Y.-H.; ZHANG, Z.; HUANG, T.; CAI, Y.-D. Inferring Novel Tumor Suppressor Genes with a Protein-Protein Interaction Network and Network Diffusion Algorithms. **Molecular Therapy Methods & Clinical Development**, v. 10, p. 57–67, 2018. Disponível em: [https://www.cell.com/molecular-therapy-family/methods/fulltext/S2329-0501\(18\)30061-5](https://www.cell.com/molecular-therapy-family/methods/fulltext/S2329-0501(18)30061-5). Acesso em: 22 ago. 2024.

CHEN, Z. *et al.* Autocrine STIP1 signaling promotes tumor growth and is associated with disease outcome in hepatocellular carcinoma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 493, n. 1, p. 365–372, 2017. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.09.016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28887036/>. Acesso em: 12 dez. 2022.

CLARKE, K.; DAUBON, T.; TURAN, N.; SOULET, F.; MOHD ZAHARI, M.; RYAN, K.R.; DURANT, S.; HE, S.; HERBERT, J.; ANKERS, J.; *et al.* Inference of Low and High-Grade Glioma Gene Regulatory Networks Delineates the Role of Rnd3 in Establishing Multiple Hallmarks of Cancer. **PLoS Genetics**, v. 11, n. 7, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4488580/>. Acesso em: 25 jul. 2024.

CROSAS-MOLIST, E.; SAMAIN, R.; KOHLHAMMER, L.; ORGAZ, J.L. *et al.* Rho GTPase signaling in cancer progression and dissemination. **Physiological Reviews**, [s.l.], v. 102, n. 1, p. 455-510, 2022. DOI:10.1152/physrev.00045.2020. Disponível em: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/physrev.00045.2020>. Acesso em 16 ago. 2024.

DA FONSECA, A. C. C. *et al.* The Multiple Functions of the Co-Chaperone Stress Inducible Protein 1. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, [s. l.], v. 57, p. 73-84, 2021. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2020.06.003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32561134/>. Acesso em: 11 dez. 2022.

DE SOUZA, L. E. R.; MOURA COSTA, M. D.; BILEK, E. S. *et al.* STI1 antagonizes cytoskeleton collapse mediated by small GTPase Rnd1 and regulates neurite growth. **Experimental Cell Research**, [s. l.], v. 324, n.1, p. 84–91, 2014. DOI: 10.1016/j.yexcr.2014.03.017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014482714001335>. Acesso em: 13 dez. 2022.

DEL PULGAR, T. G.; BENITAH, S. A.; VALERÓN, P. F.; ESPINA, C.; LACAL, J. C. Rho GTPase expression in tumourigenesis: Evidence for a significant link. **BioEssays**, [s. l.], v. 27, n. 6, p. 602–613, 2005. DOI: 10.1002/bies.20238.

DI BLASI, R.; MARBIAH, M.M.; SICILIANO, V. *et al.* A call for caution in analysing mammalian co-transfection experiments and implications of resource competition in data misinterpretation. **Nature Communications**, [s. l.], v. 12, n. 2545, 2021. DOI: 10.1038/s41467-021-22795-9. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41467-021-22795-9>. Acesso em: 10 de ago. de 2024.

ERLICH, R. B. *et al.* STI1 promotes glioma proliferation through MAPK and PI3K pathways. **Glia**, [s. l.], v. 55, n. 16, p. 1690–1698, 2007. DOI: 10.1002/glia.20579. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/glia.20579>. Acesso em: 11 dez. 2022.

FAUSSNER, A.; DEININGER, M.M.; WEBER, C.; STEFFENS, S. Direct addition of poly-lysine or poly-ethylenimine to the medium: A simple alternative to plate pre-coating. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 17, n. 7, 2022. DOI: 10.1371/journal.pone.0260173. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0260173>. Acesso em: 12 ago. 2022.

