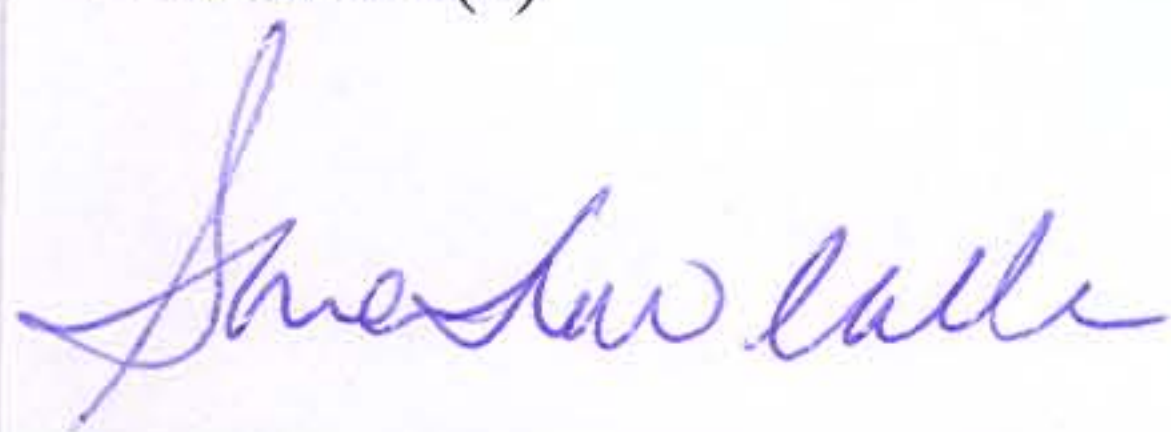


CAROLINA LOUZÃO BIGARELLA

Este exemplar corresponde à versão final da **Tese de Doutorado** apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia Médica na área de concentração Medicina Experimental do(a) aluno(a) **Carolina Louzão Bigarella**.

Campinas, 19 de fevereiro de 2009.

Prof(a). Dr(a). Sara Teresinha Olalla Saad
Orientador(a)



ANÁLISE DA EXPRESSÃO E DA FUNÇÃO DE ARHGAP21 EM SISTEMA NERVOSO NORMAL E NEOPLÁSICO



**CAMPINAS
2009**

CAROLINA LOUZÃO BIGARELLA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO E DA FUNÇÃO
DE ARHGAP21 EM SISTEMA NERVOSO
NORMAL E NEOPLÁSICO**

Tese de doutorado apresentada à Pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de doutor em Fisiopatologia Médica, Área de Concentração Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do desenvolvimento.

Orientadora: Sara Teresinha Olalla Saad

**CAMPINAS
2009**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Bigarella, Carolina Louzão

B48a Análise da expressão e da função de ARHGAP21 em sistema nervoso normal e neoplásico / Carolina Louzão Bigarella. Campinas, SP : [s.n.], 2009.

Orientador : Sara Teresinha Olalla Saad

Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Sistema neural. 2. Glioblastoma. 3. Migração celular. I. Saad, Sara Teresinha Olalla. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : "The Expression and function of ARHGAP21 in the normal nervous system and with neoplasia"

Keywords: • Nervous system
• Glioblastoma
• Cell movement

Titulação: Doutor em Fisiopatologia Médica

Área de concentração: Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do desenvolvimento

Banca examinadora:

Profa. Dra. Sara Teresinha Olalla Saad

Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar

Prof. Dr. Roger Chammas

Prof. Dr. José Barreto Carvalheira

Prof. Dr. Hernandes Faustino Carvalho

Data da defesa: 19-02-2009

Banca examinadora da tese de Doutorado

Carolina Louzão Bigarella

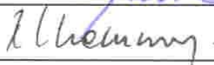
Orientador: Prof. Dr. Sara Teresinha Olalla Saad

Membros:

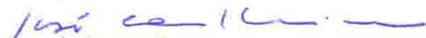
1. Prof. Dr. Mari Cleide Sogayar



2. Prof. Dr. Roger Chammas



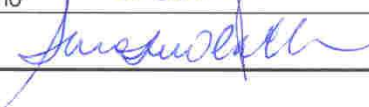
3. Prof. Dr. José Barreto Campello Carvalheira



4. Prof. Dr. Hernandes Faustino De Carvalho



5. Prof. Dr. Sara Teresinha Olalla Saad



Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 19/02/2009

➤ DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos meus queridos pais, Roberto e Maria Laura que sempre me ensinaram a dar valor aos estudos e a ter perseverança em tempos difíceis, e ao meu querido Fernando pelo apoio e amor incondicionais.

➤ AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à Prof. Sara Saad, a pequena-grande Sarita, pela oportunidade de desenvolver este trabalho em seu laboratório, pela confiança depositada em mim todos estes anos e pelo exemplo profissional e pessoal.

À FAPESP pela bolsa concedida e ao CNPq pelos auxílios financeiros ao laboratório.

Ao Prof. Dr. Vivaldo Moura Neto pela disponibilização de seu laboratório.

À Dra. Sylvia Stuchi Maria-Engler pelo auxílio inicial nesse projeto.

Ao Prof. Dr. Mário Saad e ao técnico de seu laboratório, Sr. Luiz, pela disponibilidade de seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Jörg Kobarg pelas discussões científicas e disponibilização de alguns reagentes.

À Prof. Dra. Wirla Tamashiro pelo exemplo científico e pela disponibilização das dependências do biotério do Departamento de Imunologia – IB – UNICAMP.

Ao Prof. Dr. José Vassalo e ao técnico de seu laboratório Dr. Paulo Latuffi-Filho pelos auxílios com as imunohistoquímicas.

À Prof. Dra. Íscia Lopes-Cendes e sua aluna de doutorado Patrícia Ribeiro pelos auxílios e discussões sobre os trabalhos com animais.

Ao Prof. Dr. José Camillo e seu aluno Daniel Martins pelos auxílios com MALDI-TOF.

À Dra. Suely Marie, da Faculdade de Medicina da USP, por disponibilizar amostras de seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Hugo Armelin, meu primeiro orientador e exemplo profissional, por trilhar meus primeiros passos no caminho científico.

Aos amigos do laboratório de Biologia Molecular, Patrícia Rodriguez, Mariana Lazarini, João, Fabíola, Karin, Letícia, Daniella, Cláudia, Adriana, David, Pedro, Tiago, Raquel Foglio, Patrícia Juliani e Simone Sene pelos momentos alegres compartilhados.

Às queridas Tereza Salles, Luciene, Mariana Pupa e Xará pela amizade, pelas histórias na hora do café, pelos auxílios no laboratório, pelas muitas risadas que demos, pelos tantos bolos compartilhados e pelos exemplos pessoais que representaram para mim durante todos estes anos de convivência.

Ao meu irmão querido, Alexandre com quem sempre dividi as dificuldades da vida e que mesmo sem entender o que faço sempre torceu por mim.

Às amigas da USP, Kátia, Telma, Paula e Miriam pela amizade e apoio durante estes anos.

À querida Helen, por sempre acreditar em mim mesmo à distância.

A todos os meus familiares que sempre respeitaram e apoiaram minhas decisões em especial à minha Tia Lúcia.

Aos meus sogros, Gilberto e Mercedez, e cunhados, Ana Paula e Renato, pelo interesse em minhas atividades e por sempre torcerem por mim.

➤SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	vi
AGRADECIMENTOS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xxiii
RESUMO	xxiv
ABSTRACT	xxv
1. INTRODUÇÃO.....	xxvi
1.1. A família de proteínas RhoGTPases e seu papel em sistema nervoso	27
1.2. A nova RhoGAP “ARHGAP21”	29
1.3. Os tumores humanos da glia	31
1.4. A quinase de adesão focal (Focal Adhesion Kinase, FAK)	32
2. OBJETIVO.....	36
3. MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1. Nomenclatura.....	39
3.2. Reagentes e Anticorpos	39
3.3. Linhagens Celulares	39
3.4. Amostras de RNA de astrocitomas – Faculdade de Medicina – USP	40
3.5. Cultivo das linhagens A172 e T98G em gel de Colágeno tipo I e em Extrato de Membrana Basal (Matrigel™ – BD).....	40
3.6. Preparação de RNA e proteínas de A172 e T98G cultivadas nos substratos	41
3.7. Northern Blotting	41
3.8. PCR em tempo real (RT-PCR).....	42
3.9. Extração de proteínas, imunoprecipitação de complexos protéicos e Western blotting	43
3.10. Imunofluorescência e Microscopia Confocal	44
3.11. Imunohistoquímica para ARHGAP21	45
3.12. Análise computacional de ARHGAP21	46
3.13. Espectrometria de Massas.....	47

3.14. Transfecção transitória de DNA plasmidial	47
3.15. Transfecção estável de plasmídeos contendo oligos de shRNAi.....	48
3.16. Extração de proteínas de diferentes frações sub-celulares.....	49
3.17. Ensaio de Pulldown.....	50
3.18. Ensaio de atividade de RhoGTPases.....	50
3.19. Zimografia	51
3.20. Ensaio de Migração.....	51
3.21. Preparação de culturas primárias de astrócitos e neurônios.....	52
3.22. Diferenciação neural de células tronco embrionárias de camundongo normais e que não expressam o gene ARHGAP21	53
4. RESULTADOS	55
4.1. Padronização da utilização do anticorpo anti-ARHGAP21	56
4.2. Cultivo de A172 e T98G em diferentes substratos de matriz extracelular e análise da expressão gênica e protéica de ARHGAP21	61
4.3. As bandas protéicas de pesos moleculares 160, 200 e 250 KDa são isoformas de ARHGAP21.....	66
4.4. ARHGAP21 sofre sumoilação	69
4.5. Verificação do envolvimento de ARHGAP21 na via de integrinas	70
4.6. Inibição da expressão de ARHGAP21 por shRNAi	77
4.7. Investigação sobre os efeitos da depleção de ARHGAP21	81
4.7.1- Depleção de ARHGAP21 aumenta a atividade das RhoGTPases Cdc42 e RhoA e altera a distribuição intracelular de Cdc42	84
4.7.2- A depleção de ARHGAP21 aumenta a secreção de metaloprotease 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9) e a capacidade de migração das células	87
4.8. Avaliação da expressão do gene e proteína ARHGAP21 em astrocitomas.....	91
4.9 Avaliação da expressão de ARHGAP21 em tecido cerebral normal.....	97
4.10. Avaliação da expressão de ARHGAP21 ao longo do desenvolvimento embrionário de camundongos.....	99
4.11. Avaliação do envolvimento de ARHGAP21 na diferenciação neural de células tronco embrionárias de camundongo.....	104
4.12. Produção de um animal nocaute para o gene ARHGAP21.....	106

5. DISCUSSÃO	108
6. CONCLUSÕES.....	117
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	120
8. ANEXOS.....	129
8.1 ANEXO 1 – Parecer do Comitê de Ética na Experimentação Animal	130
8.2 ANEXO 2 – Artigos publicado e aceito para publicação	131

➤LISTA DE ABREVIATURAS

CAS: Crk-associated substrat

ECM: extracellular matrix

ERK: extracellular signal regulated kinase

EST: Expression Sequence Tags

FAK: focal adhesion kinase

FAT: focal adhesion targeting

FERM: protein 4.1, ezrin, radixin and moesin homology

GST: Glutathione S-transferase

IB: immunoblot

IF: imunofluorescência

IP: imunoprecipitação

MAPK: mitogen-activated protein kinase

PDZ: PSD-95/Discs-large/ZO-1

PH: pleckstrin homology

RhoGAP: Rho GTPase activating protein

RNA: Ribonucleic acid

SH: Src-homology

shRNA: short-hairpin RNA

SUMO: Small Ubiquitin-like Modifiers

TRITC: Tetramethyl Rhodamine Isothiocyanate

WT: wildtype

➤LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclagem de ativação-desativação das proteínas da família das RhoGTPases. Sinais internos ou externos resultam na dissociação de RhoGTPases-GDP de RhoGDIs (1). RhoGTPases associadas à GDP aproximam-se de regiões sub-membranares (2) onde novos sinais internos ou externos poderão levar à ação de uma RhoGEF (3), resultando na ativação da molécula (ligação à GTP). Finalmente, RhoGTPases ativas (ligadas a GTP) podem ser inativadas pela ação de proteínas RhoGAPs (4). Esquema adaptado de Tcherkezian & Lamarche-Vane (2007)..... 28

Figura 2: Representação esquemática da localização do gene *ARHGAP21* no cromossomo 10, banda 10p12.1, e do produto codificado de 7107 pb, que é constituído por 26 éxons. 29

Figura 3: Esquema da estrutura primária da proteína ARHGAP21 e seus domínios. Esta proteína apresenta 1957 aminoácidos e os domínios PDZ, PH e RhoGAP estão distribuídos localizados entre os aminoácidos 44-155, 931-1039 e 1161-1314, respectivamente..... 30

Figura 4: Esquema da estrutura primária da proteína FAK. Estão evidenciados o domínio FERM na região N-terminal, um domínio quinase central, o domínio FAT na região C-terminal e as três regiões ricas em prolinas (Pro). FAK apresenta vários resíduos de tirosina (Y) que quando fosforilados resultam em ativação da molécula. 33

Figura 5: Esquema da via de ativação de FAK que resulta em migração celular. A fosforilação de FAK por Src ocorre quando as subunidades de integrinas α e β se dimerizam devido à sinalização da matriz extracelular (ECM) e Src, por sua vez, também é fosforilada por FAK. A proteína p130^{CAS} se associa à FAK ativa e é fosforilada por Src. Finalmente, p130^{CAS} ativa proteínas da família RhoGTPase resultando em modificações do citoesqueleto

de actina e do complexo de adesão focal, levando à migração e alongação celular..... 34

Figura 6: Western Blot de diversas linhagens humanas. Após fracionamento de amostras protéicas em gel de poliacrilamida 8%, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Hybond) e seguiu-se a incubação com um anticorpo anti-ARHGAP21 (Bethyl), em seguida com um anticorpo secundário anti-coelho e utilizou-se ECL (Amershan) para revelar o western. A172 e T98G = linhagens de gliomas humanos; FHN = Fibroblasto Humano Normal; HL-60 = linhagem derivada de leucemia mielóide aguda; Jurkat e Molt-4 = linhagens derivadas de leucemia linfóide aguda; PC3 = linhagem de adenocarcinoma prostático; K562 = linhagem derivada de leucemia mielóide crônica. Seta preta = peso predito de ARHGAP21; setas cinza = bandas reconhecidas pelo anticorpo policlonal anti-ARHGAP21 que são possíveis isoformas de ARHGAP21..... 56

Figura 7: Anticorpo anti-ARHGAP21 é capaz de reconhecer a proteína nativa por imunofluorescência no núcleo das células. Imunofluorescência de células FHN, HeLa, A172 e T98G, evidenciando a presença de ARHGAP21 na região nuclear e peri-nuclear (verde). Faloidina-TRITC (vermelha) foi utilizada para marcar a actina filamentar (F-actina). As lâminas foram analisadas por escaneamento a laser em um LSM-510 (Zeiss) montado sobre um microscópio Axioplan (Zeiss), utilizando a objetiva de 40X (FHN, A172 e T98G) ou 63X de imersão em óleo (HeLa)..... 58

Figura 8: Posição da Seqüência de Localização Nuclear (NLS) da proteína ARHGAP21 humana (NM 020824). A seqüência de aminoácidos de ARHGAP21 foi analisada por uma ferramenta criada na Universidade de Columbia e disponível no sítio <http://cubic.bioc.columbia.edu/db/NLSdb/>. 60

Figura 9: Fracionamento de células HeLa, T98G e A172 e western blotting corroborando a localização nuclear de ARHGAP21. A eficiência do

fracionamento foi verificada pela presença do receptor de transferrina (Tr) nas frações citoplasmática e membranar e de Histona H1 na fração nuclear. 61

Figura 10: Morfologia das linhagens A172 (A) e T98G (B) cultivadas em diferentes substratos por 3 dias ou 7 dias. A172 são células altamente polarizadas e apresentam alteração do padrão de espalhamento na superfície dificultado quando cultivada em EMB (setas). Enquanto T98G, de morfologia epitelíóide, apresenta-se bem distribuída em todas as condições e forma pequenos pontos em que parece estar penetrando no substrato (setas), condizendo com sua já relatada capacidade invasiva em membrana basal. As imagens foram adquiridas com objetiva de 20X em microscópio de campo claro Nikon. EMB = extrato de membrana basal Matrigel™ (BD – Bioscience)..... 62

Figura 11: Avaliação da expressão do gene ARHGAP21 em relação ao controle endógeno β -actina por reação de PCR em tempo real em amostras das linhagens de gliomas humanos A172 e T98G (ATCC) cultivadas em diferentes substratos. As células foram cultivadas por 3 dias ou 7 dias, os RNAs foram extraídos com o reagente Trizol® (Invitrogen), quantificados e 1 μ g foi transcrito reversamente. Legenda: P = plástico, C = gel de colágeno tipo I e M = extrato de membrana basal Matrigel™. 63

Figura 12: Expressão protéica de ARHGAP21 analisada por Western Blotting de amostras das linhagens de gliomas humanos A172 e T98G (ATCC) cultivadas em diferentes substratos. As células foram cultivadas por 3 dias ou 7 dias, os extratos protéicos foram preparados como descrito em Material e Métodos, quantificados e 100 μ g de cada amostra foram fracionadas em gel SDS-PAGE 8%. Após o fracionamento as amostras foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Hybond) e seguiu-se a incubação com um anticorpo primário anti-ARHGAP21 (Bethyl), em seguida com um anticorpo secundário anti-coelho e utilizou-se ECL (GE) para revelar o western. Legenda: P = plástico, C = gel de colágeno tipo I e M = extrato de membrana basal

Matrigel™ (BD Bioscience). Setas vermelhas = possível isoforma de ARHGAP21. A = extratos de células A172; B = extratos de células T98G. 64

Figura 13: ARHGAP21 continua sendo expressa no núcleo de células A172 e T98G cultivadas sobre EMB Matrigel™ (BD - Bioscience). Imunofluorescência de células cultivadas por 7 dias sobre lamínulas recobertas com 30 µL de 5 mg/mL EMB. As lâminas foram analisadas por escaneamento a laser em um LSM-510 (Zeiss) montado sobre um microscópio Axioplan (Zeiss), utilizando a objetiva de 40X de imersão em óleo. 65

Figura 14: Identificação de proteínas contidas nas bandas de peso molecular 160, 200 e 250 KDa por espectrometria de massas. A, Os gráficos representam MALDI-MS *fingerprintings* dos peptídeos resultantes da digestão trípica das proteínas contidas no gel. Os picos circundados representam massas de peptídeos que pertencem a ARHGAP21. 67

Figura 15: Predição de sítios de sumoilação na proteína ARHGAP21. A sequência de aminoácidos de ARHGAP21 foi submetida à ferramenta de predição SUMOsp disponível no sítio (<http://bioinformatics.lcd-ustc.org/sumosp/>) (Xue et al., 2006 e Ren et al., submetido)..... 69

Figura 16: ARHGAP21 sofre modificação por SUMO-2/-3. Co-imunoprecipitação da proteína ARHGAP21 com SUMO-2/-3. Extratos celulares de T98G coletados em condições denaturantes foram imunoprecipitados com IgG normal de coelho (controle) e anticorpos anti-SUMO-1 e anti-SUMO-2/-3. Os extratos foram fracionados em gel de poliacrilamida 8%, transferidos para membrana e esta foi incubada com anticorpo anti-ARHGAP21. Uma banda de ARHGAP21 de peso molecular aproximado 200 kDa co-imunoprecipitou especificamente com anti-SUMO-2/-3. IgG = imunoglobulina normal de coelho; IP = imunoprecipitação; IB = imunoblot; M = padrão de peso molecular. 70

Figura 17: Detecção da quinase de adesão focal (FAK) nas linhagens A172 e T98G cultivadas em diferentes substratos. As células foram cultivadas por 3 dias ou 7 dias, os extratos protéicos foram preparados, quantificados e 100 µg

de cada amostra foram fracionadas em gel SDS-PAGE 8%. Após o fracionamento as amostras foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Hybond) e seguiu-se a incubação com um anticorpo anti-FAK, em seguida com um anticorpo secundário anti-coelho e utilizou-se ECL (Amershan) para revelar o western. Legenda: P = plástico, C = gel de colágeno tipo I e M = extrato de membrana basal MatrigelTM (BD - Biosciences). 71

Figura 18: ARHGAP21 interage com a quinase de adesão focal (FAK) nas linhagens de glioblastoma U138MG e T98G. Extratos de células coletados em tampão de NP-40 foram imunoprecipitados com anticorpos anti-ARHGAP21, anti-FAK ou com IgG normal de coelho (controle negativo). As proteínas co-imunoprecipitadas foram analisadas por *western blotting* com os anticorpos indicados na figura. IP = imunoprecipitação, IgG = imunoglobulina normal de coelho, IB = *immunoblot*. 72

Figura 19: Imunofluorescência de células T98G utilizando anticorpos anti-ARHGAP21 (reconhecido pelo secundário AlexaFluor488, verde) e anti-FAK (reconhecido pelo secundário anti-camundongo AlexaFluor555, vermelho), mostrando que a interação entre ARHGAP21 e FAK ocorre na região perinuclear. O quarto quadro mostra em branco a região máxima de co-localização entre as proteínas obtida pelo programa *Colocalization Finder* do ImageJ (NIH). Imagens de confocal foram capturadas em Microscópio Zeis LSM510, utilizando a objetiva de imersão em água, aumento de 40x. Rr = coef. de correlação de Pearson; R = coef. de sobreposição. 73

Figura 20: ARHGAP21 interage especificamente com a porção C-terminal de FAK. A, Esquema da estrutura dos domínios da proteína FAK, mostrando as porções clonadas em vetor de expressão em bactérias, pGEX. B, Gel de poli-acrilamida 8% corado com Coomassie, evidenciando a produção eficiente dos domínios Ferm, Cat e C-term de FAK fusionados à GST (colunas “P”, altura da seta preta). C, ensaio de pulldown utilizando as construções de FAK para co-precipitar ARHGAP21 em extratos de células T98G, evidenciando a interação

específica com a porção C-terminal. Legenda: S = extrato bacteriano sonificado, P = extrato bacteriano sonificado e purificado com Glutathione Sepharose® (GE)..... 75

Figura 21: As porções N e C-terminais de ARHGAP21 interagem com FAK. A, Distribuição dos domínios PDZ, PH e RhoGAP na sequência de ARHGAP21 e respectivas porções N e C-terminais que foram expressas em células T98G. B, Imunoprecipitação com anticorpo anti-V5 de extratos protéicos de dois clones transfectados com fragmentos amino e carboxi terminais conforme indicado em A. IP = imunoprecipitação, IB: *imunoblot*. 77

Figura 22: Inibição da Expressão de ARHGAP21. A, análise por PCR em tempo real da inibição do gene *ARHGAP21*. Vários clones obtidos da transfecção com as duas sequências inibitórias (sh1 e sh2) e grau de inibição maior ou igual a 50% são mostrados. B, Análise da redução da expressão protéica de ARHGAP21 em dois clones obtidos da transfecção usando cada uma das sequências inibitórias. A normalização da quantidade de proteína aplicada de cada amostra foi feita pela análise da expressão da proteína β -actina, e a confirmação da inibição específica de ARHGAP21 pôde ser evidenciada pela não depleção de uma proteína associada a ela, α -catenina. 79

Figura 23: Inibição da Expressão de ARHGAP21 resulta em alterações morfológicas e rearranjo do citoesqueleto de actina. A, Micrografias de células T98G NC (controle) e T98G nas quais ARHGAP21 fora inibida (KD), evidenciando as alterações morfológicas de células com padrão epitelíóide para fibroblastóide (aumento 20x). B e C, Imagens de microscopia confocal mostrando o citoesqueleto de actina marcado com faloidina-TRITC (Sigma) evidenciando diferente padrão de organização entre células T98G NC e T98G KD. 80

Figura 24: Depleção de ARHGAP21 aumenta os estados de fosforilação de FAK e Src e do efetor à jusante p130^{CAS}. A, *Imunoblot* de T98G NC e quatro clones selecionados nos quais ARHGAP21 fora depletada, utilizando os anticorpos anti-P-FAK Y397, anti-P-FAK Y925 e anti-P-Src Y418,

demonstrando o aumento da fosforilação de sítios de tirosina. B, Imunoprecipitação de p130^{CAS} e incubação da membrana com anticorpo anti-tirosina fosforilada (P-Tyr). A quantificação do conteúdo de p130CAS fosforilada em tirosina foi normalizada em relação ao total de p130CAS precipitada (IB: p130CAS) e mostrou aumento da fosforilação desta proteína quando ARHGAP21 foi depletada. IP= imunoprecipitação, IgG= imunoglobulina, IB= imunoblot, NC = T98G controle, u.a.= unidades arbitrárias.... 82

Figura 25: Aumento da quantidade de FAK fosforilada em tirosina 925 e translocação nuclear nas células T98G depletadas de ARHGAP21 (KD). Micrografias de imunofluorescência mostrando grupos de células ou células individualizadas foram capturadas em microscópio confocal LSM510 (Zeiss). Mostra-se o aumento da quantidade de FAK fosforilada na tirosina 925 em clones representativos de T98G ARHGAP21 KD em relação às células controle (T98G NC), e o acúmulo nuclear de FAKY925 (setas brancas) versus núcleos vazios para FAKY925 (cabeças de setas brancas). As setas amarelas chamam atenção para a presença de FAK na membrana das células em que ARHGAP21 fora depletada. As imagens foram capturadas utilizando-se objetiva de 63X, imersão em óleo..... 83

Figura 26: Depleção de ARHGAP21 resulta em aumento de atividade de Cdc42 e RhoA. A, Gel de poliacrilamida evidenciando a eficiente expressão e purificação das proteínas de fusão GST-RBD e GST-WBD. B e C, ensaio de atividade de Cdc42 utilizando a proteína de fusão GST-WBD para precipitar Cdc42-GTP (forma ativa) e ensaio de atividade de RhoA utilizando a proteína de fusão GST-RBD para precipitar RhoA-GTP (forma ativa), respectivamente, de extratos de células T98G NC e T98G ARHGAP21 KD. 85

Figura 27: Depleção de ARHGAP21 resulta em alteração da distribuição de Cdc42. A, Micrografias de imunofluorescência capturadas em microscópio confocal LSM510 (Zeiss) mostrando as alterações no padrão de marcação de Cdc42, com acúmulo na região peri-nuclear (setas amarelas) e nas protrusões membranares, em um clone representativo de T98G ARHGAP21 KD, em

relação às células controle (T98G NC). As imagens foram capturadas utilizando-se objetiva de 40X, imersão em óleo. Setas brancas evidenciam o padrão de marcação normal de Cdc42 em células T98G. B, Quantificação do acúmulo de Cdc42 na região peri-nuclear de células T98G NC (controle) e dois clones representativos transfectados com sh1 e sh2, mostrando o aumento deste acúmulo nos clones em que ARHGAP21 fora inibida. O gráfico mostra as médias e os valores máximos e mínimos da distribuição. A variância das medianas foi analisada pelo Teste não paramétrico de Kruskal Wallis..... 86

Figura 28: Depleção de ARHGAP21 resulta em aumento de secreção de MMP-2 e indução da secreção de MMP-9. A, Zimografia gelatinolítica de sobrenadantes de células T98G NC e ARHGAP21 KD e B, zimografia gelatinolítica de sobrenadantes de culturas após cultivo em placas comuns ou recobertas com Matrigel por 48 hs, evidenciando o aumento da secreção de MMP-2 e MMP-9 devido à depleção de ARHGAP21..... 89

Figura 29: Migração celular é aumentada devido à depleção de ARHGAP21. T98G NC e células ARHGAP21 KD (sh1: #3 e #15, sh2: #2 e #16) foram submetidas a experimentos de migração em placas Transwell (Costar) por 48 horas, e apresentaram aumento de sua capacidade migratória. Os aumentos de taxas de migração de células depletadas em relação ao controle (NC) são estatisticamente significativos (Wilcoxon Rank Sum Test ; * = $p < 0,05$). 91

Figura 30: Avaliação da expressão do gene *ARHGAP21* em casuística de astrocitomas. RNAs de amostras de pacientes foram transcritos e utilizados em reação de PCR em tempo-real para avaliação da expressão de ARHGAP21. A expressão relativa de ARHGAp21 foi calculada em relação à HPRT (A), GUS-B (B), β -actina (C) e BCRP (D)..... 93

Figura 31: Normalização da expressão relativa de *ARHGAP21*. Para a normalização foi utilizado o programa GeNorm que calcula uma média dos melhores controles endógenos analisados e a utiliza para relativizar a expressão do gene de interesse. 94

Figura 32: Fotos ilustrativas do padrão de expressão de *ARHGAP21* em cortes histológicos de amostras de pacientes com astrocitomas Graus II e IV em comparação ao tecido cerebral normal. As imagens foram capturadas em microscópio Nikon utilizando-se a objetiva de 40X. 96

Figura 33: Regiões do sistema nervoso central em que *ARHGAP21* é mais expresso. A, esquema de *ARHGAP21* com seus domínios e a região reconhecida pela sonda utilizada na hibridização. B, Northern blotting multi tecidual (Clontech) evidenciando a alta expressão de *ARHGAP21* (7,5 Kb) em cerebelo e córtex, e uma expressão mais fraca em cordão espinhal..... 97

Figura 34: Culturas primárias de astrócitos (P0) e neurônios (N16 e N18) de camundongos evidenciando localização intracelular distinta de *ARHGAP21* nestas células. Setas brancas, indicam neurônios nas co-culturas. GFAP = proteína fibrilar glial, presente somente em astrócitos; β III-tubulina = marcador de neurônios. 98

Figura 35: Imunofluorescência de cultura de neurônios N18 seccionada por microscopia confocal, mostrando detalhe em zoom da região de co-localização entre *ARHGAP21* e FAK. NF-L = proteína neurofilamentar, marcadora de neurônios. 99

Figura 36: Curva de expressão de *ARHGAP21* em diferentes fases do desenvolvimento embrionário (E) e pós-nato (P) de camundongos. RNAs dos hemisférios direito (A) e esquerdo (B) de três animais de cada idade foram coletados, transcritos e a reação de PCR em tempo real foi realizada utilizando-se iniciadores específicos para o gene *ARHGAP21* de camundongo e para o controle endógeno *Gapdh*..... 101

Figura 37: Curva de expressão de *Mmp-2* e *Mmp-9* em diferentes fases do desenvolvimento embrionário (E) e pós-nato (P) de camundongos. RNAs dos hemisférios direito (A) e esquerdo (B) de três animais de cada idade foram coletados, transcritos e a reação de PCR em tempo real foi realizada

utilizando-se iniciadores específicos para o gene *ARHGAP21* e o controle endógeno *Gapdh* de camundongo..... 103

Figura 38: Células tronco embrionárias (ES) que não expressam o gene *ARHGAP21* diferenciam-se em linhagens neuronais normalmente. A, western blotting evidenciando a ausência da proteína *ARHGAP21* na linhagem AK0286. B, As linhagens E14Tg1a.4 e AK0286 foram diferenciadas com ácido-trans-retinóico segundo o protocolo apresentado em Material e Métodos. Após o término da diferenciação, células com fenótipo neuronal puderam ser observadas em ambas as linhagens. C.E. = corpos embriônicos; ES = célula tronco embrionária; ATRA = ácido All-Trans-retinóico. 105

Figura 39: Animais quiméricos obtidos pela injeção de células AK0886 em blastocistos de animais C57BL/6. A cor aguti na pelagem, conferida pela linhagem AK0886, indica o quimerismo. A fêmea apresenta nível de quimerismo bem maior que o macho (seta branca indicando a mancha na pelagem). O macho foi capaz de transmitir a cor aguti na pelagem para um filhote. 107

Figura 40: Representação esquemática do mecanismo de atuação de *ARHGAP21*. *ARHGAP21* localiza-se no núcleo e na região peri-nuclear. Sua interação com FAK e seu controle negativo sobre Cdc42 bloqueiam a nucleação de actina pelo complexo Arp2/3 no Golgi. B, a depleção de *ARHGAP21* resulta: (1) na fosforilação de FAK com a consequente ativação de p130CAS, culminando na ativação da transcrição de *mmp-2*; (2) no aumento da atividade de Cdc42, em paralelo a FAK, resultando na ativação de Arp2/3 e aumento da nucleação de actina; e (3) no aumento de Cdc42 ativa agindo na formação de protrusões membranares. 112

➤LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequências dos iniciadores utilizados em reações de RT-PCR. Hu = humano; mou= camundongo.	43
Tabela 2: Oligonucleotídeos escolhidos a partir do programa computacional <i>siRNA Target Finder</i> (http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html) desenvolvido pela Ambion.	48
Tabela 3: Massas dos peptídeos gerados após a digestão e MALDI-MS das proteínas contidas nas bandas de 160, 200 e 250 Kda que pertencem à ARHGAP21.	68
Tabela 4: Amostras de astrocitomas utilizada para avaliar a expressão do gene <i>ARHGAP21</i>	92
Tabela 5: Resumo dos resultados obtidos das imunohistoquímicas para ARHGAP21 de dois casos de astrocitomas graus II e IV. F+(%) = frequência média de positividade; A (µm) = área total de positividade; A% = área percentual de positividade e DOM = densidade óptica média das regiões positivas.	95
Tabela 6: Células tronco embrionárias contendo inserções no gene <i>ARHGAP21</i> adquiridas para geração de camundongos nocaute para este gene.	104

➤ RESUMO

ARHGAP21 é uma proteína pertencente à família RhoGAP e apresenta atividade GAP sobre Cdc42 e RhoA, interage com ARF-GTPases e com α -catenina, modulando a dinâmica da actina associada às membranas do Golgi e a integridade das junções aderentes. Devido ao relato da elevada expressão de ARHGAP21 em tecido nervoso surgiu o objetivo da presente tese que foi avaliar a expressão e a função de ARHGAP21 no tecido neural normal e neoplásico. Nossos resultados mostraram que ARHGAP21 localiza-se no núcleo e na região peri-nuclear de vários tipos celulares, e nos prolongamentos celulares de neurônios primários, e interage com FAK na região peri-nuclear. Os resultados da depleção de ARHGAP21 por moléculas de shRNAi indicaram que ARHGAP21 inibe a migração de células derivadas de glioblastoma multiforme através do controle negativo de ARHGAP21 sobre Cdc42, pela inativação da sinalização FAK $\rightarrow$ p130^{CAS}, e pelo controle da secreção de metaloprotease-2. Além disso, a expressão da proteína ARHGAP21 correlaciona-se com o grau tumoral de astrocitomas *in vivo*, indicando a existência de um possível controle negativo de ARHGAP21 sobre a transformação ainda maior destas células, já que sua depleção *in vitro* resultou em aumento do grau tumoral. Em tecido cerebral normal, evidenciamos elevada expressão de *ARHGAP21* em córtex e cerebelo humano. Além disso, o gene *ARHGAP21* murino mostrou-se altamente expresso em E17, dia em que termina a migração de precursores neurais e que coincide com a queda de expressão de *Mmp-2*. Portanto, ARHGAP21 demonstrou, em sistema nervoso normal, controle semelhante sobre a expressão do gene *Mmp-2* ao observado em linhagens de glioblastoma.

Nossos resultados sugerem que ARHGAP21 pode ser uma poderosa reguladora da migração celular em diferentes tecidos e, assim, ter papel crucial no controle da progressão de diferentes tipos tumorais.

Palavras chaves: RhoGAP, ARHGAP21, sistema nervoso, glioblastoma, FAK, migração.

➤ABSTRACT

ARHGAP21 is a RhoGAP protein with GAP activity over Cdc42 and RhoA, it also interacts with ARF-GTPases and with α -catenin, controlling actin dynamics on Golgi membranes and the integrity of adherens junctions, respectively. Due to ARHGAP21 high expression levels in nervous tissues has emerged the objective of the present thesis that was evaluate the expression levels and the function of ARHGAP21 in the normal and neoplastic nervous system. Our results evidenced that ARHGAP21 localizes to the nucleus and perinuclear region of several cell types, and on cell protrusions in primary mouse neurons, and interacts with FAK in the perinuclear region. Results of ARHGAP21 depletion by shRNAi molecules evidenced that ARHGAP21 inhibits glioblastoma cell migration through the negative control of Cdc42, the inhibition of FAK $\rightarrow$ p130^{CAS} signaling, and through the control of metalloprotease 2 secretion. Besides that, ARHGAP21 expression correlates to tumor grade on astrocytomas samples, indicating the existence of a negative control of ARHGAP21 on astrocytoma cellular transformation, since its depletion in vitro resulted in higher malignity of T98G glioblastoma cell line. In normal cerebral tissue, *ARHGAP21* murine gene is highly expressed on E17 animals, day in which neuronal precursor's migration finishes and when there is a reduction in *mmp-2* expression. Therefore, ARHGAP21 showed in normal nervous system, similar control of *mmp-2* gene expression as observed in glioblastoma cell lines.

Our results suggest that ARHGAP21 might be a master regulator of cellular migration in different tissues and, like this, it may has a crucial role in the control of tumor progression.

Key words: RhoGAP, ARHGAP21, nervous system, glioblastoma, FAK, migration.

1. Introdução

Após a conclusão do sequenciamento do genoma humano fez-se necessária a descrição dos genes até então desconhecidos. A seleção de novos genes cujos estudos seriam interessantes partiu de dados estruturais que permitiram a comparação destes genes com famílias gênicas já conhecidas. Nesse contexto, nosso laboratório selecionou genes que tinham semelhança à proteína β -espectrina do citoesqueleto dos eritrócitos. Um dos genes selecionados foi denominado *ARHGAP21* e assemelha-se à espectrina por possuir um domínio denominado *Pleckstrin Homology* (PH) em sua seqüência. Este gene codifica uma proteína RhoGAP com alta expressão em tecido nervoso, entre outros. A partir de então surgiu o racional para o desenvolvimento da presente tese que foi a caracterização funcional de ARHGAP21 no sistema nervoso normal e neoplásico.

1.1. A família de proteínas RhoGTPases e seu papel em sistema nervoso

As proteínas da família RhoGTPase são as principais responsáveis pelo controle da dinâmica do citoesqueleto de actina (MITRA et al., 2005) e pela formação de adesão. Estão ainda relacionadas ao controle do processo de diferenciação celular, à regulação do ciclo celular, ao controle da apoptose e ao controle do tráfego de membrana (MOON e ZHENG, 2003). Estas proteínas atuam transmitindo sinais extracelulares às cascatas de sinalização intracelular. As três proteínas pertencentes à família das RhoGTPase mais estudadas até o momento e que desempenham atividades relacionadas à dinâmica da actina em fibroblastos são: RhoA, cuja atividade gera contração dos feixes de actina e grande adesão ao substrato; Rac1, cuja atividade induz polimerização da actina para levar à propulsão dos lamelipódios e formação de pequenas adesões; e Cdc42, cuja atividade gera polaridade e induz formação de filopódios (HALL, 1998).

Estas moléculas são pequenas proteínas que se ligam à GDP (quando inativas) e à GTP (quando ativas). Esta ciclagem é controlada por três subclasses de moléculas: as denominadas RhoGEFs (de *guanine nucleotide exchange factor*) que promovem a liberação de GDP e facilitam a associação à GTP (ZHENG, 2001); as denominadas RhoGDIs (de “*guanine nucleotide dissociation inhibitor*”) que seqüestram a forma inativa (ligada à GDP) das RhoGTPases, impedindo sua ativação (OLOFSSON, 1999); e as denominadas RhoGAPs (de “*GTPase activating proteins*”), reguladores negativos

que ativam a capacidade intrínseca de hidrólise de GTP das RhoGTPases tornando-as inativas (LAMARCHE e HALL, 1994) (Figura 1).

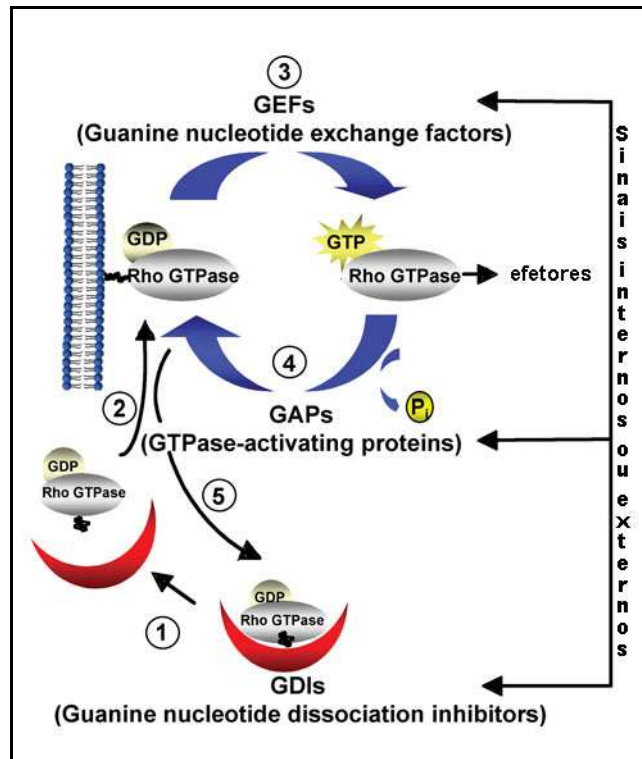


Figura 1: Ciclagem de ativação-desativação das proteínas da família das RhoGTPases. Sinais internos ou externos resultam na dissociação de RhoGTPases-GDP de RhoGDIs (1). RhoGTPases associadas à GDP aproximam-se de regiões sub-membranares (2) onde novos sinais internos ou externos poderão levar à ação de uma RhoGEF (3), resultando na ativação da molécula (ligação à GTP). Finalmente, RhoGTPases ativas (ligadas a GTP) podem ser inativadas pela ação de proteínas RhoGAPs (4). Esquema adaptado de Tcherkezian & Lamarche-Vane (2007).

Já está bem relatado o papel de RhoGTPases na regulação de múltiplos processos do desenvolvimento morfológico dos neurônios, incluindo crescimento axonal, indicação do sentido de crescimento, estabilização dos novos ramos, e elaboração dos dendritos (LUO, 2000; MOON e ZHENG, 2003).

1.2. A nova RhoGAP “ARHGAP21”

A família de proteínas RhoGAPs é caracterizada pela presença de um domínio RhoGAP conservado em sua seqüência primária constituída por 150 aminoácidos (dos quais deve haver pelo menos 20% de similaridade compartilhada entre todas as componentes desta família), que se arranjam formando nove α -hélices. A presença de um resíduo de arginina na posição 58, altamente conservado em uma estrutura de loop (“Arginin finger”), é de extrema importância na estabilização da conformação das RhoGTPases ativas (ligadas a GTP), para a posterior aceleração da atividade GTPásica da mesma (GAMBLIN e SMERDON, 1998; PECK et al., 2002).

Atualmente, mais de 70 locus do genoma humano codificam possíveis proteínas RhoGAPs (KANDPAL, 2006). Um novo e importante membro desta família é o gene *ARHGAP21* (NM_020824) descrito recentemente no Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro – UNICAMP (BASSERES et al., 2002). Este gene foi identificado através do banco de dados disponível no sítio <http://www.ludwig.org.br/ORESTES> gerado pelo Projeto Genoma Humano do Câncer (STRAUSBERG et al., 2002).

ARHGAP21 localiza-se no braço curto do cromossomo 10, banda 10p12.1 (Figura 2), codifica um transcrito de 7107 bases e apresenta um quadro aberto de leitura de 5874 pb, sendo composto por 26 éxons (Figura 2).

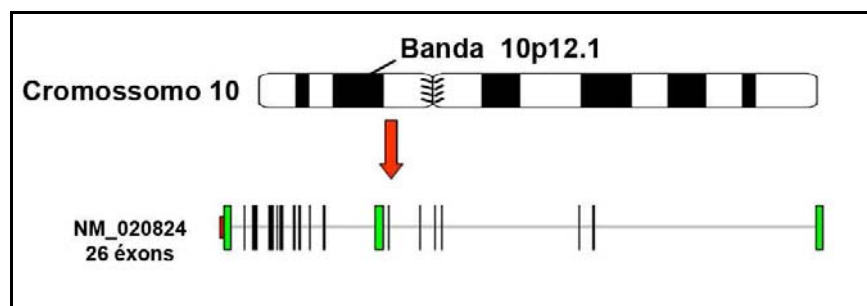


Figura 2: Representação esquemática da localização do gene *ARHGAP21* no cromossomo 10, banda 10p12.1, e do produto codificado de 7107 pb, que é constituído por 26 éxons.

A proteína ARHGAP21 é composta por 1957 aminoácidos e possui além do domínio RhoGAP, um domínio PH (Pleckstrin Homology Domain) e um domínio PDZ (PSD-95/Discs-large/ZO-1), que podem indicar possíveis interações desta proteína com fosfolipídios de membrana e actina (SARAS e HELDIN, 1996), e com a porção carboxi terminal de proteínas alvo (YAO et al., 1999), respectivamente (Figura 3). O gene humano e o gene de camundongo que codificam ARHGAP21 apresentam 86,5% de homologia. Estudos iniciais indicaram que o gene codificador da proteína ARHGAP21 é expresso principalmente em cérebro, coração, musculatura esquelética e em placenta, e que ele está relacionado ao processo de diferenciação de células hematopoiéticas HL-60 (BASSERES et al., 2002).

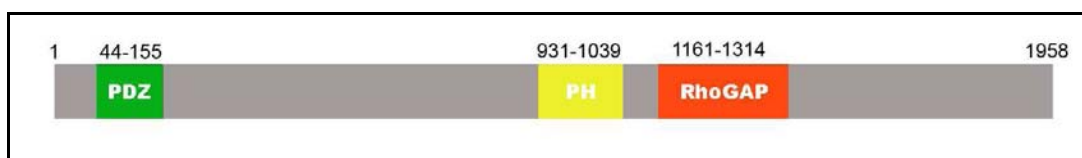


Figura 3: Esquema da estrutura primária da proteína ARHGAP21 e seus domínios. Esta proteína apresenta 1957 aminoácidos e os domínios PDZ, PH e RhoGAP estão distribuídos localizados entre os aminoácidos 44-155, 931-1039 e 1161-1314, respectivamente.

Como os domínios PDZ são altamente conservados e representam domínios de interação proteína-proteína de bactérias a humanos (NOURRY et al., 2003) e como a estrutura modular das RhoGAPs são importantes para a interação com outras proteínas (KANDPAL, 2006), nossa hipótese é a de que a proteína ARHGAP21 provavelmente desempenhe outras atividades intracelulares além do simples controle negativo sobre as RhoGTPases.

De fato, ensaios de duplo híbrido realizados na tentativa de se encontrar novas proteínas que interagissem com ARF1-GTPase e α -catenina resultaram na identificação de ARHGAP21 como tal (DUBOIS e CHAVRIER, 2005; SOUSA et al., 2005). ARHGAP21 foi, então, caracterizada como proteína recrutada ao complexo de Golgi devido à interação com a forma ativa de ARF-1, portadora de atividade

regulatória sobre Cdc42, reguladora do complexo nucleador de actina Arp2/3 (DUBOIS e CHAVRIER, 2005). É ainda capaz de associar-se à α -catenina e ser recrutada com esta para a membrana plasmática em pontos de invasão da bactéria patogênica intestinal *Listeria monocytogenes*, nas iminências da formação do complexo formador das junções aderentes E-Caderina- β -catenina (SOUSA et al., 2005). Também em uma análise do transcriptoma dos carcinomas escamosos de cabeça e pescoço foi encontrada elevada expressão de ARHGAP21 em 91% dos casos em comparação com os tecidos normais correspondentes, de modo que os autores propuseram ser esta proteína um possível alvo terapêutico (CARLES et al., 2006).

Dada a importância de RhoGAPs em inibir a dinâmica da actina e aos elevados níveis de ARHGAP21 encontrados em tecido cerebral humano (BASSERES et al., 2002), nós postulamos que a proteína ARHGAP21 possa ter importante papel na diferenciação neural.

1.3. Os tumores humanos da glia

Os tumores da glia, genericamente conhecidos como gliomas, são os tumores primários mais comuns do sistema nervoso central. Os gliomas são agressivos, altamente invasivos e neurologicamente destrutivos. Estes tumores são classificados de acordo com sua morfologia e características clínicas em astrocitomas, oligodendromas e oligoastrocitomas. Os tipos mais freqüentes são os astrocitomas, classificados em astrocitoma pilocítico (grau I), astrocitoma difuso (grau II), astrocitoma anaplásico (grau III) e glioblastoma multiforme (grau IV) (MAHER et al., 2001).

Glioblastoma multiforme (GBM) são tumores altamente malignos que correspondem a 50% dos casos dentre todos os astrocitomas, e os pacientes apresentam uma sobrevida média de um ano (KLEIHUES et al., 2002). O ponto chave para a falha dos tratamentos é a elevada capacidade de invasão de estruturas cerebrais adjacentes pelas células tumorais (STEWART, 2002). Os GBMs podem originar-se de novo (GBMs primários) ou progressivamente a partir de astrocitomas de baixo grau (GBM secundário) (KLEIHUES e OHGAKI, 2000). Estes dois subtipos de GBM são histopatologicamente indistinguíveis (OHGAKI e KLEIHUES, 2007), porém atualmente sabe-se que eles atingem pacientes de diferentes faixas etárias, desenvolvem-se por

caminhos genéticos diferentes (OHGAKI et al., 2004; OHGAKI e KLEIHUES, 2005), apresentam expressão diferenciada de RNA e proteínas e, podem reagir distintamente a radioterapia e quimioterapia (FURUTA et al., 2004; GODARD et al., 2003; TSO et al., 2006).

Há diversas linhagens celulares de gliomas humanos cujos estudos *in vitro* permitem a identificação de mecanismos moleculares que podem vir a ser alvos terapêuticos no controle da evolução destes tumores *in vivo* (DEMUTH e BERENS, 2004).