FREI, T.; CELLA, F.; TEDESCHI, F. *et al.* Characterization and mitigation of gene expression burden in mammalian cells. **Nature Communications**, [s. l.], v. 11, n. 4641, 2020. DOI: 10.1038/s41467-020-18392-x. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41467-020-18392-x>. Acesso em: 10 ago. 2024.

GAO, J.; NAKAMURA, F. Actin-Associated Proteins and Small Molecules Targeting the Actin Cytoskeleton. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n.4, p. 2118, 2022. DOI: 10.3390/ijms23042118. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/4/2118>. Acesso em: 11 dez. 2022.

HAGA, R.B.; Ridley, A.J. Rho GTPases: Regulation and roles in cancer cell biology. **Small GTPases**, [s. l.], v. 4, p. 207-221, 2016. DOI: 10.1080/21541248.2016.1232583. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5129894/>. Acesso em 18 de agosto de 2024.

HALL, A. The cytoskeleton and cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, [s. l.], v. 28, n. 1-2, p. 5–14, 2009. DOI: 10.1007/s10555-008-9166-3. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10555-008-9166-3>. Acesso em: 13 de. 2022.

HAMBARDZUMYAN, D.; GUTMANN, D. H.; KETTENMANN, H. The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 20–27, 2016. DOI: 10.1038/nn.4185. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26713745/>. Acesso em: 11 dez. 2022.

HARADA, A.; KATOH, H.; NEGISHI, M. Direct Interaction of Rnd1 with FRS2 β Regulates Rnd1-induced Down-regulation of RhoA Activity and Is Involved in Fibroblast Growth Factor-induced Neurite Outgrowth in PC12 Cells. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 280, n. 18, p. 18418–18424, 2005. DOI: 10.1074/jbc.M411356200. Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(20\)65794-5/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(20)65794-5/fulltext). Acesso em: 13 dez. 2022.

HARLOW, E.; LANE, D. **Antibodies: A Laboratory Manual**. Estados Unidos da América: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988.

HEASMAN, S. J.; RIDLEY, A. J. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 9, n. 9, p. 690–701, 2008. DOI: 10.1038/nrm2476. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrm2476>. Acesso em: 13 dez. 2022.

HOHMANN, T.; DEGHANI, F. The Cytoskeleton — A Complex Interacting Meshwork. **Cells**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 362, 2019. DOI: 10.3390/cells8040362. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/8/4/362>. Acesso em: 11 dez. 2022.

HONORÉ B. *et al.* Molecular cloning and expression of a transformation-sensitive human protein containing the TPR motif and sharing identity to the stress-inducible yeast protein STI1. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 267, n. 12, p. 8485–8491, 1992. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)42471-4. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925818424714>. Acesso em: 12 dez. 2022.

JIANG, W.G.; WATKINS, G.; LANE, J.; CUNNICK, G.H.; DOUGLAS-JONES, A.; MOKBEL, K.; MANSEL, R.E. Prognostic value of Rho GTPases and Rho guanine nucleotide dissociation inhibitors in human breast cancers. **Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 9, n. 17, p. 6432–6440, 2003. PMID: 14695145. Disponível em: <https://aacrjournals.org/clincancerres/article/9/17/6432/202328/Prognostic-Value-of-Rho-GTPases-and-Rho-Guanine>. Acesso em: 25 ago. 2024.

KIM, T. K.; EBERWINE, J. H. Mammalian cell transfection: the present and the future. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 397, p. 3173–3178, 2010. DOI: 10.1007/s00216-010-3821-6. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-010-3821-6>. Acesso em: 15 ago. 2024.

KOMATSU, H.; IGUCHI, T.; MASUDA, T.; HIRATA, H.; UEDA, M.; KIDOGAMI, S.; OGAWA, Y.; SATO, K.; HU, Q.; NAMBARA, S.; *et al.* Attenuated RND1 Expression Confers Malignant Phenotype and Predicts Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma. **Annals of Surgical Oncology**, [s. l.], v. 24, p. 850–859, 2017. DOI: 10.1245/s10434-016-5573-9. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1245/s10434-016-5573-9>. Acesso em: 25 jul. 2024.

LACKIE, R. E. *et al.* The Hsp70/Hsp90 Chaperone Machinery in Neurodegenerative Diseases. **Frontiers in Neuroscience**, [s. l.], v. 11, n. 254, 2017. DOI: 10.3389/fnins.2017.00254. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2017.00254/full>. Acesso em: 25 mai. 2024.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970. DOI:10.1038/227680a0.

LEE, C. T. *et al.* Dynamics of the regulation of Hsp90 by the co-chaperone Sti1. **The EMBO Journal**, [s. l.], v. 31, n. 6, p. 1518–1528, 2012. DOI: 10.1038/emboj.2012.37. Disponível em: <https://www.embopress.org/doi/full/10.1038/emboj.2012.37>. Acesso em: 11 dez. 2022.

LESSEY, E. C.; GUILLUY, C.; BURRIDGE, K. From Mechanical Force to RhoA Activation. **Biochemistry**, [s. l.], v. 51, n. 38, p. 7420–7432, 2012. DOI: 10.1021/bi300758e. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi300758e>. Acesso em: 11 dez. 2022.

LIMA, F. R. S. *et al.* Cellular prion protein expression in astrocytes modulates neuronal survival and differentiation. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 103, n. 6, p. 2164–2176, 2007. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2007.04904.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1471-4159.2007.04904.x>. Acesso em: 12 dez. 2022.

LIU, J.; LI, S.; CHEN, S.; CHEN, S.; GENG, Q.; XU, D. c-Met-dependent phosphorylation of RhoA plays a key role in gastric cancer tumorigenesis. **The Journal of Pathology**, [s. l.], v. 249, n. 1, p. 126–136, 2019. DOI: 10.1002/path.5287. Disponível em: <https://pathsocjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/path.5287>. Acesso em: 10. ago 2024.

LONGSHAW, V. M.; DIRR, H. W.; BLATCH, G. L.; LÄSSLE, M. The in Vitro Phosphorylation of the Co-Chaperone mSTI1 by Cell Cycle Kinases Substantiates a Predicted Casein Kinase II-p34cdc2-NLS (CcN) Motif. **Biological Chemistry**, [s. l.], v. 381, n. 11, 2000. DOI: 10.1515/bc.2000.139. Disponível em: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/BC.2000.139/html>. Acesso em: 11 de. 2022

LONGSHAW, V. M. *et al.* Nuclear translocation of the Hsp70/Hsp90 organizing protein mSTI1 is regulated by cell cycle kinases. **Journal of Cell Science**, [s. l.], v. 117, n. 5, p. 701–710, 2004. DOI: 10.1242/jcs.00905. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14754904/>. Acesso em: 11 dez. 2022.

LUO, X. *et al.* STIP1 is over-expressed in hepatocellular carcinoma and promotes the growth and migration of cancer cells. **Gene**, [s. l.], v. 662, p. 110–117, 2018. DOI: 10.1016/j.gene.2018.03.076. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29596884/>. Acesso em: 11 dez. 2022.

MATEUS, A. R.; SERUCA, R.; MACHADO, J. C.; KELLER, G.; OLIVEIRA, M. J.; SURIANO, G.; LUBER, B. m **Human Molecular Genetics**, v. 16, n. 13, p. 1639–1647, 2007. DOI:10.1093/hmg/ddm113

MCCORMICK, L. E.; GUPTON, S. L. Mechanistic advances in axon pathfinding. **Current Opinion in Cell Biology**, [s. l.], v. 63, p. 11–19, 2020. DOI: 10.1016/j.ceb.2019.12.003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955067419301139>. Acesso em: 13 dez. 2022.