Atualmente sabe-se que apesar de sua elevada capacidade invasiva linhagens de glioblastomas multiformes humanas apresentam expressão normal de todas as proteínas constituintes das junções intracelulares (caderinas, cateninas, LIN-7-PDZ, entre outras). Porém o que caracteriza a falha na formação das junções e o conseqüente aumento da mobilidade destas células são falhas no recrutamento das proteínas para as junções (PEREGO et al., 2002). Além disso, células tumorais metastáticas expressam altos níveis de proteínas componentes das vias reguladoras da polimerização da actina, entre elas a RhoGTPase Cdc42 e o complexo nucleador de actina Arp2/3 (YAMAGUCHI et al., 2005), proteínas sobre as quais ARHGAP21 atua (DUBOIS e CHAVRIER, 2005). Portanto, por todo o apresentado anteriormente e devido ao fato de ARHGAP21 interagir com FAK (BORGES et al., 2008), uma importante quinase transdutora de sinais hiper-expressa em tumores humanos, e frente à necessidade de identificação de novos alvos terapêuticos, faz se condizente o estudo da função de ARHGAP21 em células de glioblastomas.

1.4. A quinase de adesão focal (Focal Adhesion Kinase, FAK)

A quinase de adesão focal (FAK) é uma molécula adaptadora que recruta proteínas sinalizadoras para porções sub-membranares onde integrinas se agrupam. O complexo formado então transmite sinais da matriz extracelular ao citoesqueleto (COX et al., 2006). Neste sentido, FAK pode influenciar a atividade dos principais reguladores da dinâmica do citoesqueleto de actina: as proteínas pertencentes à família das RhoGTPases (MITRA et al., 2005).

FAK é composta por um domínio amino-terminal FERM (*protein 4.1, ezrin, radixin and moesin homology domain*) que media sua interação com integrinas e com

receptores de membrana e que promove sua translocação para o núcleo (LIM et al., 2008); um domínio quinase central; três regiões ricas em prolina (Pro), e um domínio carboxi-terminal FAT (*Focal Adhesion Target*) responsável pela interação com proteínas tais como paxilina e talina que recrutam FAK para os complexos de adesão (Figura 4) (COX et al., 2006).

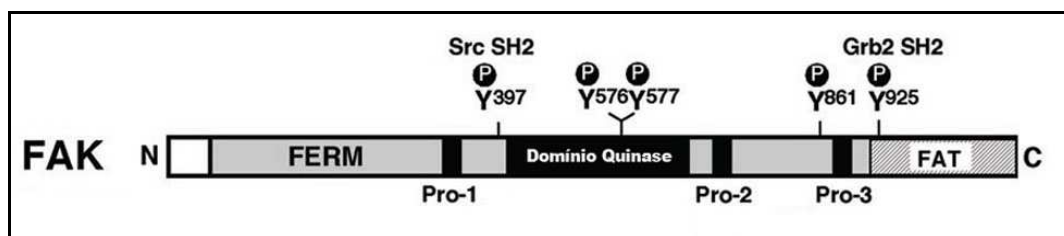


Figura 4: Esquema da estrutura primária da proteína FAK. Estão evidenciados o domínio FERM na região N-terminal, um domínio quinase central, o domínio FAT na região C-terminal e as três regiões ricas em prolinas (Pro). FAK apresenta vários resíduos de tirosina (Y) que quando fosforilados resultam em ativação da molécula.

A proteína FAK apresenta vários sítios de tirosina e serina que sofrem fosforilação (Figura 4). Em termos gerais a fosforilação de FAK em resíduos de tirosina está associada à ativação da molécula, enquanto que a fosforilação em resíduos de serina está associada à inativação da mesma. A ativação da proteína FAK se inicia com a autofosforilação do resíduo de tirosina 397 (Y397), quando integrinas se agrupam ou quando receptores a fatores de crescimento são ativados por seus ligantes (tais como PDGFr e EGFr) (HYNES, 2002). A fosforilação deste sítio recruta a proteína c-Src (SCHALLER et al., 1994) e esta por sua vez, fosforila os sítios Y576/577 do domínio quinase e os sítios Y861 e Y925 presentes na porção C-terminal de FAK. A fosforilação destes outros sítios de tirosina promove a associação de proteínas que contêm domínios SH2 (BRUNTON et al., 2005), bem como resultam em alteração conformacional da molécula permitindo a associação de proteínas que contêm domínios SH3 (tais como proteínas da família CAS) às regiões ricas em prolina. Através de múltiplas interações proteína-proteína, a ativação de FAK resulta na subsequente ativação de algumas importantes proteínas, tais como a quinase regulada

por sinal extracelular (ERK), a quinase N-terminal c-Jun (JNK), a quinase ativada por mitógeno (MAPK) e as GTPases Rac1 e Cdc42 (COX et al., 2006).

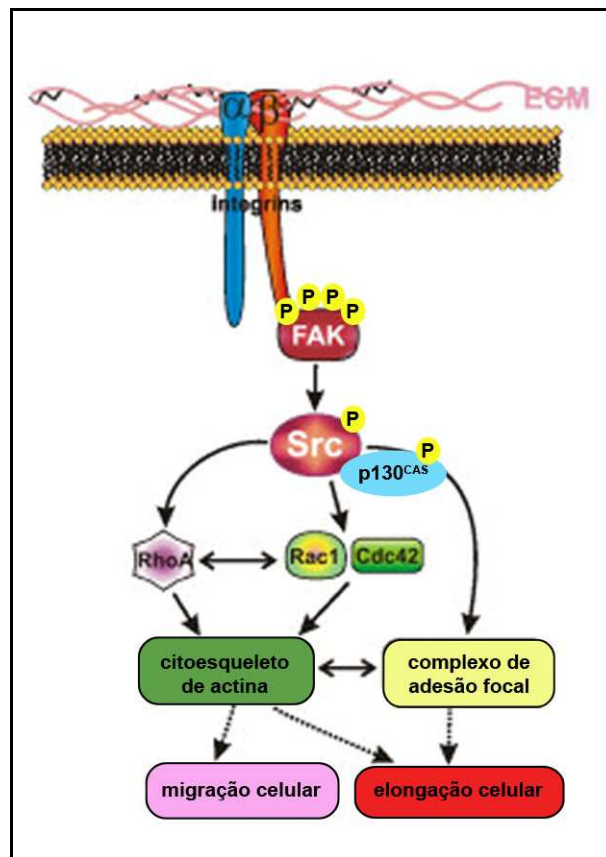


Figura 5: Esquema da via de ativação de FAK que resulta em migração celular. A fosforilação de FAK por Src ocorre quando as subunidades de integrinas α e β se dimerizam devido à sinalização da matriz extracelular (ECM) e Src, por sua vez, também é fosforilada por FAK. A proteína $p130^{CAS}$ se associa à FAK ativa e é fosforilada por Src. Finalmente, $p130^{CAS}$ ativa proteínas da família RhoGTPase resultando em modificações do citoesqueleto de actina e do complexo de adesão focal, levando à migração e elongação celular.

A associação de proteínas da família CAS (*Crk-associated substrates*), composta por $p130^{CAS}$, HEF1 e Sin/Efs, à FAK e sua conseqüente fosforilação por c-Src resulta na ativação de pequenas GTPases tais como Rac1 ou Cdc42 e JNK que, por sua vez, atuam na formação de protrusões membranares e aumento da migração celular (Figura

5) (CARY et al., 1998; CHO e KLEMKE, 2000; DOLFI et al., 1998; FASHENA et al., 2002; KIYOKAWA et al., 1998; KLEMKE et al., 1998; NATARAJAN et al., 2006). Por outro lado, sabe-se que o resíduo S722 é fosforilado por GSK3 (quinase glicogênio sintase) e que esta ação reduz a atividade de FAK. Opostamente, a inibição de GSK3 reduz a fosforilação de S722 e aumenta a atividade quinase de FAK (BIANCHI et al., 2005). Corroborando os dados anteriores, células em migração apresentam baixa fosforilação de S722 e GSK3 β é inativa (COX et al., 2006). Já foi relatado também que a fosforilação do resíduo S722 inibe a associação de p130^{CAS} recombinante à região Pro-2 de FAK, inibindo, portanto, a ativação de vias de migração à jusante de FAK (MA et al., 2001; YAMAKITA et al., 1999). Logo, a fosforilação de FAK em tirosinas ou serinas balanceia a ativação de processos migratórios.

Atualmente há muitas evidências do acúmulo de FAK em tumores humanos (GABARRA-NIECKO et al., 2003). Durante a progressão tumoral e o processo de metástase, o evento chave que facilita a disseminação das células da massa tumoral primária é a habilidade de crescer e sobreviver independentemente de ancoragem, situação esta que não envolve a sinalização de integrinas. Uma célula tumoral que expresse elevados níveis de FAK nestas condições pode ser mais resistente à apoptose pela habilidade desta FAK-não associada às integrinas ser translocada para o núcleo e impedir a ativação excessiva de p53 (LIM et al., 2008). Por fim, é conhecido o fato de a elevada expressão de FAK em glioblastomas aumentar a proliferação, a invasão, a sobrevivência e a angiogênese (SHI et al., 2007). Portanto, a melhor compreensão das vias de sinalização em que FAK bem como ARHGAP21 atuam nos glioblastomas faz-se necessária.

2. Objetivo

2. Objetivo

Avaliar a expressão e a função da proteína classificada como pertencente à família RhoGAP, ARHGAP21, em sistema nervoso normal e nos tumores mais recorrentes do sistema nervoso central, os astrocitomas.

2.1. Objetivos Específicos

1. Padronizar o funcionamento do anticorpo policlonal anti-ARHGAP21 para as metodologias de Western blotting, imunoprecipitação e imunofluorescência;
2. Investigar a localização intracelular de ARHGAP21;
3. Analisar a expressão e a função de ARHGAP21 em células de glioblastoma multiforme humano (astrocitoma grau IV) *in vitro*, bem como sua relação com o processo invasivo destas células;
4. Verificar em que vias de sinalização celular ARHGAP21 está envolvida;
5. Analisar os efeitos da depleção de ARHGAP21 em células de glioblastoma *in vitro*;
6. Analisar a expressão do mRNA e da proteína ARHGAP21 em casuísticas de astrocitomas (graus I a IV);
7. Investigar a ocorrência de modificações pós-traducionais da proteína ARHGAP21;
8. Avaliar o papel de ARHGAP21 na diferenciação neural de células tronco embrionárias de camundongo;
9. Gerar um modelo de animal nocaute para ARHGAP21.

3. Material e Métodos

3.1. Nomenclatura

A nomenclatura apresentada neste trabalho esta de acordo com as recomendações do comitê HUGO (POVEY et al., 2001).

3.2. Reagentes e Anticorpos

O anticorpo policlonal anti-ARHGAP21 foi gerado pelo Laboratório Bethyl Inc (Montgomery, Texas), através da imunização de coelhos com o peptide sintético KSDSGSLGDAKNEKE, correspondente aos resíduos 1856-1870 da sequência da proteína humana ARHGAP21. Anticorpos policlonais contra as proteínas FAK, c-Src, p130^{CAS} e Histona-H1, anticorpo monoclonal anti-Cdc42, e anticorpo policlonal anti-cabra contra P-FAK Tyr925 foram adquiridos da empresa Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Policlonais produzidos em coelho contra as proteínas P-Src Tyr418 e P-FAK Tyr397 foram adquiridos da empresa Biosource (Bethesda, MD). Faloidina-TRITC foi adquirida da Sigma (St Louis, MO). Anticorpos monoclonais produzidos em camundongos anti-receptor de Transferrina (Tr) e anti-GMP-1 (SUMO-1), e anticorpo policlonal anti-SUMO-2/3 foram adquiridos da Zymed Laboratories Inc. (San Francisco, CA). Anticorpos secundários conjugados AlexaFluor[®] 488, AlexaFluor[®] 633 e AlexaFluor[®] 555 e o reagente ProLong[®] Gold com DAPI foram adquiridos da Molecular Probes (Eugene, OR). O reagente para revelação de western blotting, ECL, foi adquirido da GE Health Care (Buckinghamshire, UK). Todos os demais reagentes químicos foram adquiridos da Sigma.

3.3. Linhagens Celulares

Células das linhagens de glioblastomas humanos A172 e T98G (ATCC) nos foram gentilmente cedidas pela Prof. Dra. Mari Cleide Sogayar, IQ - USP. A linhagem de glioblastoma U138MG (ATCC) nos foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Carlos Menck – ICB – USP. A linhagem de fibroblastos FHN (fibroblastos humanos normais) foi estabelecida a partir de tecido de redução de mama no laboratório da Dra. Gláucia Santelli (ICB – USP) de acordo com a aprovação do comitê de ética vigente. Estas linhagens foram mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e utilizadas entre as passagens 5 e 15. Células da linhagem HeLa (ATCC) e da

linhagem HEK293 foram mantidas em meio RPMI suplementado com 10% de FBS. Estoques congelados destas linhagens são mantidos em nitrogênio líquido.

Linhagens de células tronco embrionárias de camundongo: As linhagens E14Tg2a.4, AK0286, RRR629 e AP0884 foram adquiridas da University California- Davis. Estas células foram cultivadas em placas recobertas com 0,2% gelatina em GMEM (Gibco – Invitrogen) contendo 10% de soro fetal bovino, 2 mM Glutamina, 1mM de Piruvato de sódio, 1x aminoácido não essenciais MEM (Gibco – Invitrogen), 10^3 Unidades/mL de LIF, 5 μ L para 500 mL de β -mercaptoetanol, e foram subcultivadas a cada dois dias.

3.4. Amostras de RNA de astrocitomas – Faculdade de Medicina – USP

As amostras de tumor foram obtidas de pacientes com tumores do sistema nervoso central, tratados pelo Grupo de Neurocirurgia do Departamento de Neurologia do Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, entre os anos 2000 e 2005, e nos foram disponibilizadas pela Dra. Suely K. N. Marie. Este trabalho obteve aprovação do comitê de ética do HC-FMUSP (processo Nº 619/05) em 14 de setembro de 2005 com o título do projeto: Procura de marcadores moleculares relacionados ao diagnóstico e prognóstico de tumores do Sistema Nervoso Central.

Os tumores foram categorizados de acordo com o sistema WHO por neuropatologistas da Divisão de Anatomia Patológica – USP. Consentimento foi obtido de cada paciente. Amostras cirúrgicas frescas dos diferentes graus de tumor e de tecido cerebral não neoplásico (obtido de lobotomia temporal de cirurgias de epilepsia) foram macro-dissecadas e congeladas em nitrogênio líquido. Todos os tumores foram micro-dissecados antes da extração dos RNAs. Utilizou-se o reagente Trizol[®] (Invitrogen). Os RNAs foram transcritos como especificado no item 3.8 abaixo.

3.5. Cultivo das linhagens A172 e T98G em gel de Colágeno tipo I e em Extrato de Membrana Basal (MatrigelTM – BD)

O gel de Colágeno tipo I, na concentração de 2 mg/mL, foi acrescido de meio DMEM 10 vezes concentrado e de bicarbonato de sódio 4,4 %. Por placa p100 (diâmetro = 10 cm; Corning) foram utilizados 600 μ L da mistura, espalhada com rodinho de vidro estéril. O extrato de membrana basal MatrigelTM (BD Biosciences) foi diluído em DMEM

sem vermelho de fenol para concentração final de 5 mg/mL. Por placa p100 foram espalhados 600 µL do extrato e por lamínula circular de 12 mm de diâmetro utilizamos 30 µL. As placas ou lamínulas foram deixadas em estufa de cultura (37°C, 5% CO₂) por 1 hora para polimerização dos substratos. Após este período, 3 X 10⁵ células das linhagens A172 e T98G foram distribuídas por placa p100 e foram cultivadas por 3 ou 7 dias.

3.6. Preparação de RNA e proteínas de A172 e T98G cultivadas nos substratos

Ao final do cultivo descrito acima as células foram lisadas e os RNAs foram extraídos com o reagente Trizol[®] (Invitrogen) seguindo as especificações do fabricante.

Para a extração de proteínas das células A172 e T98G cultivadas em gel de colágeno, as placas foram incubadas com uma mistura de tripsina-EDTA e collagenase tipo I (1 mg/ml) por 2 horas em estufa de cultura. Assim que todo o substrato se mostrou digerido o conteúdo das placas foi transferido para um tubo cônico e centrifugado 800 g por 20 minutos (4°C). Enquanto que as células cultivadas em extrato de membrana basal (Matrigel[™] - BD) foram incubadas com Versene (PBS contendo EDTA 5 mM pH 8,0) em banho de gelo com agitação ocasional por 1 hora. Após esta incubação o conteúdo das placas foi centrifugado em tubos cônicos a 800 g por 20 minutos (4°C).

Após as centrifugações, as células foram lisadas em tampão RIPA (NaCl 150 mM; Tris-Cl 50 mM pH 7,4; deoxicolato 0,5 %; SDS 0,1 %, NP-40 1%) mais inibidores de proteases e fosfatases. Uma alíquota foi separada para quantificação de proteínas. 100 µg de proteínas foram fracionadas em gel SDS-PAGE (8%) e transferidas para membranas de nitrocelulose (Hybond-C).

3.7. Northern Blotting

A membrana comercial Clontech Multi-tecidual foi hibridizadas com fragmentos do gene *ARHGAP21* marcados com α- ³²P dCTP (50 µCi) a 37°C por 4 horas. As hibridizações foram feitas utilizando-se a solução ExpressHyb (Clontech, BD) a 42°C por 4 horas. A membrana foi lavada com 1X SSC/0,1%SDS (3 X 15 minutos) e 0,1X SSC/0,1% SDS (1 X 15 minutos)(temperatura ambiente). Após as lavagens, a

membrana foi exposta a filme de raio X (Kodak, X-Omat) em cassetes contendo intensificadores por 24-48 horas à -80°C .

3.8. PCR em tempo real (RT-PCR)

RNAs totais foram extraídos utilizando-se o reagente Trizol[®] (Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante. A síntese de cDNA se deu a partir de 2 µg de RNA utilizando-se Superscript III (Invitrogen, Carlsbad, CA) e os iniciadores Oligo dT. As amostras de cDNA foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop e 10 ng/µL foram utilizadas por reação. Os iniciadores utilizados foram desenhados pelo software Primer Express (Applied Biosystems) e suas sequências estão indicadas na Tabela 1. As reações de RT-PCR foram realizadas em equipamento ABI Prism 5700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) seguindo as condições de ciclo recomendadas pelo fabricante.

Tabela 1: Sequências dos iniciadores utilizados em reações de RT-PCR. Hu = humano; mou= camundongo.

Iniciador	Orientação	Sequência (5' → 3')
ARHGAP21-mou_S	Senso	GGAGGAGAGGAAAGCTTCAAGC
ARHGAP21-mou_AS	antisenso	ATCGTAGCTGGTGCTCTAACG
GAPDH-mou S	senso	TGACCACCAACAACCTGCTTA
GAPDH-mou AS	antisenso	GGATGCAGGGATGATGTTC
MMP-2 mou S	senso	GCGACCACAACCAACTACGA
MMP-2 mou AS	antisenso	GGCTGCCACGAGGAATAGG
MMP-9 mou S	senso	TGCCCTGGAACCTCACACGA
MMP-9 mou AS	antisenso	AACTCACACGCCAGAAGAATTTG
ARHGAP21-Hu_S	senso	AGGCAAACCTTTGCTTGGTGCTA
ARHGAP21-Hu_AS	antisenso	ACTGAGAAGTTTCCTTTCCGACTC
ABL-Hu S	senso	TGGAGATAACACTCTAAGCATAACTAAA
ABL-Hu AS	antisenso	GATGTAGTTGCTTGGGACCCA
HPRT-Hu S	senso	AGGCAAACCTTTGCTTGGTGCTA
HPRT-Hu AS	antisenso	CTCAGCCTTTCTTTGAAGAGTCA
B-actina-Hu S	senso	ATTTAGACAAGCAGGAGGACATGAAGAC
B-actina-Hu AS	antisenso	CTTGCAGCTTTTCATCAAAGGTGTTC
Gus-beta-Hu S	senso	GAAAATACGTGGTTGGAGAGCTCAT
Gus-beta-Hu AS	antisenso	CCGAGTGAAGATCCCCTTTTAA
BCRP- Hu S	senso	CCTTCGACGTCAATAACAAGGAT
BCRP – Hu AS	antisenso	CCTGCGATGGCGTTCAC

3.9. Extração de proteínas, imunoprecipitação de complexos protéicos e Western blotting

As células foram lisadas em tampão RIPA (NaCl 150 mM; Tris-Cl 50 mM pH 7,4; deoxicolato 0,5 %; SDS 0,1 %, NP-40 1%) contendo inibidores de protease (PMSF 10 mM, leupeptina 1µg/mL, ortovanadato de sódio) e mantidas em gelo por 30 minutos.

Em seguida, os lisados foram centrifugados por 10000 g por 30 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos de 1,5 mL e o conteúdo protéico foi dosado pela utilização do reagente BioRad e tendo como base uma curva padrão de albumina (BSA), segundo as especificações do fabricante.

Quando foram realizados estudos de co-imunoprecipitação quantidades correspondentes a 500-1000 µg de extrato protéico foram incubadas com 5-10 µg do anticorpo de interesse (indicado nas figuras) por 16-18 horas (4°C) sob agitação. Os imuno-complexos foram recuperados pela incubação com solução de 50% proteína-A-Sepharose (GE) por 1 hora sob agitação (4°C), seguida de lavagens em tampão RIPA (três lavagens com centrifugações de 30 segundos 10000 g entre elas) para remoção das ligações inespecíficas. A

Quantidades de proteínas correspondentes a 100 ou 70 µg foram fracionadas em gel de poliacrilamida-SDS de concentração desejada (indicada nas figuras). Após a corrida, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Hybond) por 2 horas (4°C), 100 volts. As membranas foram incubadas em solução de TBS-T (50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl e 0,1% Tween-20) contendo 5% de leite desnatado para bloqueio dos sítios inespecíficos. Em seguida foram incubadas com anticorpo primário de interesse (diluições 1:1000 ou 1:500) por 16-18 horas. No dia seguinte foram lavadas em TBS-T por 3 vezes de 10 minutos e, em seguida, foram incubadas com anticorpo secundário conjugado a peroxidase (KPL) por 1 hora (temperatura ambiente). Seguiram-se outras lavagens para retirada do excesso de anticorpo e os westerns foram revelados utilizando-se o reagente ECL (GE).

Quando houve necessidade de quantificação das bandas de western blotting utilizou-se o programa ImageJ, disponível no site do NIH (Bethesda, USA). As intensidades foram corrigidas pelas bandas de amostras correspondentes de β-actina.

3.10. Imunofluorescência e Microscopia Confocal

Células A172, T98G, FHN e HeLa foram cultivadas em lamínulas de vidro circulares ou sobre lamínulas previamente recobertas com 30 µL de 5 mg/mL Extrato de Membrana Basal Matrigel™ (BD Biosciences) pelo período desejado. As células foram fixadas em solução de PBS-paraformaldeído (PFA) 4% por 15 minutos (TA), e então

foram lavadas em PBS 3 vezes (5 minutos, sob agitação). Para evitar ligação inespecífica do anticorpo primário e permeabilizar as células, foi realizado bloqueio em solução de PBS contendo 3% de leite desnatado e 0,6% de triton X-100 (1 hora, TA). A incubação com o anticorpo primário anti-ARHGAP21 (na concentração de 5 µg/mL em PBS 1% leite desnatado) ou com anticorpo feito em camundongo anti-GM130 foi realizada em câmara úmida por 4 horas (temperatura ambiente) ou por 16-18 horas (4°C). Após este período, as lamínulas foram lavadas em PBS (3 vezes de 5 minutos, sob agitação). Seguiu-se a incubação com o anticorpo secundário anti-coelho AlexaFluor 488, anti-coelho AlexaFluor 633 (Molecular Probes) ou anticorpo anti-camundongo AlexaFluor 555 ou 488 por 1 hora a 4°C. Novamente as lamínulas foram lavadas em PBS e incubadas com faloidina-TRITC (Sigma-Aldrich) ou faloidina AlexaFluor 633 (Molecular Probes) por 30 minutos. Após a última lavagem em PBS, as lamínulas foram montadas em lâminas utilizando-se o meio de montagem para fluorescência.

Independentemente do protocolo utilizado, as lâminas foram analisadas por escaneamento a laser em um LSM-510 (Zeiss) montado sobre um microscópio Axioplan (Zeiss), utilizando as objetivas de 40X ou 63X de imersão em óleo.

3.11. Imunohistoquímica para ARHGAP21

Cortes histológicos de dois casos de astrocitomas graus II e IV nos foram cedidos pelo prof. Dr. Luciano Queiróz do Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas – UNICAMP. As reações de imunohistoquímica foram realizadas pelo Dr. Paulo Latuf-Filho no Laboratório de Patologia Molecular – CIPED – UNICAMP, que é dirigido pelo Dr. José Vassalo.

Inicialmente os cortes foram desparafinizados por uma passagem em xilol por 30 minutos (110°C), outras duas passagens em xilol à temperatura ambiente, três passagens em cubas contendo etanol absoluto (TA), duas passagens em etanol 80% e etanol 50% e, por fim, uma lavagem em água corrente por 5 minutos. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com a passagem dos cortes em três cubas contendo água oxigenada 10% (3 minutos cada passagem), seguida por uma lavagem em água corrente por 5 minutos. A recuperação antigênica foi realizada em tampão

citrato 10 mM (pH 6) em panela a vapor por 30 minutos. O anticorpo primário anti-ARHGAP21 foi utilizado na diluição 1:400 e foi incubado nos cortes em câmara úmida por 16-18 horas a 4°C. Em seguida, foram realizadas três lavagens em PBS. Foi realizado o bloqueio pós-incubação com anticorpo primário com o reagente Novocasta Post Primary Block (Novocasta – Novolink™ – Leica Inc) por 30 minutos (37°C). Novamente, os cortes foram lavados por três vezes em PBS por 5 minutos (TA). Seguiu-se a incubação com anticorpo secundário (Novolink™ Polymer) por 30 minutos a 37°C. Os cortes foram mais uma vez lavados três vezes em PBS por 5 minutos. Logo após, as lâminas foram colocadas em solução contendo diâmino benzidina (DAB), PBS, H₂O₂ e DMSO por 3 minutos. As lâminas foram lavadas em água corrente e depois em água destilada. A contra-coloração foi feita com Hematoxilina de Mayer por 10 a 30 segundos, seguida por lavagens em água corrente e destilada. Ao final as lâminas foram incubadas por 3 minutos em água amoniacal. Seguiram-se as últimas lavagens em água corrente, desidratação em xilol e em etanol e montagem das lâminas em resina adequada.

As lâminas foram analisadas e as imagens foram capturadas em microscópio Nikon Eclipse E200 acoplado a câmera digital CCD Nikon coolpix 995. Para cada caso foram obtidas três imagens referentes à *hot spots* de positividade utilizando a objetiva de 40X (área do campo: 13.776,264 µm). As imagens foram analisadas com auxílio do Dr. André Schenka utilizando-se o programa ImageLab versão 8.2, e foram parâmetros de análise a frequência média de positividade (F+), a área e a área proporcional (A e A%) e a densidade óptica média (DOM).

3.12. Análise computacional de ARHGAP21

A predição de sinais de localização nuclear foi realizada pela submissão da sequência de aminoácidos da proteína ARHGAP21 a uma ferramenta disponível no sítio <http://cubic.bioc.columbia.edu/db/NLSdb/>, da Universidade de Columbia, que compara a sequência submetida a um banco de dados que possui 308 potenciais e experimentalmente testados NLSs.

Para a predição da modificação pós-traducional denominada SUMOILAÇÃO, utilizamos a ferramenta SUMO sites prediction (SUMOsp) 2.0 disponível no sítio <http://bioinformatics.lcd-ustc.org/sumosp/> (Xue et al., 2006 e Ren et al., submetido).

A ferramenta Colocalization Finder do programa ImageJ (W. Rasband, National Institutes of Health, Bethesda; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) foi utilizada para análise quantitativa de áreas de colocalização. Os coeficientes de Correlação de Pearson (Rr) e de sobreposição (R) foram quantificados.

3.13. Espectrometria de Massas

Extratos protéicos totais de células T98G foram coletados em tampão de lise adequado (7M uréia, 2M tiouréia, 4% CHAPS e 100 mM DTT) e foram fracionados em 8% SDS-PAGE. Após a corrida o gel foi corado em 0,5% Coomassie-Brilliant Blue e devidamente descorado para visualização das proteínas. Bandas de peso molecular de >250, 250 e 200 KDa foram recortadas do gel cuidadosamente para evitar contaminação e procedeu-se a digestão das proteínas do gel com Tripsin Gold® (Promega) e extração das proteínas digeridas do gel. Os peptídeos resultantes foram eluídos numa solução de Acetonitrila (ACN) 50% e Ácido Fórmico 5% e posteriormente foram concentrados em Zip Tips C18 (Millipore). Em seguida, os peptídeos foram eluídos diretamente para uma placa de MALDI para que as massas dos peptídeos fossem medidas no Espectrômetro de Massas Applied Biosystems Voyager DE-PRO MALDI-TOF (“Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight”), equipamento do Laboratório de Proteômica, Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia (Unicamp). Estes experimentos foram conduzidos pelo aluno de doutorado Daniel Martins de Souza, sob orientação do Prof. Dr. Camilo.

3.14. Transfecção transitória de DNA plasmidial

Células T98G ou HEK293 foram semeadas em placas p100 (1×10^6 células/ placa). Após 12-16 horas, seguiu-se transfecção utilizando-se o reagente Lipofectamina 2000® (Gibco – Invitrogen) seguindo as especificações do fabricante. Foi utilizado 10 µg de DNA plasmidial e 50 µL de Lipofectamina por placa. O volume final de transfecção por placa foi de 5 mL de meio OptiMem™ (Gibco – Invitrogen). Após 5 horas de

transfecção o meio foi totalmente substituído por meio de cultivo normal (DMEM ou RPMI, 10% FBS). Extratos protéicos das células de cada condição foram extraídos após 48 horas de transfecção.

3.15. Transfecção estável de plasmídeos contendo oligos de shRNAi

Seqüências de 21 nucleotídeos específicas para o gene *ARHGAP21* (Tabela 2) foram desenhadas utilizando-se o software de design disponível no sítio da empresa Ambion e inseridas no vetor de expressão em células de mamíferos *pSilencer[®] 2.- U6 Neo*(Ambion - Inc).

Os oligonucleotídeos foram anelados seguindo as recomendações do fabricante e inseridos no vetor *pSilencer*.

Tabela 2: Oligonucleotídeos escolhidos a partir do programa computacional *siRNA Target Finder* (http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html) desenvolvido pela Ambion.

nomeação	Seqüências 5' – 3'
sh1	GATCCCGCACGTACCTAGTCTGAAGTTCAAGAGACTTCAGACTAGGTACGTGCTTTTTGGAAA
sh2	GATCCCGTATTCGGCCATGGAAACATTCAAGAGATGTTCCATGGCCGAATACTTTTTGGAAA

No dia anterior a transfecção, células T98G foram semeadas em número de 3×10^5 por placa p60. A transfecção foi realizada utilizando-se 2 µg de DNA dos plasmídeos e o reagente Lipofectamina 2000[®] (Gibco – Invitrogen), seguindo-se as recomendações do fabricante.

Após 5 horas de incubação com a mistura de transfecção (DNA/lipofectamina e meio de cultura sem soro) esta foi trocada por meio DMEM-10% FBS. 48 horas após a transfecção o conteúdo de células contido em cada placa de transfecção foi tripsinizado e dividido em 3 placas de 10 cm de diâmetro (p100) e ao meio de cultura foi adicionado 500 µg/mL do antibiótico geneticina (G418) que agiu na seleção de células efetivamente transfectadas.

Duas semanas após a seleção com G418 iniciamos o recolhimento das colônias dos clones formados e suas expansões para congelamento, extração de RNA e de proteínas para análise do grau de depleção de *ARHGAP21*.

3.16. Extração de proteínas de diferentes frações sub-celulares

Células das linhagens A172, T98G e HeLa foram semeadas em placas de 15 cm de diâmetro (p150) e mantidas até obtenção da confluência desejada.

No dia da extração, as células são lavadas em PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, pH 7,4) gelado para remoção completa do meio de cultura, em seguida foram coletadas em 1 mL de tampão A (Hepes 10 mM pH 7,9, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 10 mM, DTT 0,5 mM, ortovanatado de sódio, aprotinina e PMSF), centrifugadas 3000 rpm por 5 minutos (4°C) e ao precipitado foi adicionado 500 µL de tampão A contendo 0,1% de NP-40. Este extrato foi homogeneizado com seringa de insulina 20X para rompimento da membrana plasmática e foi incubado a 4°C. Após centrifugação de 5 minutos a 12000 rpm duas frações foram obtidas: o sobrenadante contendo as frações citoplasmáticas e membranares e o precipitado contendo os núcleos. O sobrenadante foi ultracentrifugado a 100.000 G por 30 minutos, após o que se obteve, novamente, um sobrenadante correspondendo à FRAÇÃO CITOPLASMÁTICA (volume aproximado de 500 µL) e um precipitado correspondendo à FRAÇÃO MEMBRANAR, que foi ressuspenso em tampão A contendo 0,1% Triton X-100.

Ao precipitado contendo a FRAÇÃO NUCLEAR foram adicionados 100 µL de tampão nuclear (Hepes 20 mM pH 7,9; MgCl₂ 1,5 mM; DTT 0,5 mM, glicerol 25%; EDTA 0,2 mM; NaCl 0,42 M; ortovanadato de sódio; aprotinina) e os tubos foram mantidos sob agitação por 30 minutos (4°C). Após este período de agitação a fração foi centrifugada por 10 minutos a 12000 rpm (4°C) e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo.

O conteúdo protéico foi dosado utilizando-se o reagente Bio-Rad.

Para fracionamento em géis de concentrações adequadas foi estabelecido aplicar-se 100 µg de proteínas citoplasmáticas. Calculou-se a que porcentagem do total de extrato da fração citoplasmática isso correspondia, de modo que das demais frações

foram aplicados volumes correspondentes à mesma porcentagem do que fora aplicado da fração citoplasmática. Com isso é possível comparar a quantidade de proteínas em cada fração celular correspondentes à quantidade de células.

3.17. Ensaio de Pulldown

Construções de FAK compreendendo seus domínios foram utilizadas em ensaio de pulldown. pGEX2T, carregando a porção amino-terminal de FAK (GST-FERM; resíduos 1 a 400), pGEX2TK, codificando a proteína de fusão FAK C-terminal (GST-C-term; resíduos 765 a 1052), e pGEX-KG, contendo a sequência do domínio catalítico de FAK (GST-CAT; resíduos 390 a 396), foram gentilmente cedidas pelo Dr. Jun-Lin Guan do Departamento de Medicina Molecular da Universidade Cornell, Ithaca, NY (construção FERM), e Michael Schaller do Departamento de Microbiologia e Centro de estudo do Cancer da Faculdade de Medicina da Universidade de Virginia -EUA (construções CAT e C-terminal). Todas as construções foram inseridas em *E. coli* BL21 Codon Plus e expressas como descrito previamente (COOPER et al., 2003; SCHALLER et al., 1995), exceto por mínimas modificações. Beads de Glutathione sepharose (GE), conjugadas as três construções expressas, foram utilizadas para precipitar a proteína ARHGAP21 de extratos celulares de células T98G preparados em tampão GST-Fish (SANDER et al., 1998). Os precipitados foram fracionados em gel de SDS-poliacrilamida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e estas foram incubadas com anticorpos anti-ARHGAP21 ou anti-Src.

3.18. Ensaio de atividade de RhoGTPases

A atividade de Cdc42 e RhoA foi determinada por ensaio de precipitação por afinidade. O domínio de ligação de Cdc42 ativa à proteína WASP (aminoácidos 215 a 295 de WASP), clonado em pGEX-KG, foi gentilmente cedido pelo Dr. David Sacks do Brigham and Women's Hospital (Boston – EUA), e foi expresso como descrito previamente (KIM et al., 2000). Já o domínio de ligação de RhoA ativa à proteína Rhotekin, clonado em pGEX-, foi gentilmente cedido pelo Dr. Martin Schwartz da Universidade Estadual de Nova York – EUA, e foi expresso como descrito previamente (REN et al., 1999). Coletamos extratos de células T98G NC e T98G ARHGAP21-KD

em tampão GST-Fish (glicerol 10%; Tris 50mM pH 7,4; NaCl 100mM; NP-40 1%; $MgCl_2$ 2mM; aprotinina 10 μ g/mL; PMSF 1mM; ortovanadato de sódio 1mM e leupeptina 1 μ g/mL). Extratos proteicos correspondentes a 500 μ g foram incubados com 100 μ g de pérolas de GST-WBD ou GST-RBD, por 90 minutos sob agitação (4°C). Os complexos precipitados foram fracionados em gel de poli-acrilamida 12%, transferidos para membranas de nitrocelulose e posteriormente incubados com anticorpos monoclonais anti-Cdc42 e anti-RhoA. Os conteúdos de Cdc42-GTP e RhoA-GTP foram comparados ao total das proteínas Cdc42 e RhoA expressos pelas amostras.

3.19. Zimografia

Células T98G NC e T98G ARHGAP21-KD foram semeadas em placas de 12 poços (1x10⁵/ poço). Após 48 horas o meio foi trocado para DMEM sem soro e após outras 48 horas coletamos o sobrenadante de cultura e o número de células em cada poço foi contado. O sobrenadante foi centrifugado à 2000 g por 5 minutos e um volume correspondente à 10⁴ células foi aplicado em géis 7,5% poli-acrilamida contendo 0,1% de gelatina. Após 2 horas de corrida, os géis foram lavados três vezes de 20 minutos em tampão contendo Triton X-100 para remover o SDS. Em seguida, os géis foram lavados em água destilada para remover o Triton. Os géis foram corados em solução de Coomassie Brilliant Blue por 16-18 horas e foram descorados por 2 horas em solução de ácido acético-metanol.

3.20. Ensaio de Migração

Células T98G NC e T98G ARHGAP21-KD foram submetidas a ensaios de migração em placas Transwell (membranas com poros de 8 μ M). As membranas de polí-carbonato das placas foram recobertas com 1 mg/mL de poli-L-lisina em meio DMEM contendo 0,1% de BSA por 2 horas à 37°C. Após este período, as membranas foram lavadas com água destilada estéril por duas vezes. As células mantidas em placas p100 até confluência média foram carenciadas em meio sem soro por 16-24 horas. Após este período foram tripsinizadas, contadas e 5 X10⁴ células foram colocadas por membrana. Aos compartimentos inferiores das placas Transwell adicionamos meio DMEM 0,1% BSA (Controle negativo de migração) ou meio DMEM contendo 10% de

soro fetal bovino (FBS) como quimio-atrativo. Após 48 horas, as células foram fixadas em PBS contendo 5% de glutaraldeído e coradas com azul de toluidina 1% (MUIR et al., 1993). As células da porção superior dos filtros (células que não migraram) foram removidas com cotonete. As membranas contendo as células que migraram coradas foram secas e o foi utilizado 1% de SDS para romper as células e a porcentagem de células que migraram foi estimada pela absorbância a 595 nm, como função do total de células (obtido de membranas cujas células da porção superior não foram removidas). Os experimentos foram realizados em triplicatas e foram realizados três experimentos independentes para cada clone.

Análise estatística dos experimentos de migração: Os resultados foram analisados pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney disponível no software BioStat. Os resultados mostrados são média $\pm$ desvio padrão.

3.21. Preparação de culturas primárias de astrócitos e neurônios.

Animais pós-natos (P0) foram decaptados depois de anestesiados em gelo e fêmeas prenhes foram anestesiadas profundamente com tiopental sódico e tiveram suas cavidades abdominais abertas para remoção dos embriões. As cabeças dos animais pós-natos e os embriões foram colocados em placas de petri contendo solução de 0,6% glicose-PBS. As cabeças dos animais foram dissecadas em fluxo laminar sob lupa: retiramos primeiramente a pele, depois a calota craniana e, por último, o encéfalo transferindo-o para nova placa de Petri contendo PBS-glicose estéril. Os encéfalos foram dissecados, as meninges foram completamente removidas até separarmos apenas os córtices dos animais. Os córtices foram então picotados com tesoura e esta mistura foi transferida com pipeta Pasteur para tubos de 15 mL. Os tecidos triturados foram dissociados com pipetagens seguidas em Pasteur (20 X). Após esta dissociação as células foram decantando e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Ao precipitado do primeiro tubo foi adicionado mais PBS-glicose e o procedimento de dissociação foi repetido. Após a decantação dos restos de tecido, o sobrenadante foi transferido para o mesmo tubo do outro. Centrifugamos o sobrenadante (3-5 minutos, 1500 rpm), jogamos fora o sobrenadante resultante da centrifugação e ao precipitado adicionamos um volume conhecido de meio DMEM-F12 contendo 10% FBS. As células

foram ressuspensas e contadas em câmar de Neubauer. Quantidade de células de interesse foram plaqueadas em lamínulas de vidro ou garrafas de cultura previamente tratadas com 1 mg/mL poli-L-lisina.

Para obtenção de astrócitos as culturas foram mantidas em meio DMEM-F12 contendo 10% FBS e passaram por um procedimento de “lavagem” a cada 48 hs com meio sem soro para remoção de restos de tecido. Para obtenção de neurônios, as culturas obtidas a partir de animais em estágio embrionário foram mantidas em meio DMEM-F12 e foram utilizadas após 24 horas do plaqueamento. Quando co-culturas de astrócitos e neurônios foram realizadas, as culturas de astrócitos foram mantidas por 7 dias previamente ao plaqueamento dos neurônios.

3.22. Diferenciação neural de células tronco embrionárias de camundongo normais e que não expressam o gene *ARHGAP21*

Células tronco embrionárias de camundongo contendo uma sequência com códon de parada da transcrição no gene *ARHGAP21* foram geradas pelo consórcio internacional Gene Trap. Foram adquiridas da University of California – Davis (UC Davis) três linhagens (AK0286, RRR629 e AP0884) que apresentaram a inserção do códon de parada na região 5'UTR ou no primeiro íntron do gene. Estas linhagens foram utilizadas para geração de animais nocaute para *ARHGAP21* e também para ensaios de diferenciação *in vitro*, tendo como controle a linhagem parental E14Tg2a.4, também adquirida da UC Davis.

Células controle (E14Tg2a.4) e nocaute para *ARHGAP21* (AK0286) foram cultivadas em meio GMEM contendo 10% FBS, 2 mM glutamina, 1 mM Piruvato de sódio, aminoácidos essenciais MEM® (Gibco-Invitrogen), β-mercaptoetanol e LIF. Ao obter-se a quantidade necessária de células, iniciamos o protocolo de diferenciação (BIBEL et al., 2007). As células foram tripsinizadas, contadas e 4×10^4 células foram ressuspensas em 15 mL de meio GMEM (sem β-mercaptoetanol e LIF) e mantidas em placas p100 (contendo uma camada de 0,2% de agarose para evitar adesão das células). Após dois dias, os sobrenadantes foram transferidos para tubos falcon e mantidos por alguns minutos para precipitação das células. O meio foi então retirado e substituído por GMEM novo. Este procedimento foi repetido novamente após dois dias, porém desta

vez foi adicionado 5 μ M de ácido-transretinóico (estoque 10^{-2} M diluído em DMSO) às placas contendo células que desejavamos diferenciar, ou o volume correspondente de DMSO às placas contendo células controle. Mais uma vez após dois dias, o meio de cultura foi substituído por meio novo contendo ácido transretinóico ou DMSO. Após os oito dias de crescimento em suspensão, os corpos embriônicos foram desfeitos utilizando-se solução de 0,05% tripsina-EDTA e incubação em banho a 37°C. As células dispersas foram contadas e semeadas em placas tratadas previamente com 1 mg/mL poli-L-lisina (14-16 horas) e 10 μ g/mL de laminina (5 horas) na densidade de 2×10^6 células por placa p60.

4. Resultados

4.1. Padronização da utilização do anticorpo anti-ARHGAP21

O gene *ARHGAP21* foi recentemente descrito em nosso laboratório (BASSERES et al., 2002). Como não havia anticorpos comercialmente disponíveis, tivemos de encomendar a produção de um anticorpo policlonal à empresa americana Bethyl, o que se deu pela imunização de coelhos com um peptídeo de 15 aminoácidos, identificado como altamente imunogênico de acordo com os parâmetros do site www.expasy.com.

O anticorpo foi testado pela metodologia de Western blot, como descrito em materiais e métodos. Foram utilizados extratos de várias linhagens celulares e foi encontrada uma banda de aproximadamente 200 KDa correspondente a ARHGAP21, cuja expressão parece ser diferente entre as linhagens (Figura 6). Há outras bandas que apresentam peso maior que 250 kDa e aproximado de 160 kDa são frequentemente identificadas pelo anticorpo anti-ARHGAP21 (Figura 6, setas cinzas).

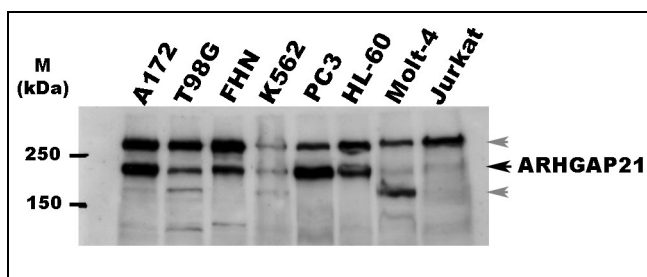


Figura 6: Western Blot de diversas linhagens humanas. Após fracionamento de amostras protéicas em gel de poliacrilamida 8%, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Hybond) e seguiu-se a incubação com um anticorpo anti-ARHGAP21 (Bethyl), em seguida com um anticorpo secundário anti-coelho e utilizou-se ECL (Amershan) para revelar o western. A172 e T98G = linhagens de gliomas humanos; FHN = Fibroblasto Humano Normal; HL-60 = linhagem derivada de leucemia mielóide aguda; Jurkat e Molt-4 = linhagens derivadas de leucemia linfóide aguda; PC3 = linhagem de adenocarcinoma prostático; K562 = linhagem derivada de leucemia mielóide crônica. **Seta preta** = peso predito de ARHGAP21; **setas cinza** = bandas reconhecidas pelo anticorpo policlonal anti-ARHGAP21 que são possíveis isoformas de ARHGAP21.

O anticorpo anti-ARHGAP21 também teve sua utilização padronizada para a detecção da proteína em sua conformação nativa pela técnica de imunofluorescência. Interessantemente, a proteína ARHGAP21 mostrou-se localizada na região nuclear e peri-nuclear de diversas linhagens celulares, tanto em linhagens de células normais (FHN, de Fibroblastos Humanos Normais) como em linhagens transformadas (HeLa, proveniente de carcinoma cervical humano; e as linhagens de glioblastoma humano A172 e T98G) (Figura 7).

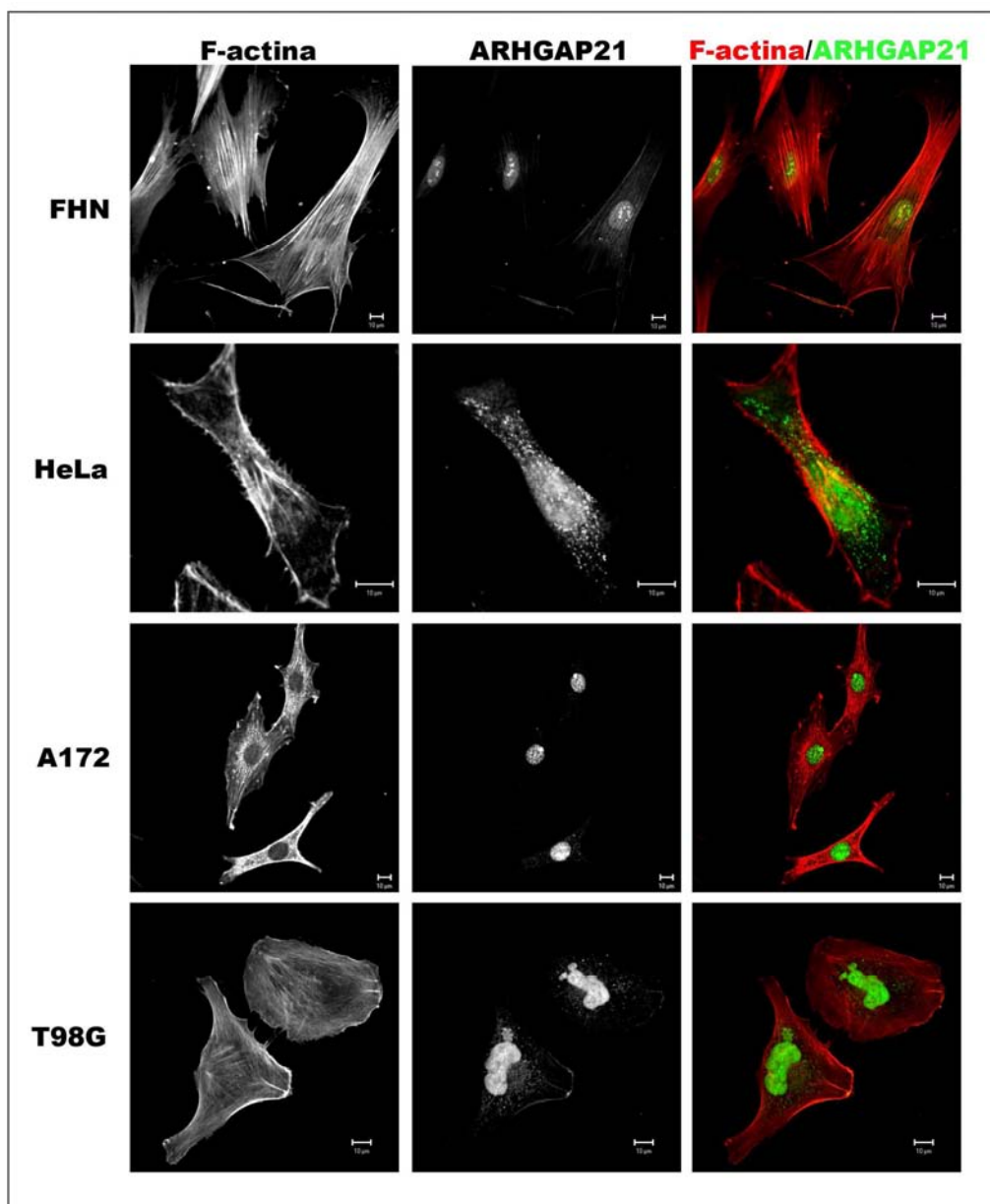


Figura 7: Anticorpo anti-ARHGAP21 é capaz de reconhecer a proteína nativa por imunofluorescência no núcleo das células. Imunofluorescência de células FHN, HeLa, A172 e T98G, evidenciando a presença de ARHGAP21 na região nuclear e peri-nuclear (verde). Faloidina-TRITC (vermelha) foi utilizada para marcar a actina filamentar (F-actina). As lâminas foram analisadas por escaneamento a laser em um LSM-510 (Zeiss) montado sobre um microscópio Axioplan (Zeiss), utilizando a objetiva de 40X (FHN, A172 e T98G) ou 63X de imersão em óleo (HeLa).