MORI, K.; AMANO, M.; TAKEFUJI, M. *et al.* Rho-kinase Contributes to Sustained RhoA Activation through Phosphorylation of p190A RhoGAP. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 284, n. 8, p. 5067–5076, 2009. DOI: 10.1074/jbc.m806853200. Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(20\)70966-X/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(20)70966-X/fulltext). Acesso em: 12 dez. 2022.

MOSTOWY, S.; COSSART, P. Septins: the fourth component of the cytoskeleton. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 183–194, 2012. DOI: 10.1038/nrm3284. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrm3284>. Acesso em: 11 dez. 2022.

MOULY, L.; GILHODES, J.; LEMARIÉ, A. *et al.* The RND1 Small GTPase: Main Functions and Emerging Role in Oncogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 20, n. 15, p. 3612, 2019. DOI: 10.3390/ijms20153612. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/15/3612>. Acesso em: 13 dez. 2022.

NARUMIYA, S.; TANJI, M.; ISHIZAKI, T. Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion. **Cancer and Metastasis Reviews**, [s. l.], v. 28, p. 65–76, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10555-008-9170-7>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10555-008-9170-7>. Acesso em: 12 dez. 2022.

NICOLET, C. M.; CRAIG, E. A. Isolation and characterization of STI1, a stress-inducible gene from *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, [s. l.], v. 9, n. 9, p. 3638–3646, 1989. DOI: <https://doi.org/10.1128/mcb.9.9.3638-3646.1989>. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mcb.9.9.3638-3646.1989>. Acesso em: 12 dez. 2022.

NISHIGAKI, M.; AOYAGI, K.; DANJOH, I.; FUKAYA, M.; YANAGIHARA, K.; SAKAMOTO, H.; YOSHIDA, T.; SASAKI, H. Discovery of aberrant expression of R-RAS by cancer-linked DNA hypomethylation in gastric cancer using microarrays. **Cancer Research**, [s. l.], v. 65, n. 6, p. 2115–2124, 2005. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3340. Disponível em: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/65/6/2115/519056/Discovery-of-Aberrant-Expression-of-R-RAS-by>. Acesso em 26 ago. 2024.

NOBES, C. D.; LAURITZEN, I.; MATTEI, M.-G. *et al.* A New Member of the Rho Family, Rnd1, Promotes Disassembly of Actin Filament Structures and Loss of Cell Adhesion. **The Journal of Cell Biology**, [s. l.], v. 141, n. 1, p. 187–197, 1998. DOI: 10.1083/jcb.141.1.187. Disponível em: <https://rupress.org/jcb/article/141/1/187/976/A-New-Member-of-the-Rho-Family-Rnd1-Promotes>. Acesso em: 11 dez. 2022.

NOBES, C.D.; HALL, A. Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. **Journal of Cell Biology**, [s. l.], v. 144, n. 6, p. 1235–1244, 1999. DOI: 10.1083/jcb.144.6.1235. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2150589/>. Acesso em: 14 abr. 2024.

OINUMA, I.; KATOH, H.; HARADA, A. *et al.* Direct Interaction of Rnd1 with Plexin-B1 Regulates PDZ-RhoGEF-mediated Rho Activation by Plexin-B1 and Induces Cell Contraction in COS-7 Cells. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 278, n. 28, p. 25671–25677, 2003. DOI: 10.1074/jbc.m303047200. Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)75084-4/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)75084-4/fulltext). Acesso em: 13 dez. 2022.

OINUMA, I.; KAWADA, K.; TSUKAGOSHI, K. *et al.* Rnd1 and Rnd3 targeting to lipid raft is required for p190 RhoGAP activation. **Molecular Biology of the Cell**, [s. l.], v. 23, n. 8, p. 1593–1604, 2012. DOI: 10.1091/mbc.e11-11-0900. Disponível em: <https://www.molbiolcell.org/doi/full/10.1091/mbc.e11-11-0900>. Acesso em: 13 dez. 2022.