Atualmente sabe-se que há basicamente dois tipos de sinais de localização nuclear (do inglês, “Nuclear Localization Signal”) e, portanto é possível prever computacionalmente a existência destas sequências. O primeiro a ser identificado corresponde a um bloco de cinco aminoácidos contíguos positivamente carregados, enquanto que o segundo tipo consiste em dois blocos de aminoácidos carregados positivamente separados por 10-12 aminoácidos (NLS bipartido). Estas duas variantes de NLS são reconhecidas pela família de proteína α -importina que são responsáveis pelo transporte das mesmas através dos poros nucleares (PARK, et al., 2000).

A capacidade do banco de dados de seqüências de direcionamento nuclear da Universidade de Columbia, ao qual nossa seqüência foi submetida, está de acordo com 43% das proteínas sabidamente nucleares e não se sobrepõe a proteínas não-nucleares conhecidas (NAIR et al., 2003).

A figura 8 apresenta a seqüência de aminoácidos de ARHGAP21 submetida à análise estando destacado em vermelho o NLS encontrado (RKRRKK). O programa utilizado ainda menciona que 100% das proteínas conhecidas que apresentam estes aminoácidos constituindo seu NLS são nucleares.

O NLS encontrado compreende os aminoácidos de 1418 ao 1422, o que corresponde ao fragmento que vai de 4690 a 4709 na seqüência de nucleotídeos de *ARHGAP21*, de modo que este sinal encontra-se no penúltimo éxon da proteína ARHGAP21 (éxon 25), justamente o éxon que codifica o peptídeo utilizado na confecção do anticorpo policlonal que possuímos.

```

MATRRTGLSEGDGDKLKACEVSKNKDGKEQSETVLSSEDETFSWPGPKTVTLKRTSQG
FGFTLRHFIVYPPEIAIQFSYKDEENGNGRGKQNRNLEPMDTIFVKQVKEGGPAFEAGL
CTGDRIIKVNAGESVIGKTYSQVIALIQNSDTTLELSVMPKDEDILQVLQFTKDVLTALAYSQD
AYLKGNAYSGNARNIPEPPPICYPWLPSPAPSAMAQPVESPPDSSLKQQTSTPVLTPQ
GRAYRMEIQVPPSPSTDVAKSNTAVCVCNESVRTVIVPSEKVVLLSNRRNHTGPSHRTTE
EVRYGVSEQTSKTVSRRTSPPLSIPTTHLIHQPAGSRSLPSGILLKSGNYSGHSDGISS
SRSQAVEAPSVSVNHYSNPNSHQHIDWKNYKTYKEYIDNRRHLHIGCRTIQERLDSLRAAS
QSTTDYNQVVPNRRTTLQGRRRRSTSHDRVPQSVQIRQRSVSQERLEDSVLMKYCPRSAS
QGALTSPSVSFSNHRTRSWDYIEGQDETLENVNSGTPIPDNNGEKKQTYKWSGFTEQD
DRRGICERPRQQEIHKSFRGSNFTVAPSVVNSDNRRMSGRGVGVSQFVKIPDLKTLQ
SNRNFQTTTCGMSLPRGISQDRSPLVKVRSNSLKAPSTHVTKPSFSQKSFVSIKDQRPVN
HLHQNSLLNQQTWVRTSDAPDQQVETGKSPSLSGASAKPAPQSSNAGTSDLELPVSQ
RNQDLSLQEAETEQSDTLDNKEAVILREKPPSGRQTPQPLRHQSYILAVNDQETGSDTT
CWLPNDAARREVIHMRMEERKASSTSPPGDSLASIPFIDEPTSPSIDHIAHIPASAVISAST
SQVPSIATVPPCLTTSAPLIIRQLSHDHESVGGPPSLDAQPNKSKTERSKSYDEGLDDYRED
AKLSFKHVSSLKGIKIADSQKSSSDSGSRKDSSEVFSDAAKEGWLHFRPLVTDKGRV
GGIRPWKQMYVVLRGHSLYLYKDKREQTPSEEEQPISVNACLIDISYSETKRKNVFRLL
TTSDCECLFQAEDRDDMLAWIKTIQESSNLNEEDTGVNTRDLISRRIKEYNNLMSKAEQL
PKTPRQSLRIRQTLLGAKSEPKTQSPHSPKEESERKLLSKDDTSPPKDKGTWRKGIPSIM
RKTFEKKPTATGTGVRLLDDCPAHTNRYIPLIVDICCKLVEERGLETYGIYRVPGNNAI
SSMQEELNKGMAIDIDIQDDKWRDLNVISLLKSFFRKLPEPLFTNDKYADFIENRKEDP
LDRKLTSLRLIHLPEHHYETLKLFLSAHLKTVASENSEKNKMEPRNLAIIVFGPTLVRTSEDN
MTHMVTMHMPDQYKIVETLIQHHDWFFTEEGAEELTTVQEESTVDSQPVPNIHLLTNIG
RTGVSPGDVSDSATSDSTKSGKSGWGSQKQYSRELLVSSIFAASKKKKKPEKAQ
SSSELDNVEFFKKENVEQCHNDTKEESKKESETLGRKQKIIIAKENSTRKDPSTTKDEKI
SLGKESTPSEEPSPPHNSKHNSPTLSRFAILKESPRSLAQKSSHLEETGSDSGTLLS
TSSQASLARFSMKKSTSPETKHSEFLANVSTITSYTTSSATYLTSLDSSRLSPEVQSV
AESKGDEADDERSELISEGRPVETDSESEFPVFPTALTSERLFRGKLQEVTKSSRRNSE
GSELSCTEGLTSSLDSSRRQLFSSHLIECDTLRKKKSARFKSDSGSLGDAKNEKEAPSL
TKVFDVMKKGKSTGSLTPTRGESEKQEPWTKIADRLKLRPRAPADDMFGVGNHKV
NAETAKRKSIRRRHTLGGHRRATEISVLNFWKVHEQSGERESELSAVNRLKPKCSAQDL
SISDWLARERLRTSTSDLSRGEIGDPQTENPSTREIATDTPLSLHCNTGSSSSTLASTN
RPLLSIPPQSPDQI NGESFQNVSKNASSAANAQPHKLSETPGSKAEFHPCL

```

Figura 8: Posição da Sequência de Localização Nuclear (NLS) da proteína ARHGAP21 humana (NM 020824). A sequência de aminoácidos de ARHGAP21 foi analisada por uma ferramenta criada na Universidade de Columbia e disponível no sítio <http://cubic.bioc.columbia.edu/db/NLSdb/>.

Ainda para comprovar a localização nuclear de ARHGAP21 *in vivo*, realizamos fracionamento sub-celular, como descrito em material e métodos, e pudemos evidenciar a presença desta proteína principalmente na fração nuclear de células A172 e T98G e nas frações nuclear e membranas de células HeLa (Figura 9). Estes resultados corroboram a localização nuclear e peri-nuclear de ARHGAP21.

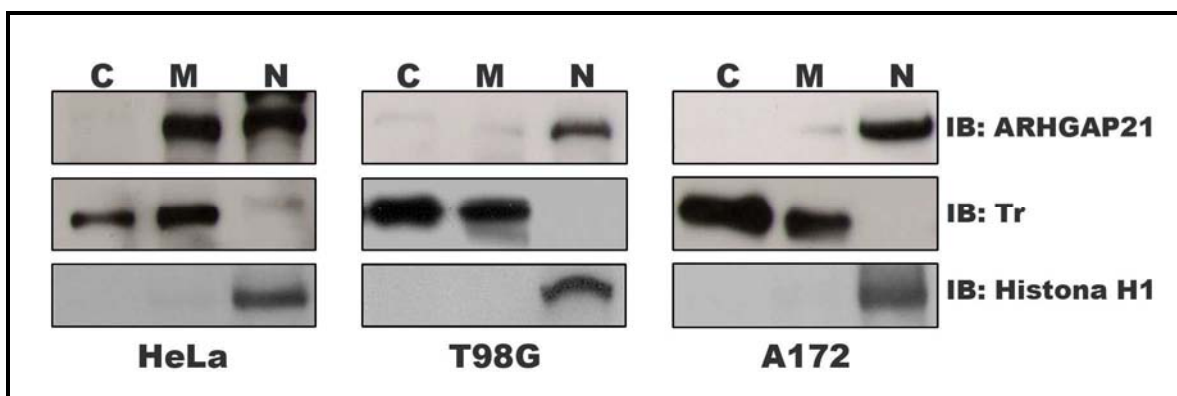
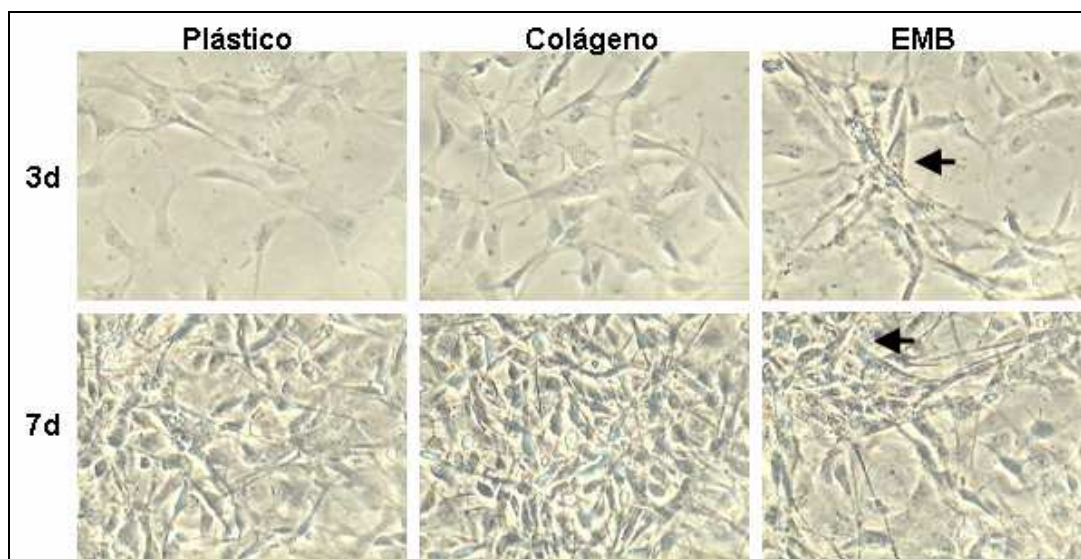


Figura 9: Fracionamento de células HeLa, T98G e A172 e western blotting corroborando a localização nuclear de ARHGAP21. A eficiência do fracionamento foi verificada pela presença do receptor de transferrina (Tr) nas frações citoplasmática e membranar e de Histona H1 na fração nuclear.

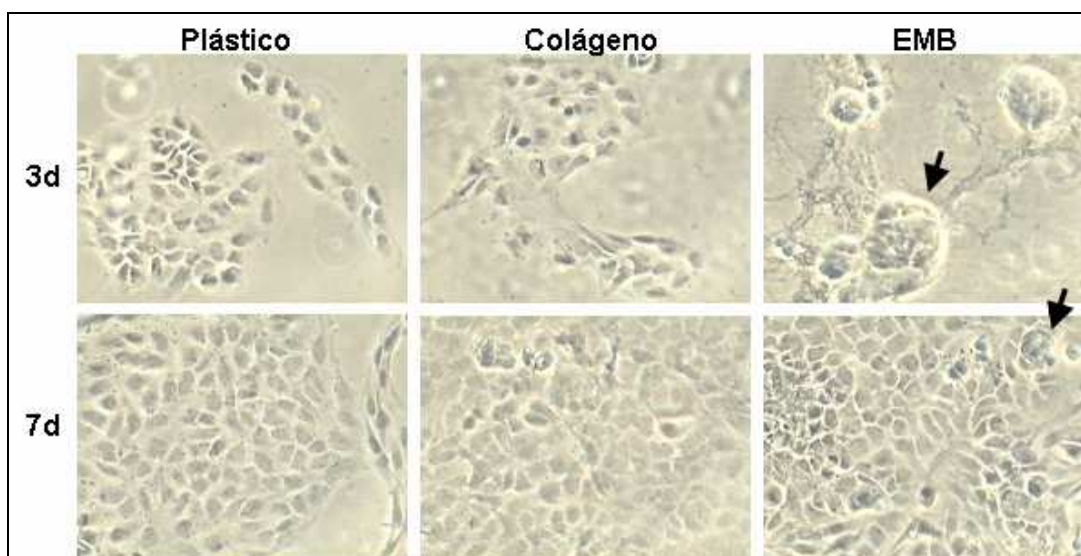
4.2. Cultivo de A172 e T98G em diferentes substratos de matriz extracelular e análise da expressão gênica e protéica de ARHGAP21

As células de glioblastoma humano A172 e T98G foram cultivadas em gel de colágeno tipo I ou em extrato de membrana basal (EMB- Matrigel™ – BD Bioscience) por 3 ou 7 dias com o objetivo de verificar se o gene *ARHGAP21* estaria envolvido no processo invasivo de T98G em extrato de membrana basal, completo após 7 dias de cultivo (NAKAGAWA et al., 1996).

Pudemos notar as diferenças morfológicas entre as duas linhagens (Figura 10): alto grau de polarização de A172 em relação à T98G, que são células de fenótipo epitelíode; grande dificuldade de dispersão das células A172 quando cultivadas sobre EMB (Figura 10A, setas), enquanto que as células T98G formam pontos em que parecem penetrar pelo mesmo substrato (Figura 10B, setas). Estes fenótipos condizem com o que já fora descrito para as duas linhagens (NAKAGAWA et al., 1996).



A



B

Figura 10: Morfologia das linhagens A172 (A) e T98G (B) cultivadas em diferentes substratos por 3 dias ou 7 dias. A172 são células altamente polarizadas e apresentam alteração do padrão de espalhamento na superfície dificultado quando cultivada em EMB (setas). Enquanto T98G, de morfologia epitelióide, apresenta-se bem distribuída em todas as condições e forma pequenos pontos em que parece estar penetrando no substrato (setas), condizendo com sua já relatada capacidade invasiva em membrana basal. As imagens foram adquiridas com objetiva de 20X em microscópio de campo claro Nikon. **EMB** = extrato de membrana basal MatrigelTM (BD – Bioscience).

Com relação à expressão do gene *ARHGAP21* os resultados de PCR em tempo Real (Figura 11) de amostras de RNA de células cultivadas nas diferentes condições nos mostraram que os níveis de expressão gênica não são alterados por fatores da matriz extracelular (MEC).

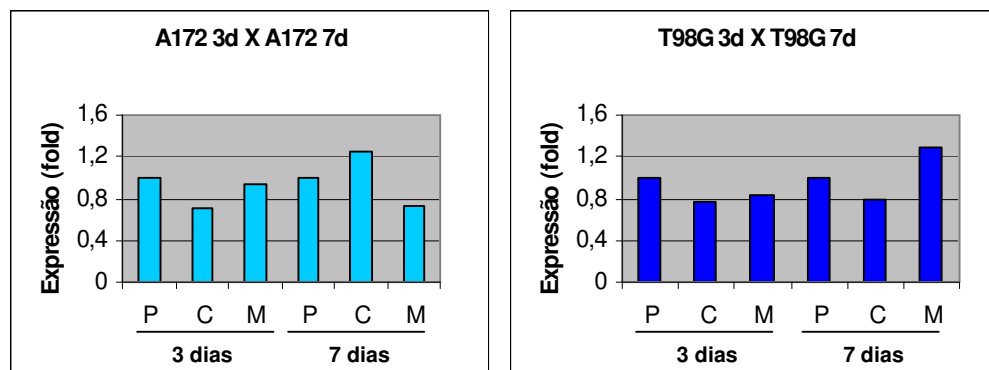


Figura 11: Avaliação da expressão do gene *ARHGAP21* em relação ao controle endógeno β -actina por reação de PCR em tempo real em amostras das linhagens de gliomas humanos A172 e T98G (ATCC) cultivadas em diferentes substratos. As células foram cultivadas por 3 dias ou 7 dias, os RNAs foram extraídos com o reagente Trizol® (Invitrogen), quantificados e 1 μ g foi transcrito reversamente. Legenda: **P** = plástico, **C** = gel de colágeno tipo I e **M** = extrato de membrana basal Matrigel™ (BD).

Apesar dos níveis de RNA de *ARHGAP21* não serem alterados pelo cultivo diferencial, a análise da expressão protéica revelou alteração de *ARHGAP21* de acordo com as condições de cultivo das células, mostrando que o controle da expressão deste gene é pós-transcricional. Ficou evidente também que os níveis de *ARHGAP21* são maiores em células da linhagem A172 do que em células da linhagem T98G cultivadas em plástico e colágeno do tipo I (gráfico de quantificação). Interessantemente, houve aparente depleção da banda de 200 KDa que corresponde à *ARHGAP21* quando as células de ambas as linhagens foram cultivadas em extrato de membrana basal por 3 e 7 dias (Figura 12, setas pretas).

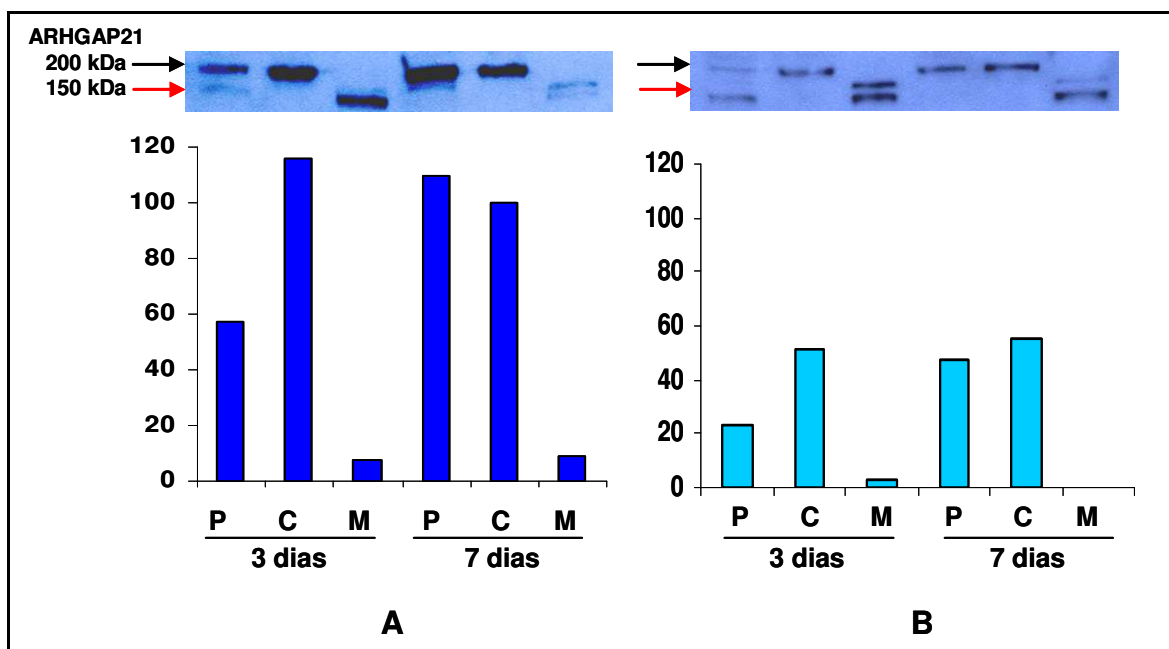


Figura 12: Expressão protéica de ARHGAP21 analisada por Western Blotting de amostras das linhagens de gliomas humanos A172 e T98G (ATCC) cultivadas em diferentes substratos. As células foram cultivadas por 3 dias ou 7 dias, os extratos protéicos foram preparados como descrito em Material e Métodos, quantificados e 100 µg de cada amostra foram fracionadas em gel SDS-PAGE 8%. Após o fracionamento as amostras foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Hybond) e seguiu-se a incubação com um anticorpo primário anti-ARHGAP21 (Bethyl), em seguida com um anticorpo secundário anti-coelho e utilizou-se ECL (GE) para revelar o western. Legenda: P = plástico, C = gel de colágeno tipo I e M = extrato de membrana basal Matrigel™ (BD Bioscience). Setas vermelhas = possível isoforma de ARHGAP21. **A** = extratos de células A172; **B** = extratos de células T98G.

Suspeitamos que possa não ter ocorrido a real depleção de nossa proteína, mas sim que o cultivo em extrato de membrana basal estimule alguma via que acione processos de clivagem de nossa molécula, de modo que a proteína resultante nesta situação apresente menor massa molecular (Figura 12, setas vermelhas).

Corroborando a hipótese acima, experimentos de imunofluorescência de células A172 e T98G cultivadas em lamínulas recobertas com Matrigel mostraram que a

proteína ARHGAP21 continua sendo expressa nestas células (Figura 13). Isso fez-nos fundamentar a hipótese de uma possível alteração pós-traducional de ARHGAP21, que resultaria em uma isoforma de menor peso molecular ou em uma isoforma de maior peso molecular (250 KDa) pela adição moléculas tais como proteínas da família das ubiquitinas.

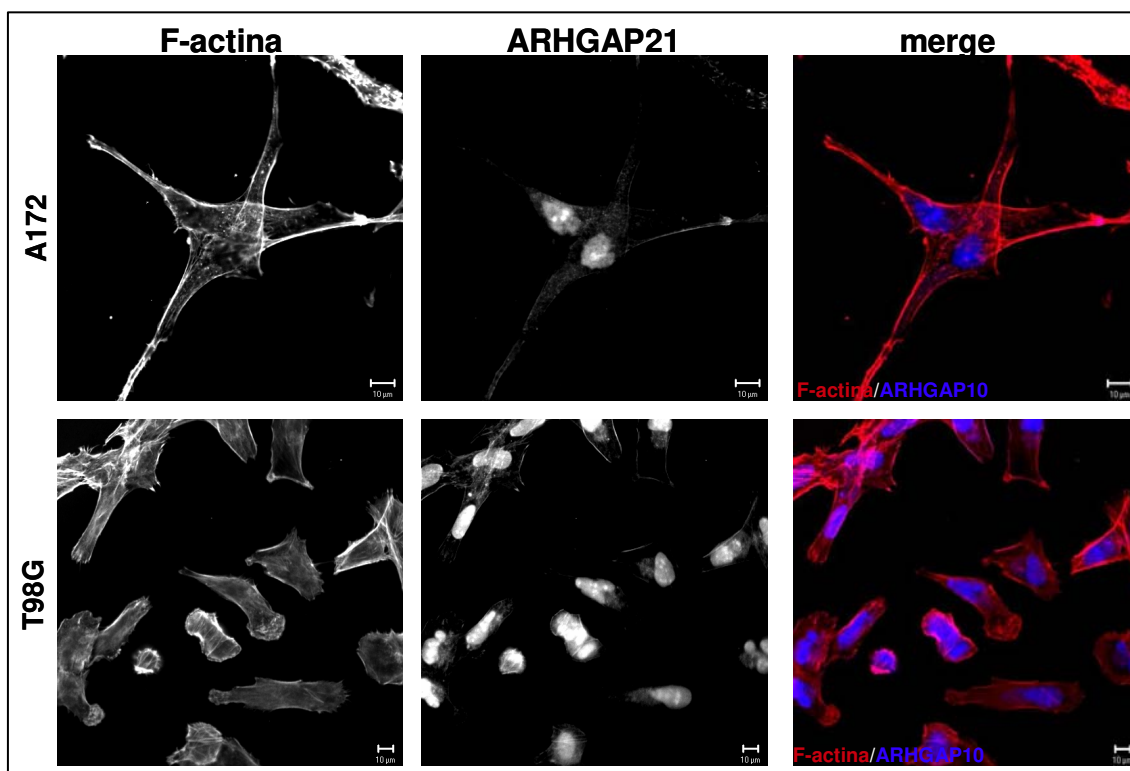


Figura 13: ARHGAP21 continua sendo expressa no núcleo de células A172 e T98G cultivadas sobre EMB Matrigel™ (BD - Bioscience). Imunofluorescência de células cultivadas por 7 dias sobre lâminulas recobertas com 30 µL de 5 mg/mL EMB. As lâminas foram analisadas por escaneamento a laser em um LSM-510 (Zeiss) montado sobre um microscópio Axioplan (Zeiss), utilizando a objetiva de 40X de imersão em óleo.

A investigação da ocorrência de modificações pós-traducionais da proteína ARHGAP21 faz-se necessária frente aos resultados apresentados acima.

4.3. As bandas protéicas de pesos moleculares 160, 200 e 250 KDa são isoformas de ARHGAP21

Com a colaboração do Prof. Dr. José Camillo Novello e de seu aluno de doutorado Daniel Martins, conseguimos realizar a espectrometria de massas das bandas de 160, 200 e 250 KDa, possíveis isoformas da proteína ARHGAP21.

Extratos de células A172 e T98G foram fracionados em 8% SDS-PAGE de uma dimensão, o gel foi corado em solução de coomassie e as bandas de interesse foram extraídas do gel e submetidas a um protocolo de lavagem e tripsinização das proteínas contidas em cada banda. Ao final da preparação, os peptídeos foram eluídos diretamente para uma placa de MALDI para que as massas dos peptídeos fossem medidas no Espectrômetro de Massas Applied Biosystems Voyager DE-PRO MALDI-TOF (“Matrix Assorpted Laser Desorption Ionization - Time of Flight”).

Foram realizados dois experimentos independentes nos quais peptídeos de ARHGAP21 apareceram nos três fragmentos digeridos (Figura 14 e Tabela 3). Portanto, as três bandas reconhecidas freqüentemente pelo anticorpo anti-ARHGAP21 são isoformas dessa proteína. Nossa hipótese é de que a forma de 250 KDa seja resultante de alguma modificação pós-traducional (tal como fosforilação, glicosilação ou sumoilação) que resultaria no aumento do peso predito de 217 KDa. A banda que estamos chamando de 200 KDa seria a forma predita já que a fidelidade dos marcadores de peso molecular utilizados em gel é baixa, e a isoforma de 160 KDa seria, possivelmente, resultante de uma quebra da proteína. Todas estas hipóteses serão testadas futuramente.

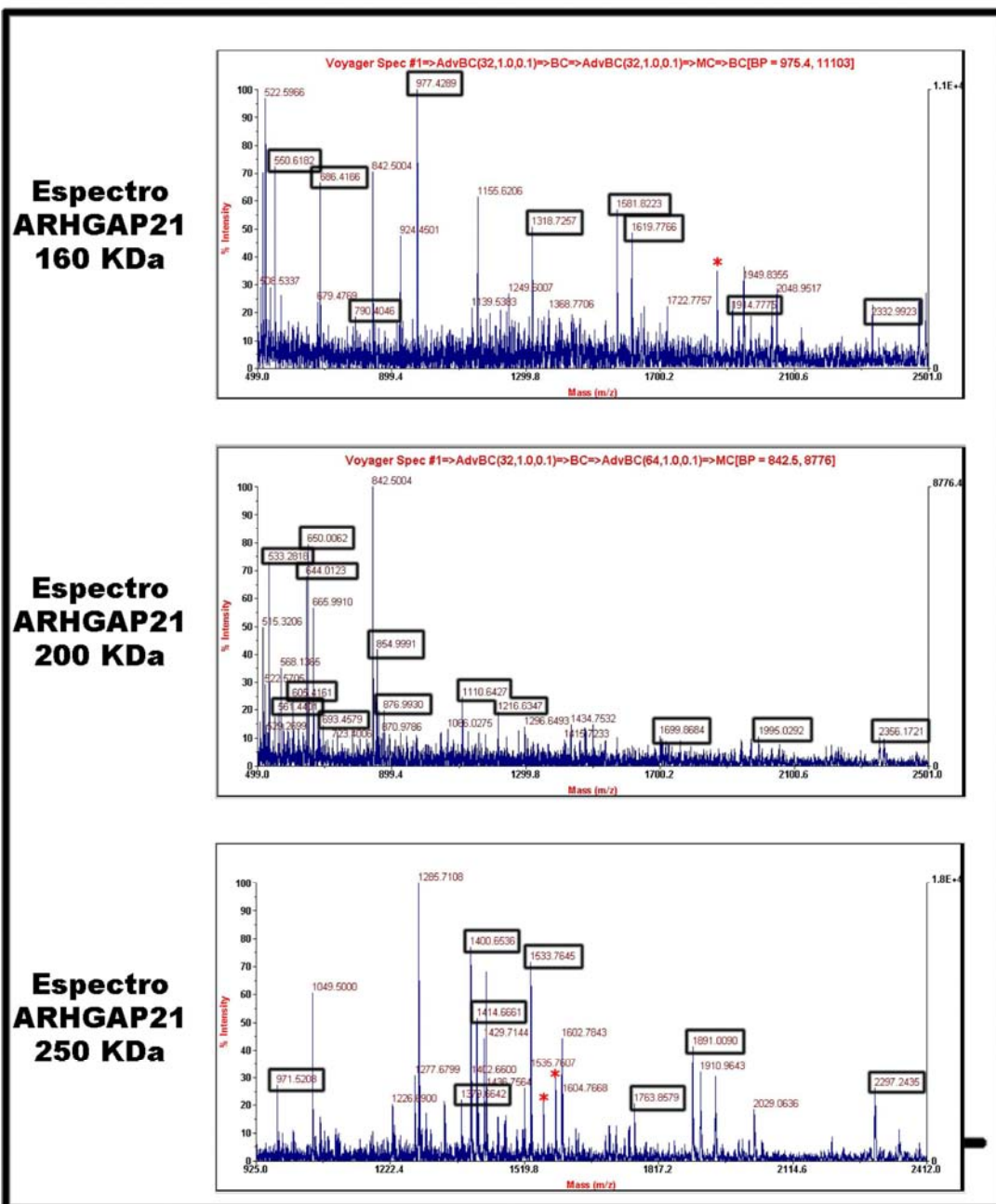


Figura 14: Identificação de proteínas contidas nas bandas de peso molecular 160, 200 e 250 KDa por espectrometria de massas. A, Os gráficos representam MALDI-MS *fingerprintings* dos peptídeos resultantes da digestão trípica das proteínas contidas no gel. Os picos circundados representam massas de peptídeos que pertencem a ARHGAP21.

Tabela 3: Massas dos peptídeos gerados após a digestão e MALDI-MS das proteínas contidas nas bandas de 160, 200 e 250 Kda que pertencem à ARHGAP21.

Banda 160 KDa

<i>Massa predita</i>	<i>Massa Observada</i>	<i>Posição</i>	<i>Clivagens perdidas</i>	<i>Sequencia do peptideo</i>
549,2515	550,6182	1200-1204	0	GESEK
687,4372	686,4166	1245-1249	2	SIRRR
791,3893	790,4046	909-915	0	ESETLGR
978,4374	977,4289	6 15	0	TGLSEGDGDK
1318,7841	1318,7257	1101-1111	2	LFRGKLQEVTK
1582,7707	1581,8223	1159-1173	2	FKSDSGSLGDAKNEK
1620,8261	1619,7766	446-459	1	SVSQRLEDSVLMK
1870,9069	1869,8875	158-173	0	DEDILQVAYSQDAYLK
1915,9845	1914,7775	270-286	1	VDLLSNRNNHTGPSHR
2332,1779	2332,9923	1190-1210	2	STGSLLTPTRGESEKQEPTWK

Banda 200 KDa

<i>Massa predita</i>	<i>Massa Observada</i>	<i>Posição</i>	<i>Clivagens perdidas</i>	<i>Sequencia do peptideo</i>
532,2548	533,2818	1292-1295	0	MEPR
561,2991	561,4401	24-28	1	NKDGK
606,2842	605,4161	1475-1479	0	ENSTR
645,3566	644,0123	1170-1174	0	LVEER
649,2787	650,0062	1101-1105	0	EESER
692,3396	693,4579	785-789	1	MEERK
854,4777	854,9991	399-405	1	RLHIGCR
877,4261	876,993	1282-1289	0	TVAENSEK
1111,5630	1110,6427	302-311	0	YGVSEQTSLK
1217,6848	1216,6347	1739-1750	1	GKSTGSLLTPTR
1699,9741	1699,8684	575-590	2	GVGSVSQFKIPDLK
1994,9890	1995,0292	1931-1950	1	NASSAANAQPHKLSETPGSK
2356,1826	2356,1721	1774-1795	3	APADDMFVGVGNHKVNAETAK RK

Banda 250 KDa

<i>Massa predita</i>	<i>Massa Observada</i>	<i>Posição</i>	<i>Clivagens perdidas</i>	<i>Sequencia do peptideo</i>
968,5887	971,5208	898-906	1	HVSSLKGKIK
1379,7430	1379,6642	966-976	2	GHSLYLYKDKR
1400,8220	1400,6536	1468-1479	2	QKIIIAKENSTR
1412,7492	1414,6661	229-241	0	QQTSTPVLTPQGR
1534,8774	1533,7645	1124-1136	3	KGIPSIMRKTFEK
1562,8020	1561,8705 *	1741-1755	1	STGSLLTPTRGESEK
1588,8693	1588,7524 *	890-903	2	EDAKLSFKHVSSLK
1764,8722	1763,8579	904-920	2	GIKIADSQKSSSEDSGSR
1890,8351	1891,009	878-893	2	SKSYDEGLDDYREDAK
2297,2360	2297,2435	1401-1420	3	DQYSRELLVSSIFAAASRKR

4.4. ARHGAP21 sofre sumoilação

As proteínas chamadas SUMO (SUMO-1, SUMO-2 e SUMO-3; do inglês “Small Ubiquitin-like Modifiers”) pertencem à família das proteínas similares à ubiquitina e se ligam covalentemente e desligam-se de proteínas substrato. A associação a SUMO-1 é a mais estudada até o presente e parece alterar a localização intra-celular e a estabilidade de proteínas. Enquanto que a modificação por SUMO-2/-3 parece estar relacionada ao estresse celular.

Interessou-nos investigar se a proteína ARHGAP21 seria sumoilada, pois testes de de-fosforilação *in vitro*, utilizando fosfatase alcalina, evidenciaram não ser fosforilação o evento responsável pelo aumento de peso molecular (resultados não mostrados) e, também outras modificações pós-traducionais possíveis, tais como glicosilação, claramente não ocorrem (ausência de arraste de bandas entre as bandas de 200 e 250 kDa).

Logo, na tentativa de desvendar qual modificação pós-traducional sofreria a proteína ARHGAP21 que pudesse explicar a isoforma de 250 kDa submetemos a seqüência de aminoácidos desta proteína ao programa SUMOsp. Os resultados estão apresentados na figura 15, que corresponde à tela de saída do programa, e demonstram a existência de cinco sítios consenso e um sítio não-consenso passíveis de sofrer sumoilação.

Predicted sites				
Position	Peptide	Score	Cutoff	Type
158	VMPKDED	0,682	0,17	Type: Ψ-K-X-E
1089	LOAKSEP	1,839	0,17	Type: Ψ-K-X-E
1101	HSPKEES	0,512	0,17	Type: Ψ-K-X-E
1443	VFFKKEK	0,995	0,17	Type: Ψ-K-X-E
1459	EESKKEE	3,75	3,33	Type: Non-consensus
1722	QDAKNEK	0,773	0,17	Type: Ψ-K-X-E

Enter sequence(s) in FASTA format

MMATRRRTGLSEDDQDLKACEVSKNDGKEQSETVLSSEDTFSWPPKTYTLKRTSQGFGLRHFIY
PPESAIOFSYKDEENGNRQKORNRLEPMDTIFKQVKEGGPAEAGLCTGDRHKVNGESVIGKTYSGV
ALIQNSDITLLESMVPKDEDILOVLOFTKDVLTALYSQDAYLKGNENYSGNARNIPEPPICYPVLP
PSAMAQPVESPPDSSLSKQQTSTPVLTPQRAYRMEIOVPPSPDTVAKSNTAVCVCNESVRTVWPSEK
VOLLNRRNHHTQPSHRTTEEVRYGVSEQTSKTVSRITSPPLSIPTHLHQPAGSRSEPSGILLKSGN
YSGHSDGSSSRQAVEAPSVSVNHYSPPNSHSHQIDWKNYKTYKEYIDNRRLLHIGCRTIQRERLDSRAASQ
STTDYNGVWPNRTLLQGRRRSTSHDRVPSVQIRQSVSGERLEDSVLMKYCPRASQAGALTSPSVSFSN
HRTSRWDYIEGQDTELENNVSGTPIPSNGEKKQTYKWSGFTQDDRRGICERPRQGEIHKSFGRGNSFTV
AFSVVNSDNRMSGRGVSGVSGFKKPPDLKTLGNSRNFQTTGMSLPRGISQDRSPLWKVRSNLSKAFS

Threshold

☒ High ☐ Medium ☐ Low ☐ All

Console

Example Clear Submit

Figura 15: Predição de sítios de sumoilação na proteína ARHGAP21. A seqüência de aminoácidos de ARHGAP21 foi submetida à ferramenta de predição SUMOsp disponível no sítio (<http://bioinformatics.lcd-ustc.org/sumosp/>) (Xue et al., 2006 e Ren et al., submetido).

Para corroborar a predição computacional de sítios de sumoilação, realizamos ensaios de imunoprecipitação utilizando anticorpos anti-SUMO-1 e anti-SUMO-2/-3. Confirmamos que a proteína ARHGAP21 co-imunoprecipita com o anticorpo que reconhece as proteínas SUMO-2/-3 somente (Figura 16), o que permitiria o aumento de peso molecular de 217 para > 250 kDa.

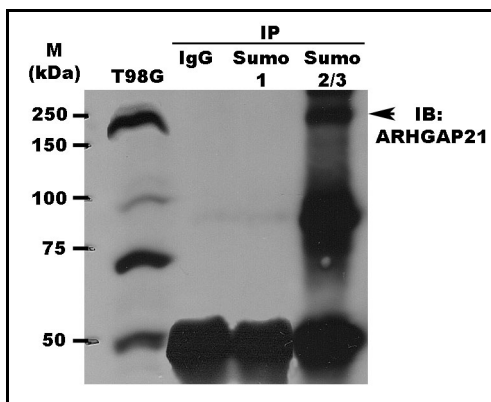


Figura 16: ARHGAP21 sofre modificação por SUMO-2/-3. Co-imunoprecipitação da proteína ARHGAP21 com SUMO-2/-3. Extratos celulares de T98G coletados em condições denaturantes foram imunoprecipitados com IgG normal de coelho (controle) e anticorpos anti-SUMO-1 e anti-SUMO-2/-3. Os extratos foram fracionados em gel de poliacrilamida 8%, transferidos para membrana e esta foi incubada com anticorpo anti-ARHGAP21. Uma banda de ARHGAP21 de peso molecular aproximado 200 kDa co-imunoprecipitou especificamente com anti-SUMO-2/-3. IgG = imunoglobulina normal de coelho; IP = imunoprecipitação; IB = imunoblot; M = padrão de peso molecular.

4.5. Verificação do envolvimento de ARHGAP21 na via de integrinas

O similar padrão de expressão de ARHGAP21 em A172 e T98G cultivadas em Matrigel por 3 ou 7 dias levou-nos a descartar a hipótese de envolvimento de nossa proteína no processo invasivo de T98G, que é completo apenas após 7 dias segundo Nakagawa et al., 1996. Porém, a depleção da banda de 200 kDa de ARHGAP21 após cultivo das linhagens em EMB indicou um possível papel desta proteína na sinalização entre as células e a matriz extracelular. Dessa forma, fomos investigar se ARHGAP21 estaria associando-se a proteínas da via das integrinas, que são os principais receptores envolvidos na transdução de sinais extracelulares para o interior celular

(BRAKEBUSCH et al., 2002) e que poderiam ser responsáveis pela regulação dos níveis de ARHGAP21.

Por *western blotting* verificamos os níveis da quinase de adesão focal (FAK) nas duas linhagens cultivadas como já descrito no item 4.2. De maneira geral, os níveis de FAK parecem maiores na linhagem T98G do que em A172 (Figura 17). Em tumores humanos o aumento da expressão de FAK está relacionado com a progressão a fenótipos altamente malignos e metastáticos, e isto é condizente com o caráter invasivo de T98G, diferentemente de A172 (SCHLAEPFER e MITRA, 2004).

Foi realizado experimento de imunoprecipitação para verificar uma possível interação entre ARHGAP21 e FAK em células de glioblastoma, devido aos relatos da interação de FAK com outras RhoGAPs e já que encontramos previamente a associação entre estas proteínas em cardiomiócitos de ratos (BORGES et al., 2008). A interação entre ARHGAP21 e FAK parece não ocorrer na linhagem A172 (resultados não apresentados). Suspeitamos que isso se deva à baixa expressão de FAK nesta linhagem e, portanto, fomos investigar se ARHGAP21 e FAK poderiam interagir em outras duas linhagens de glioblastoma (T98G e U138MG).



Figura 17: Detecção da quinase de adesão focal (FAK) nas linhagens A172 e T98G cultivadas em diferentes substratos. As células foram cultivadas por 3 dias ou 7 dias, os extratos protéicos foram preparados, quantificados e 100 µg de cada amostra foram fracionadas em gel SDS-PAGE 8%. Após o fracionamento as amostras foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Hybond) e seguiu-se a incubação com um anticorpo anti-FAK, em seguida com um anticorpo secundário anti-coelho e utilizou-se ECL (Amershan) para revelar o western. Legenda: **P** = plástico, **C** = gel de colágeno tipo I e **M** = extrato de membrana basal Matrigel™ (BD - Biosciences).

Em U138MG e T98G foi verificada a interação entre ARHGAP21 e FAK por ensaio de co-imunoprecipitação (Figura 18) e por reação de imunofluorescência em T98G (Figura 17).

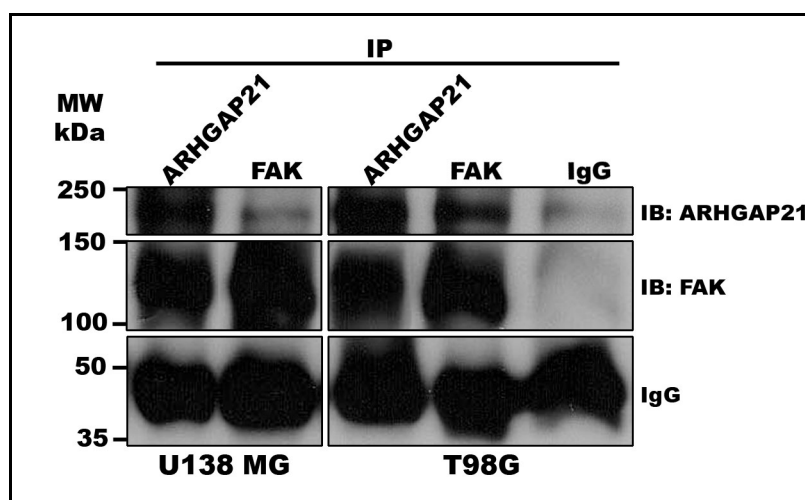


Figura 18: ARHGAP21 interage com a quinase de adesão focal (FAK) nas linhagens de glioblastoma U138MG e T98G. Extratos de células coletados em tampão de NP-40 foram imunoprecipitados com anticorpos anti-ARHGAP21, anti-FAK ou com IgG normal de coelho (controle negativo). As proteínas co-imunoprecipitadas foram analisadas por *western blotting* com os anticorpos indicados na figura. IP = imunoprecipitação, IgG = imunoglobulina normal de coelho, IB = *immunoblot*.

Foi evidenciado que estas duas proteínas interagem na porção peri-nuclear (quarto quadro da Figura 19, indicando máxima região de co-localização em branco, de acordo com a ferramenta Colocalization Finder – ImageJ - NIH). Os coeficientes de Correlação de Pearson (Rr) e de sobreposição (R) estão mostrados na figura e seus valores corroboram a interação entre ARHGAP21 e FAK.

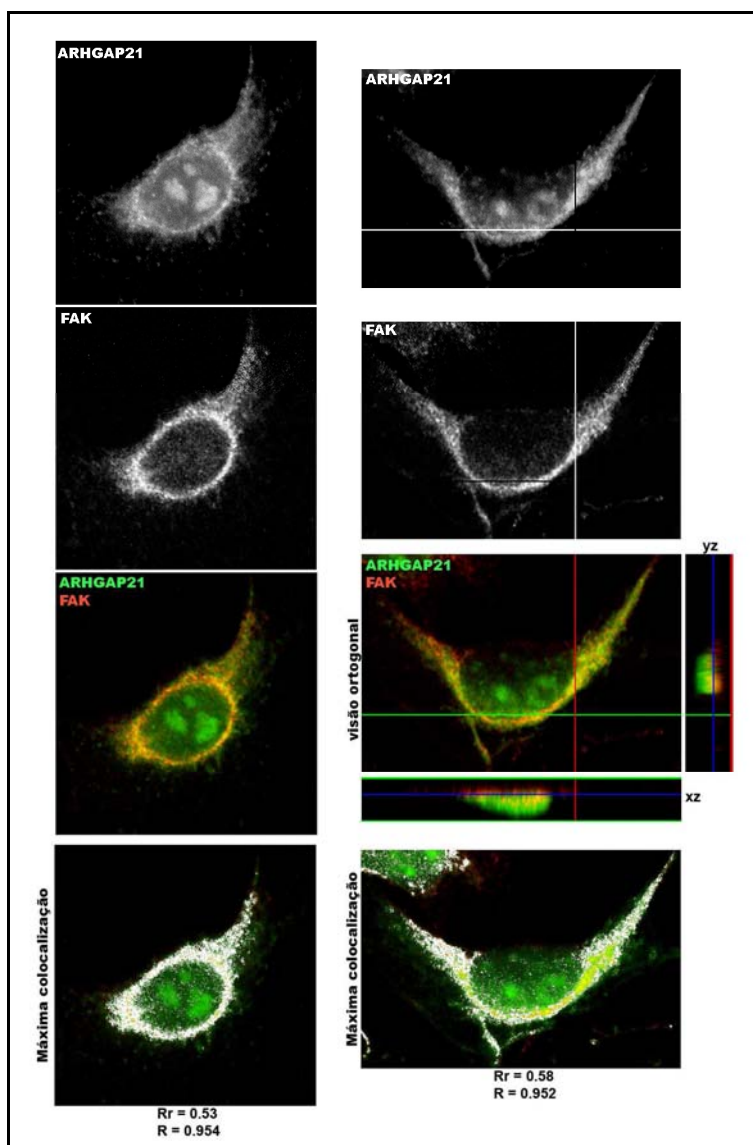


Figura 19: Imunofluorescência de células T98G utilizando anticorpos anti-ARHGAP21 (reconhecido pelo secundário AlexaFluor488, verde) e anti-FAK (reconhecido pelo secundário anti-camundongo AlexaFluor555, vermelho), mostrando que a interação entre ARHGAP21 e FAK ocorre na região peri-nuclear. O quarto quadro mostra em branco a região máxima de co-localização entre as proteínas obtida pelo programa *Colocalization Finder* do ImageJ (NIH). Imagens de confocal foram capturadas em Microscópio Zeis LSM510, utilizando a objetiva de imersão em água, aumento de 40x. Rr = coef. de correlação de Pearson; R = coef. de sobreposição.

A proteína FAK é uma quinase composta por três principais regiões: (1) uma região N-terminal na qual reside o domínio FERM, responsável pela interação de FAK com vários receptores (ex. EGFR, PDGFR) e com proteínas adaptadoras tais como ezrina, que facilita o aumento da ativação de FAK; (2) um domínio quinase central e (3) uma região C-terminal onde se localiza o domínio FAT, que promove a co-localização de FAK com integrinas nos contatos focais (MITRA et al., 2005).

Com o intuito de corroborar os resultados de co-imunoprecipitação e imunofluorescência e, ainda, na tentativa de verificar com qual porção de FAK se dá a interação com ARHGAP21 realizamos ensaios de *pulldown* utilizando as construções representadas na figura 20A, que correspondem às três porções de FAK. A eficiente produção das proteínas de fusão a GST foram verificadas em gel de SDS-poliacrilamida 8%, corado com Coomassie Brilliant Blue (Figura 20 B, colunas das amostras “P”).

O ensaio de pulldown mostrou que a interação de ARHGAP21 é específica com a região C-terminal da proteína FAK (Figura 20C), região esta que apresenta o domínio FAT e os resíduos de tirosina T861 e T925. Como controle da eficácia das construções expressas, realizamos incubação da mesma membrana com anticorpo anti-Src, cuja interação com a tirosina 397 (presente, neste caso, na construção “Ferm”) de FAK já fora descrita.