OKADA, T.; SINHA, S.; ESPOSITO, I. *et al.* The Rho GTPase Rnd1 suppresses mammary tumorigenesis and EMT by restraining Ras-MAPK signalling. **Nature Cell Biology**, [s. l.], v. 17, p. 81–94, 2015. DOI: 10.1038/ncb3082. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ncb3082>. Acesso em: 1 ago. 2024.

PAAVILAINEN, V. O.; BERTLING, E.; FALCK, S.; LAPPALAINEN, P. Regulation of cytoskeletal dynamics by actin-monomer-binding proteins. **Trends in Cell Biology**, [s. l.], v. 14, n. 7, p. 386–394, 2004. DOI: 10.1016/j.tcb.2004.05.002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0962892404001345>. Acesso em: 12 dez. 2022.

PANTALONI, D. Mechanism of Actin-Based Motility. **Science**, [s. l.], v. 292, n. 5521, p. 1502–1506, 2001. DOI: 10.1126/science.1059975. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1059975>. Acesso em: 12 dez. 2022.

PELLEGRIN, S.; MELLOR, H. Actin stress fibres. **Journal of Cell Science**, [s. l.], v. 120, n. 20, p. 3491–3499, 2007. DOI: 10.1242/jcs.018473. Disponível em: <https://journals.biologists.com/jcs/article/120/20/3491/29930/Actin-stress-fibres>. Acesso em: 13 dez. 2022.

PELLEGRIN, S.; MELLOR, H. Rho GTPase Activation Assays. **Current Protocols in Cell Biology**, [s. l.], v. , n. , p. , 2008. DOI: 10.1002/0471143030.cb1408s38. Disponível em: <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/0471143030.cb1408s38>. Acesso em: 15 fev. 2023.

PHUYAL, S.; FARHAN, H. Multifaceted Rho GTPase Signaling at the Endomembranes. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 7, 2019. DOI: 10.3389/fcell.2019.00127. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2019.00127/full>. Acesso em: 13 dez. 2022.

POLLARD, T. D.; BLANCHON, L.; MULLINS, R. D. Molecular Mechanisms Controlling Actin Filament Dynamics in Nonmuscle Cells. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 545–576, 2000. DOI: 10.1146/annurev.biophys.29.1.545. Disponível em: http://cytomorpholab.com/wp-content/uploads/2021/11/publication_1-23.pdf. Acesso em: 13 dez. 2022.

POLLARD, T. D. Actin and Actin-Binding Proteins. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, [s. l.], v. 8, n. 8, 2016. DOI: 10.1101/cshperspect.a018226. Disponível em: <https://cshperspectives.cshlp.org/content/8/8/a018226.full>. Acesso em: 11 dez. 2022.

QIN, C.-D.; MA, D.-N.; ZHANG, S.-Z.; ZHANG, N.; REN, Z.-G.; ZHU, X.-D.; JIA, Q.-A.; CHAI, Z.-T.; WANG, C.-H.; SUN, H.-C. *et al.* The Rho GTPase Rnd1 inhibits epithelial–mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma and is a favorable anti-metastasis target. **Cell Death & Disease**, [s. l.], v. 9, n. 486, 2018. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41419-018-0517-x>. Acesso em: 20 jul. 2024.

REN, X.D.; KIOSSES, W.B.; SCHWARTZ, M.A. Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. **EMBO Journal**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 578–585, 1999. DOI: 10.1093/emboj/18.3.578. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1171150/pdf/000578.pdf>. Acesso em: 22 mar. 2023.

RIOU, P.; VILLALONGA, P.; RIDLEY, A. J. Rnd proteins: Multifunctional regulators of the cytoskeleton and cell cycle progression. **BioEssays**, [s. l.], v. 32, n. 11, p. 986–992, 2010. DOI: 10.1002/bies.201000060. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/bies.201000060>. Acesso em: 13 dez. 2022.

SAHAI, E.; ALBERTS, A.S.; TREISMAN, R. RhoA effector mutants reveal distinct effector pathways for cytoskeletal reorganization, SRF activation and transformation. **EMBO Journal**, [s. l.], v. 17, n. 5, p. 1350–1361, 1998. DOI: 10.1093/emboj/17.5.1350. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1170483/pdf/001350.pdf>. Acesso em: 4 ago. 2024.

SCOTT, M.; GUNDERSON, C. W.; MATEESCU, E. M.; ZHANG, Z.; HWA, T. Interdependence of cell growth and gene expression: origins and consequences. **Science**, [s. l.], v. 330, p. 1099–1102, 2010. DOI: 10.1038/s41467-021-22795-9. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1192588>. Acesso em: 11 ago. 2024.

TANG, D. D.; GERLACH, B. D. The roles and regulation of the actin cytoskeleton, intermediate filaments and microtubules in smooth muscle cell migration. **Respiratory Research**, [s. l.], v. 18, n. 54, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12931-017-0544-7>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/s12931-017-0544-7>. Acesso em: 11 dez. 2022.

THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. **Nature**, [s. l.], v. 513, p. 202–209, 2014. DOI: 10.1038/nature13480. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature13480>. Acesso em: 2 de ago. 2024.

TONG, J.; LI, L.; BALLERMANN, B.; WANG, Z. Phosphorylation and Activation of RhoA by ERK in Response to Epidermal Growth Factor Stimulation. **PLOS ONE**, v. 11, n. 1, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0147103. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0147103>. Acesso em: 25 ago. 2024.

TSAL, C.-L. *et al.* Secreted Stress-Induced Phosphoprotein 1 Activates the ALK2-SMAD Signaling Pathways and Promotes Cell Proliferation of Ovarian Cancer Cells. **Cell Reports**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 283–293, 2012. DOI: 10.1016/j.celrep.2012.07.002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22884369/>. Acesso em: 12 dez. 2022.

VANCHA, A.R.; GOVINDARAJU, S.; PARSA, K.V. *et al.* Use of polyethyleneimine polymer in cell culture as attachment factor and lipofection enhancer. **BMC Biotechnology**, [s. l.], v. 4, n. 23, 2004. DOI: 10.1186/1472-6750-4-23. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/1472-6750-4-23>. Acesso em: 12 ago. 2024

VITOR, M. T.; SART, S.; BARIZIEN, A.; TORRE, L. G.; BAROUD, C. N. Tracking the evolution of transiently transfected individual cells in a microfluidic platform. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, n. 1225, 2018. DOI: 10.1038/s41467-021-22795-9. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-19483-y>. Acesso em: 20 ago. 2024.

WANG, K. *et al.* GOLPH3 Promotes Cancer Growth by Interacting With STIP1 and Regulating Telomerase Activity in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. **Frontiers in**

Oncology, [s. l.], v. 10, 2020. DOI: 10.3389/fonc.2020.575358. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2020.575358/full>. Acesso em: 12 dez. 2022.

WANG, K. Whole-genome sequencing and comprehensive molecular profiling identify new driver mutations in gastric cancer. **Nature Genetics**, [s.l.], v. 46, n. 6, p. 573-582, 2014. DOI: 10.1038/ng.2983. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ng.2983>. Acesso em: 8 de ago. de 2024.

WENNERBERG, K.; FORGET, M.-A.; ELLERBROEK, S. M. *et al.* Rnd Proteins Function as RhoA Antagonists by Activating p190 RhoGAP. **Current Biology**, [s. l.], v. 13, n.13, p. 1106–1115, 2003. DOI: 10.1016/s0960-9822(03)00418-4. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982203004184>. Acesso em: 13 dez. 2022.