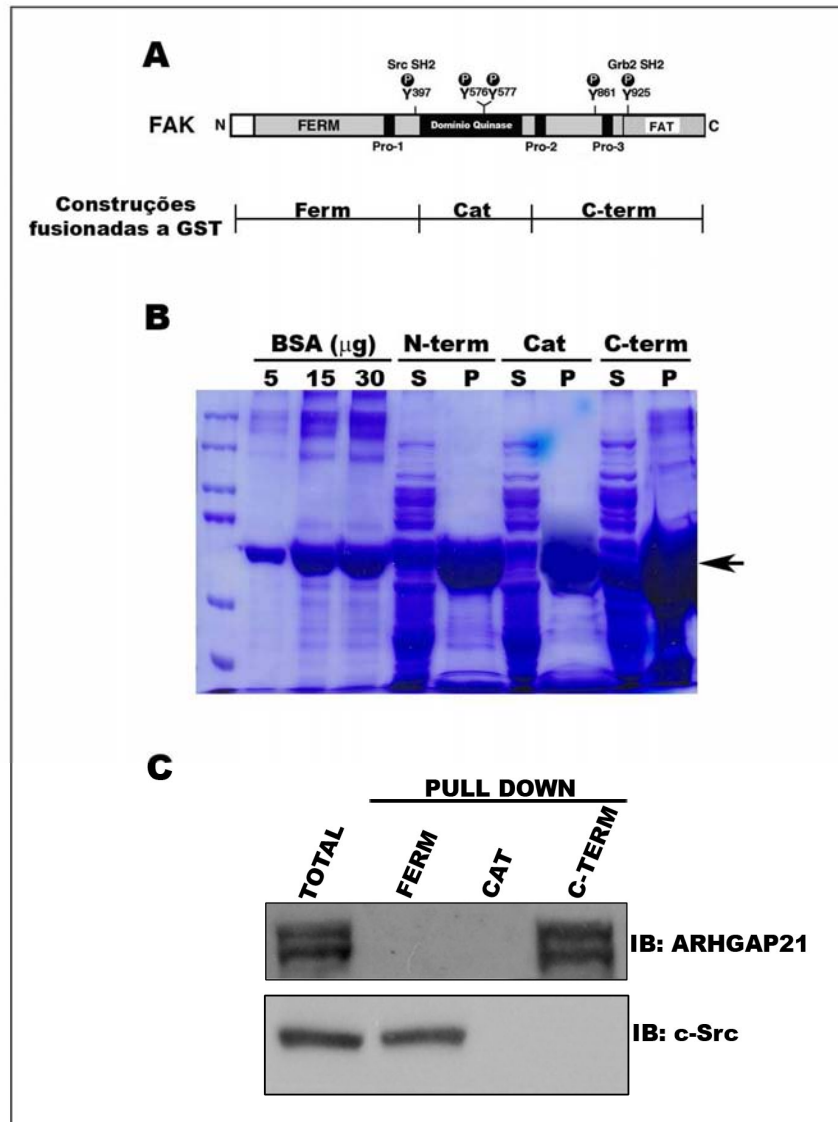


Figura 20: ARHGAP21 interage especificamente com a porção C-terminal de FAK. A, Esquema da estrutura dos domínios da proteína FAK, mostrando as porções clonadas em vetor de expressão em bactérias, pGEX. B, Gel de poli-acrilamida 8% corado com Coomassie, evidenciando a produção eficiente dos domínios Ferm, Cat e C-term de FAK fusionados à GST (colunas “P”, altura da seta preta). C, ensaio de *pulldown* utilizando as construções de FAK para co-precipitar ARHGAP21 em extratos de células T98G, evidenciando a interação específica com a porção C-terminal. Legenda: S = extrato bacteriano sonificado, P = extrato bacteriano sonificado e purificado com Glutathione Sepharose® (GE).

Além do mapeamento da região de FAK em que ARHGAP21 se liga nos interessava mapear qual seria a região de ARHGAP21 responsável pela interação. Utilizamos as construções das regiões N e C-terminais de ARHGAP21 (esquema Figura 21A) clonadas em vetor de expressão em células de mamíferos, pcDNA 3-V5TM (Invitrogen) para transfectar células T98G. Foram selecionados diversos clones transfectados estavelmente pela utilização do antibiótico neomicina (G418). Dois clones representativos obtidos pela transfecção de cada construção tiveram suas proteínas extraídas e realizamos ensaio de co-imunoprecipitação. Como as construções apresentam o alvo de V5, utilizamos anticorpo monoclonal anti-V5 para imunoprecipitar e a incubação das membranas com anticorpo anti-FAK possibilitou a comprovação da interação entre ambas as porções de ARHGAP21 e a proteína FAK endógena (Figura 21B). Isto talvez indique que em sua conformação nativa, ARHGAP21 deve ser uma proteína de estrutura globular.

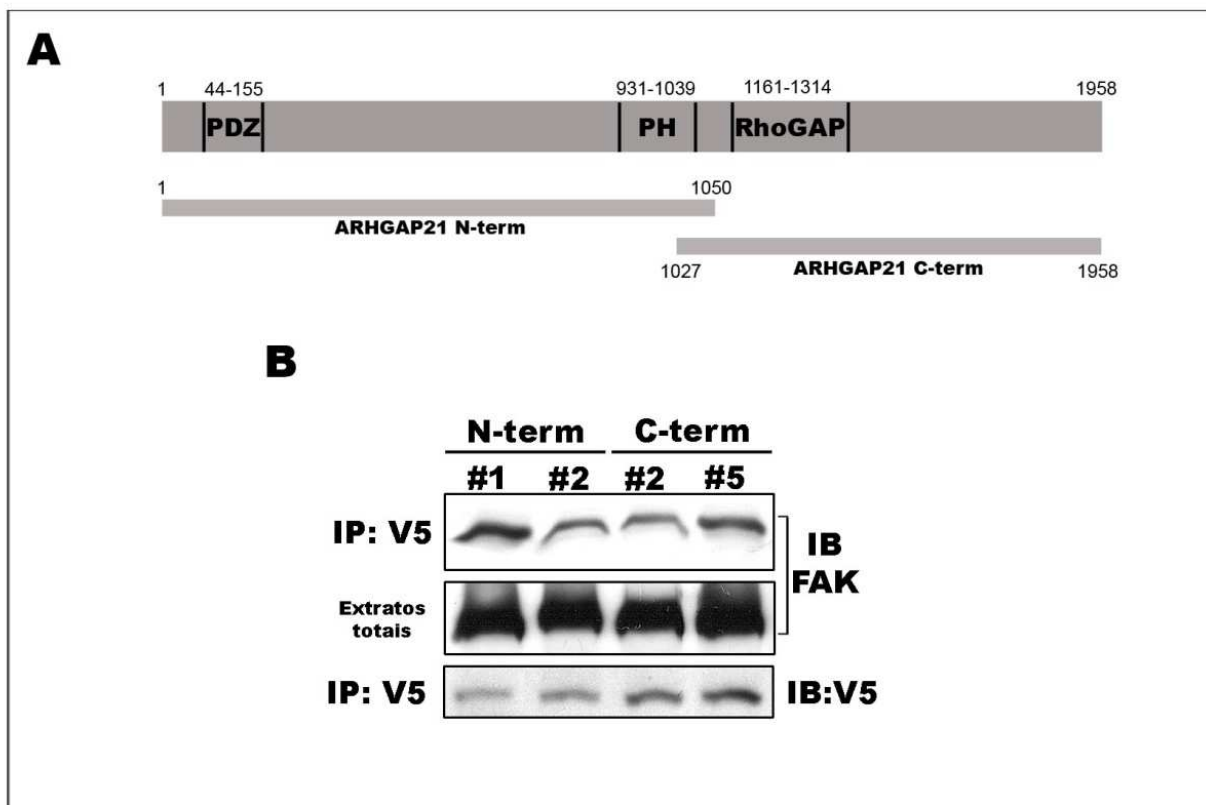


Figura 21: As porções N e C-terminais de ARHGAP21 interagem com FAK. A, Distribuição dos domínios PDZ, PH e RhoGAP na sequência de ARHGAP21 e respectivas porções N e C-terminais que foram expressas em células T98G. B, Imunoprecipitação com anticorpo anti-V5 de extratos protéicos de dois clones transfectados com fragmentos amino e carboxi terminais conforme indicado em A. IP = imunoprecipitação, IB: *immunoblot*.

4.6. Inibição da expressão de ARHGAP21 por shRNAi

Os resultados apresentados a seguir resumam os resultados obtidos em três transfecções estáveis independentemente realizadas em células T98G, com duas sequências específicas para a inibição do gene *ARHGAP21* humano clonadas no vetor pSilencer™ da empresa Ambion^{Inc} (Sh1 e sh2), como apresentado em Material e Métodos. Foi utilizada uma sequência sem homologia aos genes humanos como controle negativo (NC). Vários clones foram selecionados (nomeados “#”). A depleção do gene *ARHGAP21* obtida pela transfecção das duas sequências inibitórias em

relação ao controle negativo foi maior que 50% (Figura 22 A). Em nível protéico a inibição foi praticamente total em quatro clones selecionados (Figura 22 B). Como controle do total de proteína aplicado em cada poço do gel realizamos *imunoblot* com anticorpo anti- β -actina, e como controle da especificidade das sequências inibitórias (sh1 e sh2) realizamos *imunoblot* com anticorpo anti- α -catenina, já que esta proteína interage com ARHGAP21 (SOUSA et al., 2005).

A inibição de ARHGAP21 nas células T98G (células ARHGAP21 KD) resulta em alterações morfológicas similares à transição epitelial-mesenquimal (Figura 23 A), e o citoesqueleto de actina marcado com faloidina-TRITC mostrou ter suas fibras de actina-cortical desarranjadas (Figura 23 B e C), evidenciando acúmulo de actina na região peri-nuclear e a formação de protrusões membranares (Figura 23 B e C, áreas em maior aumento).

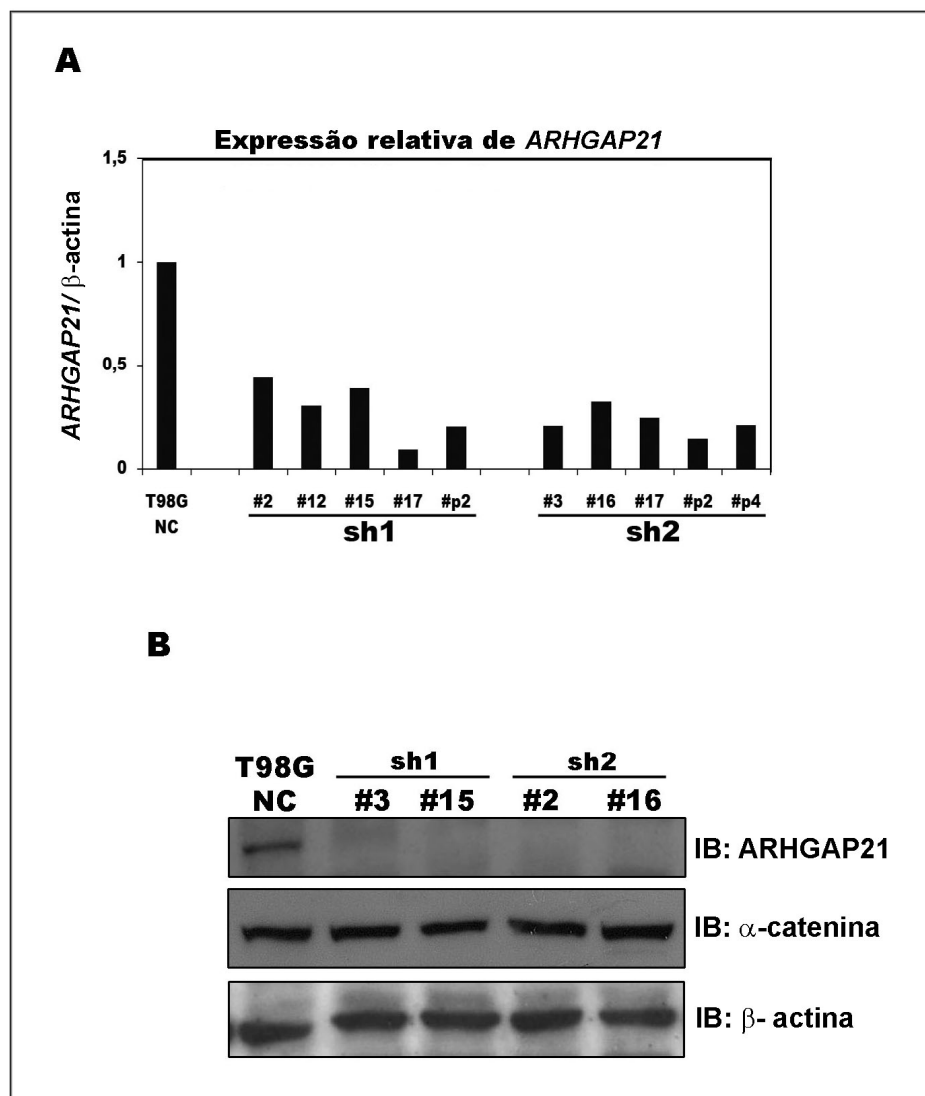


Figura 22: Inibição da Expressão de ARHGAP21. A, análise por PCR em tempo real da inibição do gene *ARHGAP21*. Vários clones obtidos da transfecção com as duas sequências inibitórias (sh1 e sh2) e grau de inibição maior ou igual a 50% são mostrados. B, Análise da redução da expressão protéica de ARHGAP21 em dois clones obtidos da transfecção usando cada uma das sequências inibitórias. A normalização da quantidade de proteína aplicada foi feita pela análise da expressão da proteína β-actina, e a confirmação da inibição específica de ARHGAP21 pôde ser evidenciada pela não depleção de uma proteína associada a ela, α-catenina.

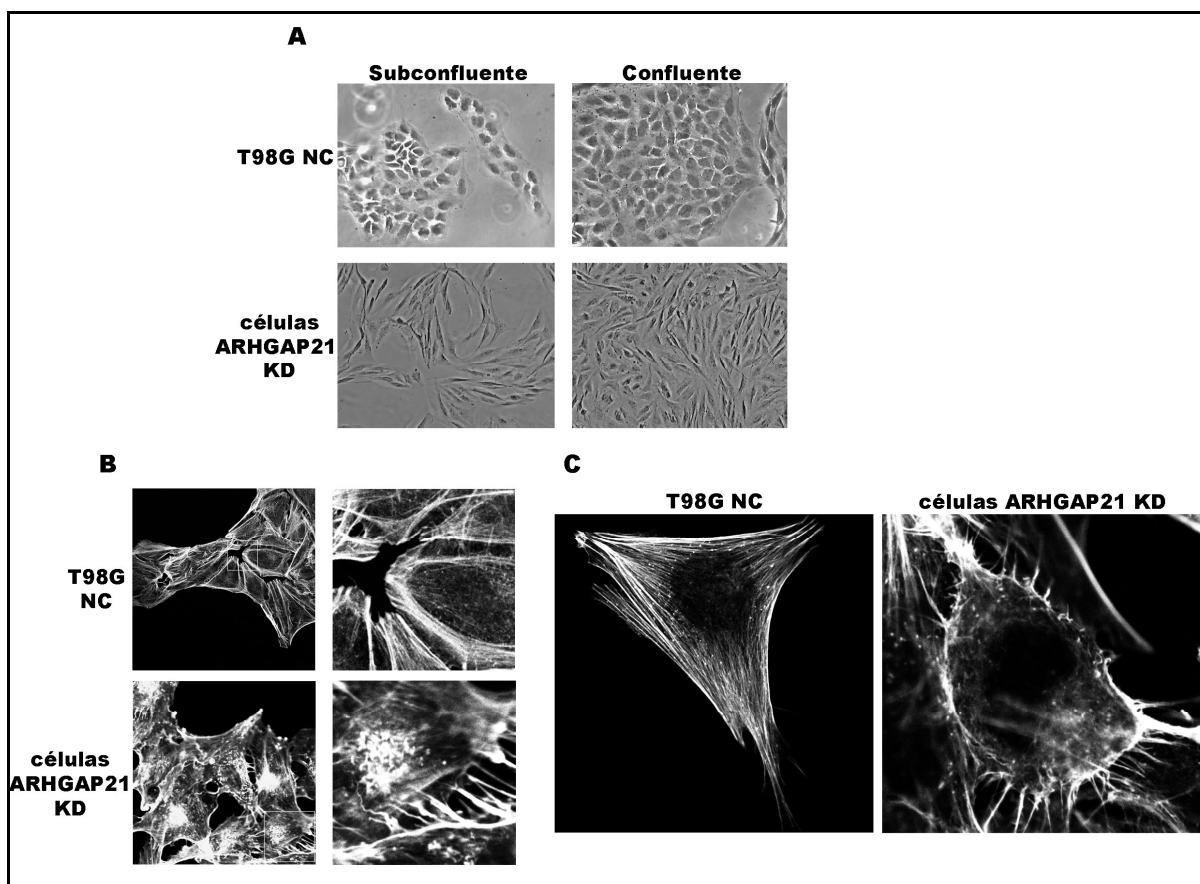


Figura 23: Inibição da Expressão de ARHGAP21 resulta em alterações morfológicas e rearranjo do citoesqueleto de actina. A, Micrografias de células T98G NC (controle) e T98G nas quais ARHGAP21 fora inibida (KD), evidenciando as alterações morfológicas de células com padrão epitelióide para fibroblastóide (aumento 20x). B e C, Imagens de microscopia confocal mostrando o citoesqueleto de actina marcado com faloidina-TRITC (Sigma) evidenciando diferente padrão de organização entre células T98G NC e T98G KD.

4.7. Investigação sobre os efeitos da depleção de ARHGAP21

FAK apresenta uma série de sítios de fosforilação em resíduos de tirosina (ex. T397, T576/577, T861e T925). Dentre estes sítios os que mais nos interessaram investigar foram as tirosinas 397 e 925. O sítio 397 é o primeiro sítio a ser fosforilado e este evento promove o recrutamento da proteína c-Src. c-Src, por sua vez, fosforilará os demais sítios de tirosina de FAK levando à total ativação da molécula. Já a tirosina 925 nos interessou por estar localizada na porção C-terminal de FAK, que é a porção de interação com ARHGAP21. *Imunoblot* dos extratos dos clones de T98G com anticorpos anti-c-Src fosforilada na tirosina 418 e anti-FAK fosforilada nos resíduos de tirosina 397 e 925, demonstraram que, células nas quais ARHGAP21 fora depletada, c-Src e FAK apresentaram aumento dos níveis de fosforilação, quando comparadas com as células controle (NC) (Figura 24A). Estas alterações podem ter ocorrido devido ao aumento da fosforilação do sítio 397, que aumenta a fosforilação de c-Src, que então fosforila os demais resíduos de FAK, incluindo a tirosina 925.

Também foi examinado o padrão de fosforilação da proteína p130^{CAS}, que atua à jusante de FAK, nos clones em que ARHGAP21 fora depletada. Esta avaliação foi realizada através de imunoprecipitação dos extratos protéicos com anticorpo anti-p130^{CAS}, seguido de *imunoblot* com anticorpo anti-tirosina fosforilada (P-Tyr). A quantidade de p130^{CAS} fosforilada foi normalizada em relação ao total de p130^{CAS} precipitado pelo anticorpo e a quantidade de proteína aplicada em cada poço foi controlada pela quantidade de imunoglobulinas (IgGs). Foi evidenciado um aumento da fosforilação de p130^{CAS} da ordem de duas a quatro vezes nas células em que ARHGAP21 fora depletada (Figura 24 B), indicando que vias de sinalização de migração celular à jusante de FAK estão mais ativas devido à depleção de ARHGAP21.

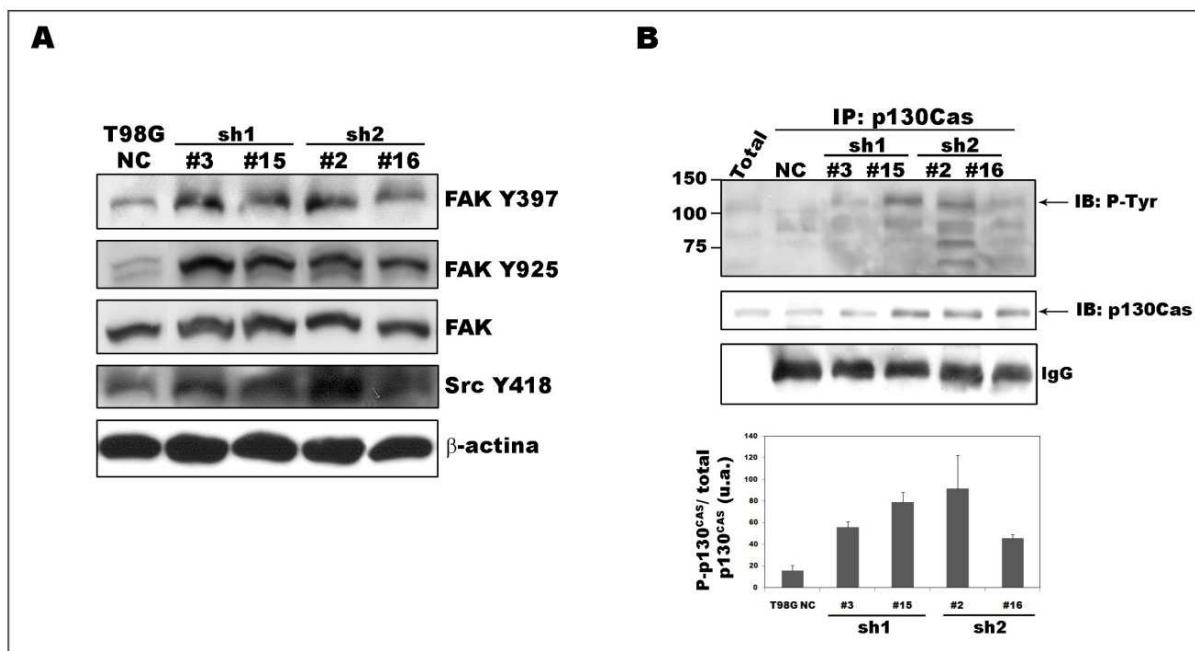


Figura 24: Depleção de ARHGAP21 aumenta os estados de fosforilação de FAK e Src e do efector à jusante p130^{CAS}. A, *Imunoblot* de T98G NC e quatro clones selecionados nos quais ARHGAP21 fora depletada, utilizando os anticorpos anti-P-FAK Y397, anti-P-FAK Y925 e anti-P-Src Y418, demonstrando o aumento da fosforilação de sítios de tirosina. B, Imunoprecipitação de p130^{CAS} e incubação da membrana com anticorpo anti-tirosina fosforilada (P-Tyr). A quantificação do conteúdo de p130^{CAS} fosforilada em tirosina foi normalizada em relação ao total de p130^{CAS} precipitada (IB: p130^{CAS}) e mostrou aumento da fosforilação desta proteína quando ARHGAP21 foi depletada. IP= imunoprecipitação, IgG= imunoglobulina, IB= *imunoblot*, NC = T98G controle, u.a.= unidades arbitrárias.

Além dos resultados apresentados acima, imunofluorescências de células T98G NC e ARHGAP21 KD, corroboraram o aumento da fosforilação de FAK na tirosina 925 (Figura 25) e, ainda, evidenciaram o acúmulo nuclear de FAK quando fosforilada neste resíduo.