WILLMER, T.; CONTU, L.; BLATCH, G. L. *et al.* Knockdown of Hop downregulates RhoC expression, and decreases pseudopodia formation and migration in cancer cell lines. **Cancer Letters**, [s. l.], v. 328, n. 2, p. 252–260, 2013. DOI: 10.1016/j.canlet.2012.09.021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304383512005794>. Acesso em: 13 dez. 2022.

XIANG, G.; YI, Y.; WEIWEI, H.; WEIMING, W. RND1 is up-regulated in esophageal squamous cell carcinoma and promotes the growth and migration of cancer cells. **Tumour Biology**, v. 37, p. 773–779, 2016.

YIN, H. *et al.* Down-regulation of STIP1 regulate apoptosis and invasion of glioma cells via TRAP1/AKT signaling pathway. **Cancer Genetics**, [s. l.], v. 237, p. 1–9, 2019. DOI: 10.1016/j.cancergen.2019.05.006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31447061/>. Acesso em: 11 dez. 2022.

YUKAWA, K.; TANAKA, T.; YOSHIDA, K. *et al.* Sema4A induces cell morphological changes through B-type plexin-mediated signaling. **International Journal of Molecular Medicine**, [s. l.], v. 25, n. 2, 2010. DOI: 10.3892/ijmm_00000334. Disponível em: https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm_00000334/download. Acesso em: 13 dez. 2022.

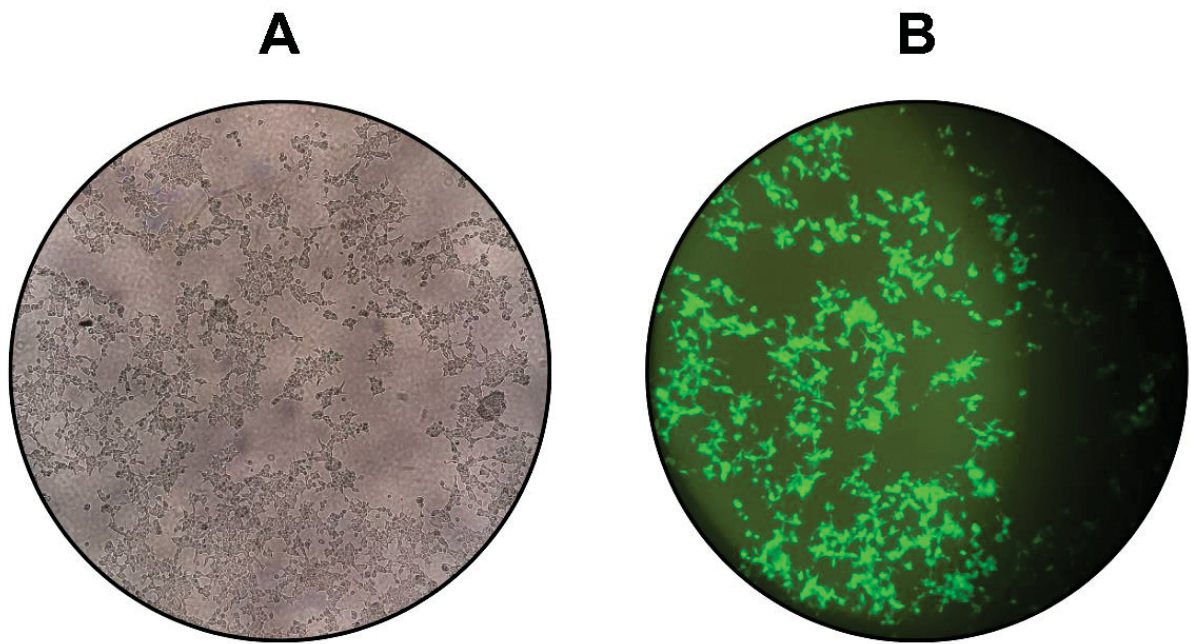
ZANATA, S. M. *et al.* Antagonistic Effects of Rnd1 and RhoD GTPases Regulate Receptor Activity in Semaphorin 3A-Induced Cytoskeletal Collapse. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 2, p. 471–477, 2002a. DOI:10.1523/jneurosci.22-02-00471.2002. Disponível em: <https://www.jneurosci.org/content/jneuro/22/2/471.full.pdf>. Acesso em: 12 dez. 2022.

ZANATA, S. M. *et al.* Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. **The EMBO Journal**, [s. l.], v. 21, n. 13, p. 3307–3316, 2002b. DOI: 10.1093/emboj/cdf325. Disponível em: <https://www.embopress.org/doi/full/10.1093/emboj/cdf325>. Acesso em: 11 dez. 2022.

ZHAI, E. *et al.* HSP70/HSP90-Organizing Protein Contributes to Gastric Cancer Progression in an Autocrine Fashion and Predicts Poor Survival in Gastric Cancer. **Cellular Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 47, n. 2, p. 879–892, 2018. DOI: 10.1159/000490080. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29843139/>. Acesso em: 11 dez. 2022.

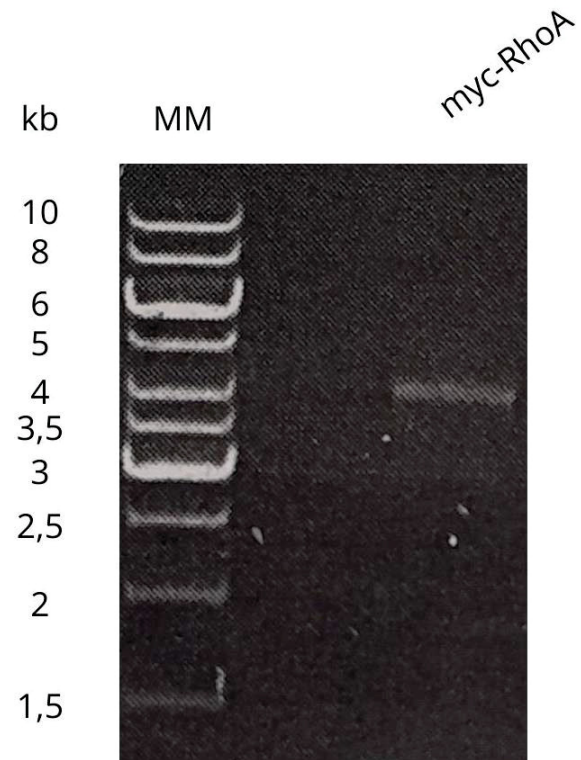
ZHANG, H. *et al.* Gain-of-Function *RHOA* Mutations Promote Focal Adhesion Kinase Activation and Dependency in Diffuse Gastric Cancer. **Cancer Discovery**, [s.l.], v. 10, n. 2, p. 288-305, 2020. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-19-0811. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7007383/>. Acesso em: 30 jul. 2024.

ZHANG, Z. *et al.* Aberrant expression of stress-induced phosphoprotein 1 in colorectal cancer and its clinicopathologic significance. **Human Pathology**, [s. l.], v. 79, p. 135–143, 2018. DOI: 10.1016/j.humpath.2018.05.016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29879402/>. Acesso em: 12 dez. 2022.

ANEXO 1 - AVALIAÇÃO VISUAL DA EFICIÊNCIA DE TRANSFEÇÃO

LEGENDA: Fotografias de microscopia ótica (A) e de fluorescência (B) de células HEK-293T transfectadas com EGFP-mRhoA.

**ANEXO 2 – DIGESTÃO ENZIMÁTICA PARA AVALIAÇÃO DA
INTEGRIDADE DO PLASMÍDIO pBK-CMV-c-Myc-RhoA**



LEGENDA: Eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) para análise do plasmídio pBK-CMV-c-Myc-RhoA após clivagem enzimática com XbaI. É possível observar apenas uma banda de massa molecular próxima a 4-4,5 kb.