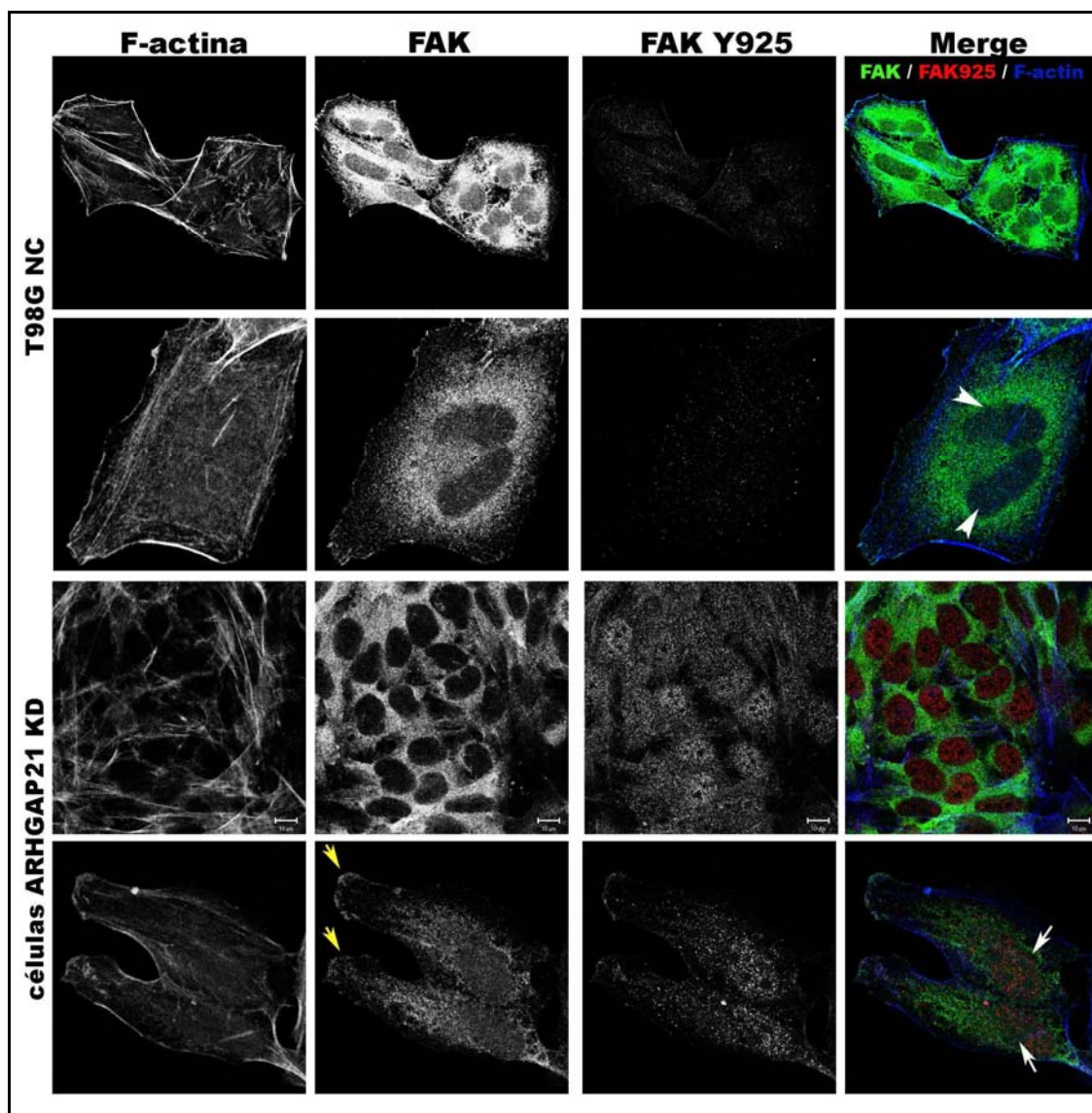


Figura 25: Aumento da quantidade de FAK fosforilada em tirosina 925 e translocação nuclear nas células T98G depletadas de ARHGAP21 (KD). Micrografias de imunofluorescência mostrando grupos de células ou células individualizadas foram capturadas em microscópio confocal LSM510 (Zeiss). Mostra-se o aumento da quantidade de FAK fosforilada na tirosina 925 em clones representativos de T98G ARHGAP21 KD em relação às células controle (T98G NC), e o acúmulo nuclear de FAKY925 (setas brancas) versus núcleos vazios para FAKY925 (cabeças de setas brancas). As setas amarelas chamam atenção para a presença de FAK na membrana das células em que ARHGAP21 fora depletada. As imagens foram capturadas utilizando-se objetiva de 63X, imersão em óleo.

4.7.1- Depleção de ARHGAP21 aumenta a atividade das RhoGTPases Cdc42 e RhoA e altera a distribuição intracelular de Cdc42

ARHGAP21 é uma RhoGAP com atividade regulatória negativa sobre Cdc42 e RhoA (DUBOIS e CHAVRIER, 2005; SOUSA et al., 2005). Então, resolvemos verificar o estado de ativação da RhoGTPases Cdc42 e RhoA após depleção de ARHGAP21.

Para avaliar a atividade destas RhoGTPases utilizamos um ensaio de atividade já bem caracterizado, no qual são utilizados domínios de ligação de proteínas à jusante de Cdc42 e RhoA, quando estas estão em sua conformação ativa (ou seja, ligadas à GTP), fusionados à GST para imunoprecipitar as proteínas ativas (respectivamente, GST-WBD, que vem de *Wiskott-Aldrich syndrome protein-binding domain* para atividade de Cdc42 e, GST-RBD, que vem de *rho-kin-binding domain* para atividade de RhoA). Estas proteínas de fusão foram expressas em bactérias e a eficiente produção e purificação das mesmas com glutathione-Sepharose está representada no gel da Figura 26 A. Nossos resultados indicam que tanto a atividade de Cdc42 quanto de RhoA foi aumentada nos clones de células T98G em que ARHGAP21 fora depletada (Figura 26 B e C).

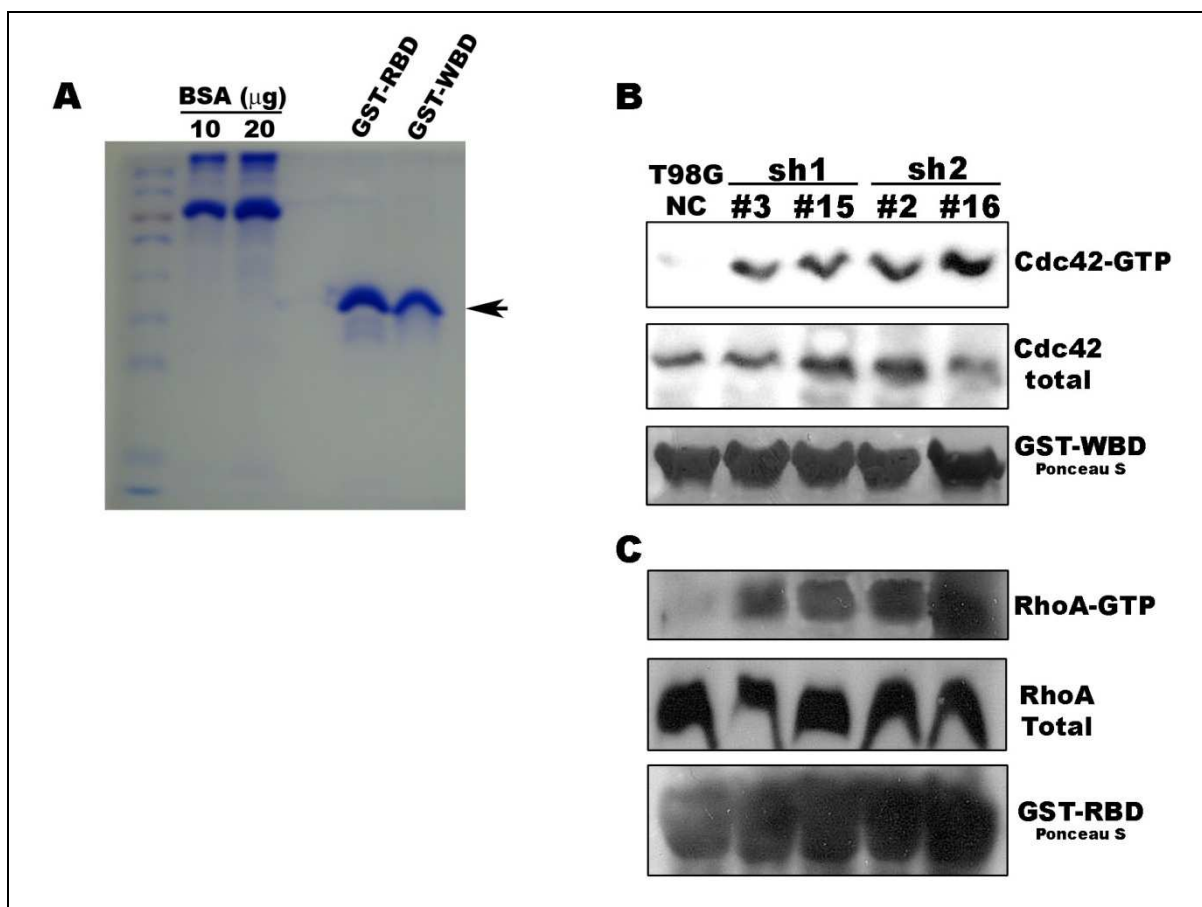


Figura 26: Depleção de ARHGAP21 resulta em aumento de atividade de Cdc42 e RhoA. A, Gel de poliacrilamida evidenciando a eficiente expressão e purificação das proteínas de fusão GST-RBD e GST-WBD. B e C, ensaio de atividade de Cdc42 utilizando a proteína de fusão GST-WBD para precipitar Cdc42-GTP (forma ativa) e ensaio de atividade de RhoA utilizando a proteína de fusão GST-RBD para precipitar RhoA-GTP (forma ativa), respectivamente, de extratos de células T98G NC e T98G ARHGAP21 KD.

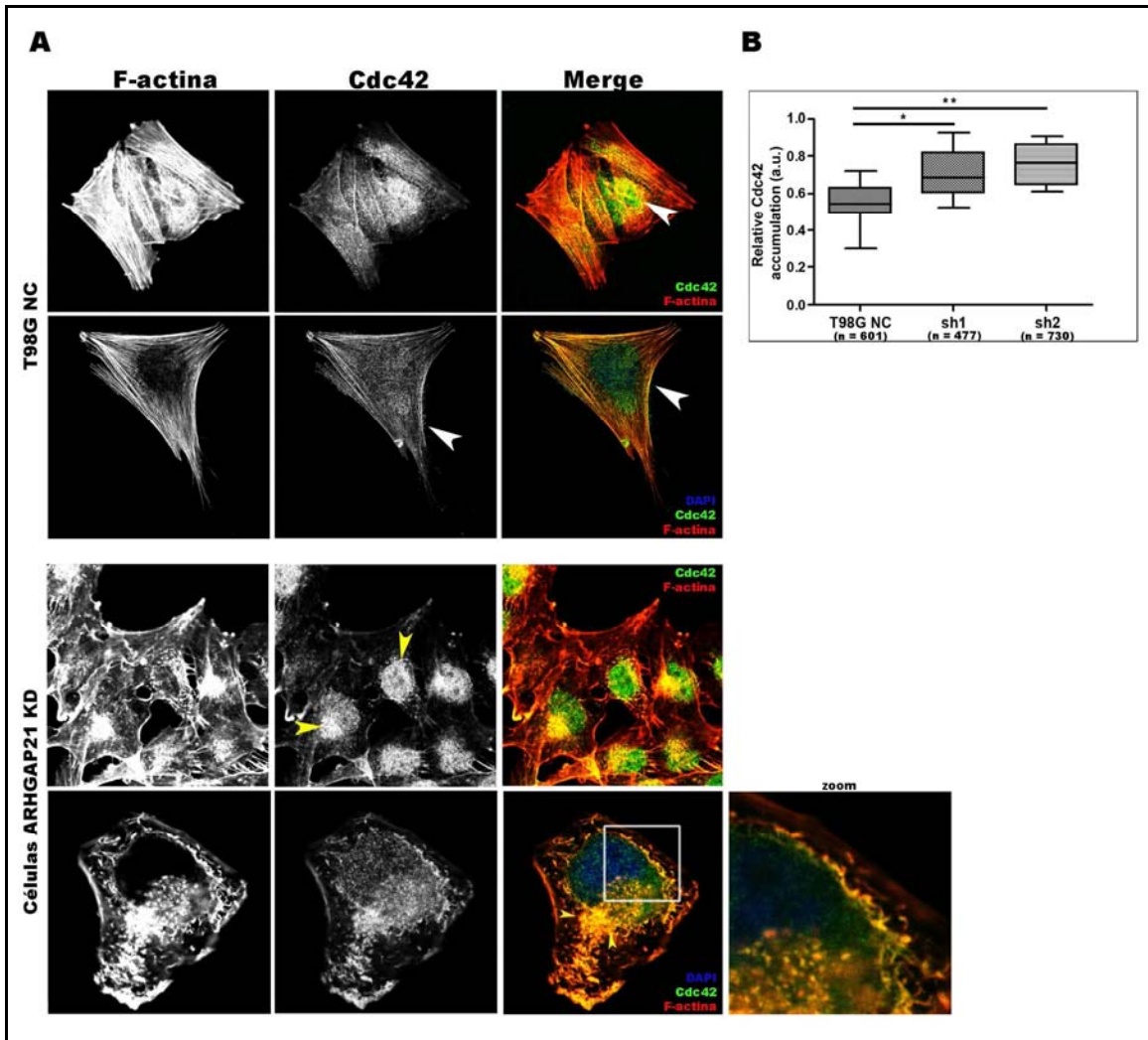


Figura 27: Depleção de ARHGAP21 resulta em alteração da distribuição de Cdc42. A, Micrografias de imunofluorescência capturadas em microscópio confocal LSM510 (Zeiss) mostrando as alterações no padrão de marcação de Cdc42, com acúmulo na região peri-nuclear (setas amarelas) e nas protrusões membranares, em um clone representativo de T98G ARHGAP21 KD, em relação às células controle (T98G NC). As imagens foram capturadas utilizando-se objetiva de 40X, imersão em óleo. Setas brancas evidenciam o padrão de marcação normal de Cdc42 em células T98G. B, Quantificação do acúmulo de Cdc42 na região peri-nuclear de células T98G NC (controle) e dois clones representativos transfectados com sh1 e sh2, mostrando o aumento deste acúmulo nos clones em que ARHGAP21 fora inibida. O gráfico mostra as médias e os valores máximos e mínimos da distribuição. A variância das medianas foi analisada pelo Teste não paramétrico de Kruskal Wallis.

Também foi evidenciada uma alteração na localização de Cdc42 para protrusões membranares e região peri-nuclear em clones representativos nos quais ARHGAP21 fora depletada (células ARHGAP21 KD), o que provavelmente seguiu-se às alterações da F-actina já evidenciadas acima e corroboradas aqui (Figura 27, setas brancas versus setas amarelas). O acúmulo de Cdc42 na região peri-nuclear foi quantificado pela contagem do número de células com este padrão em relação ao total de células, em 16 campos diferentes para cada clone. Os resultados evidenciaram o aumento deste padrão em clones representativos da transfecção com as duas moléculas de shRNA contra ARHGAP21 (Figura 27B).

4.7.2- A depleção de ARHGAP21 aumenta a secreção de metaloprotease 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9) e a capacidade de migração das células

Sabe-se que FAK promove a produção das metaloproteases gelatinolíticas 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9) quando está fosforilada nos resíduos de tirosina 397 e 925 (DANG et al., 2006; MON et al., 2006), sítios estes que estão hiper-fosforilados nas células em que ARHGAP21 fora depletada. Em vista da atividade de Cdc42 estar ligada à ativação de MMP-2 (ISPANOVIC et al., 2008) nos interessou verificar se a depleção de ARHGAP21 alteraria a secreção de MMPs gelatinolíticas (MMP-2 e MMP-9) .

Através de experimentos de zimografia utilizando sobrenadante de cultura das células T98G NC e ARHGAP21 KD, cultivadas por 48 horas em meio sem soro, não encontramos secreção de MMP-9, porém ficou evidente que nas células em que ARHGAP21 fora depletada houve maior secreção de MMP-2, tanto em sua forma pro (isoforma 72 KDa) quanto em sua forma ativa (isoforma 64 KDa) (Figura 28 A).

Corroborando nossos resultados que posicionam a proteína ARHGAP21 como mediadora da sinalização membrana basal- meio intracelular, pudemos evidenciar que o cultivo de células T98G NC em substrato de membrana basal (MatrigelTM – BD Bioscience, Figura 28B, M) resulta em um aumento de aproximadamente 40% na secreção da isoforma pro MMP-2 e de 120% na secreção da isoforma ativa (Figura 28

B, quantificação). Já nos clones com silenciamento da ARHGAP21 (KD)(#3-sh1 e #2-sh2) os aumentos na secreção de MMP-2 entre células cultivadas em plástico *versus* Matrigel são mais brandos, porém é notável o aumento da secreção de ambas as isoformas em qualquer situação em relação à T98G NC (Figura 28 B, quantificação). É possível que o excesso de ativação da via de FAK quando ARHGAP21 é depletada provavelmente ative algum mecanismo de *feedback* negativo nestas células impossibilitando o aumento de secreção de MMP-2.

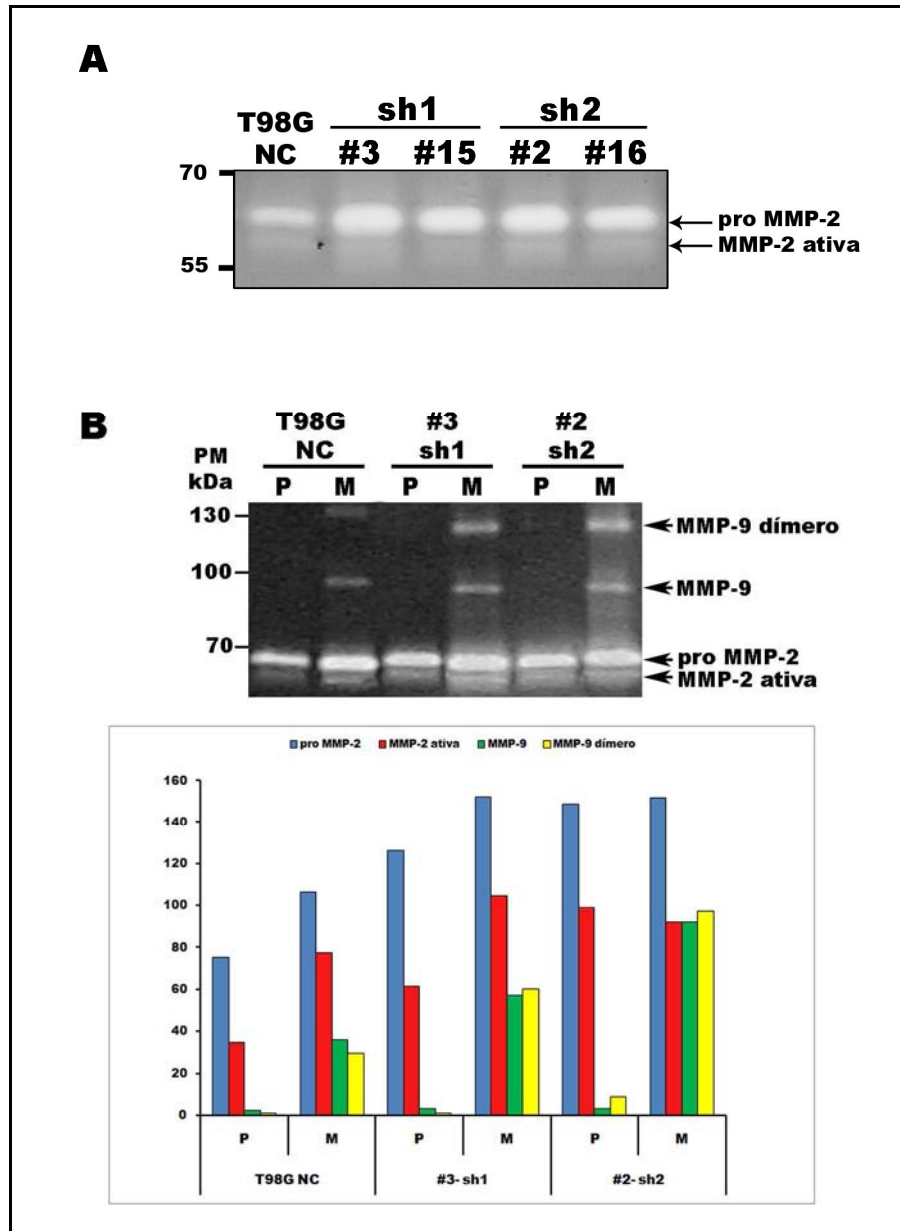


Figura 28: Depleção de ARHGAP21 resulta em aumento de secreção de MMP-2 e indução da secreção de MMP-9. A, Zimografia gelatinolítica de sobrenadantes de células T98G NC e ARHGAP21 KD e B, zimografia gelatinolítica de sobrenadantes de culturas após cultivo em placas comuns ou recobertas com Matrigel por 48 hs, evidenciando o aumento da secreção de MMP-2 e MMP-9 devido à depleção de ARHGAP21.

Interessantemente, a secreção de MMP-9 ocorreu apenas nas células cultivadas sobre Matrigel (Figura 28B). Porém, ainda assim a inibição de ARHGAP21 possibilitou às células estimuladas pelas proteínas presentes no Matrigel um aumento médio de 130% da secreção tanto da isoforma ativa de 92 kDa quanto do dímero de MMP-9-lipocalina (130 kDa) (KJELDSEN et al., 1993) (Figura 28B, gráfico).

Como o movimento celular através dos tecidos desempenha um papel crucial na progressão tumoral, avaliamos se a depleção de ARHGAP21 alteraria a capacidade de migração de células T98G. Os experimentos de migração celular foram realizados em placas Transwell (Costar) contendo filtros com poros de 8 μ m em triplicatas. Os resultados apresentados são médias e desvios padrões de ao menos dois experimentos independentes. Células T98G NC demonstraram uma razão média migratória (mr) de $30,67\% \pm 11,22$, enquanto os clones resultantes da inibição de ARHGAP21 com a sequência sh1, #3 e #15, demonstraram mr de $62,78 \pm 26,09\%$ e mr de $46,4 \pm 6,78\%$, respectivamente; e os clones resultantes da inibição com a sequência sh2, #2 e #16, demonstraram mr de $51,83 \pm 7,52\%$ e mr de $77,83 \pm 4,07\%$, respectivamente (Figure 29). As figuras acima do gráfico são exemplos de filtros corados com azul de toluidina após a migração dos clones correspondentes. Estes resultados de aumento da capacidade de migração das células em que ARHGAP21 fora depletada mostraram-se estatisticamente significativos ($p < 0,05$), indicando que ARHGAP21 desempenha importante papel no controle da migração de células de glioblastoma.

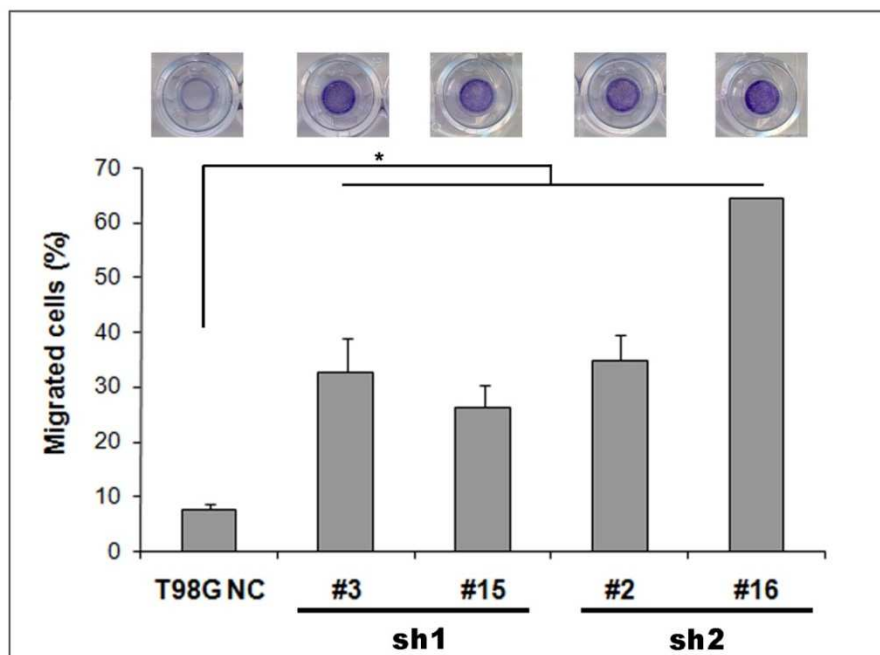


Figura 29: Migração celular é aumentada devido à depleção de ARHGAP21. T98G NC e células ARHGAP21 KD (sh1: #3 e #15, sh2: #2 e #16) foram submetidas a experimentos de migração em placas Transwell (Costar) por 48 horas, e apresentaram aumento de sua capacidade migratória. Os aumentos de taxas de migração de células depletadas em relação ao controle (NC) são estatisticamente significativos (Wilcoxon Rank Sum Test ; * = $p < 0,05$).

4.8. Avaliação da expressão do gene e proteína ARHGAP21 em astrocitomas

Como a proteína ARHGAP21 demonstrou ter um papel importante na manutenção de um fenótipo menos transformado *in vitro*, resolvemos analisar a expressão deste gene em amostras de pacientes com diversos graus de astrocitomas (graus I a IV, sendo o grau IV os glioblastomas). Estes resultados foram realizados em colaboração com a Prof. Dra. Suely Marie do Laboratório de Investigação em Neurologia, da Faculdade de Medicina – USP.

A casuística utilizada está apresentada na tabela 4. As amostras de cDNA de 22 pacientes com astrocitoma grau I, 25 pacientes com astrocitoma grau II, 17 pacientes com astrocitoma grau III e 83 pacientes com astrocitoma grau IV (GBM) foram

utilizadas para avaliação da expressão de *ARHGAP21* em relação à 21 amostras de pacientes que não apresentavam neoplasias cerebrais.

Tabela 4: Amostras de astrocitomas utilizada para avaliar a expressão do gene *ARHGAP21*.

Grupo	Número de casos
Não neoplásicos	21
Astrocitoma grau I	22
Astrocitoma grau II	25
Astrocitoma grau III	17
Astrocitoma grau IV (GBM)	83

Os resultados de expressão de *ARHGAP21* foram obtidos de forma relativa em comparação a quatro diferentes genes utilizados como controles endógenos (HPRT, Gus-B, β -actina e BCRP). A expressão de *ARHGAP21* mostrou-se aumentada em média oito vezes nos astrocitomas em relação aos tecidos normais quando foi utilizado HPRT como controle (Figura 30 A), mostrou-se diminuída 3,5 e 7,5 vezes nos astrocitomas quando foram utilizados Gus-B e β -actina, respectivamente, como controles (Figura 30 B e C), e pareceu não variar quando foi utilizado BCRP como controle endógeno.

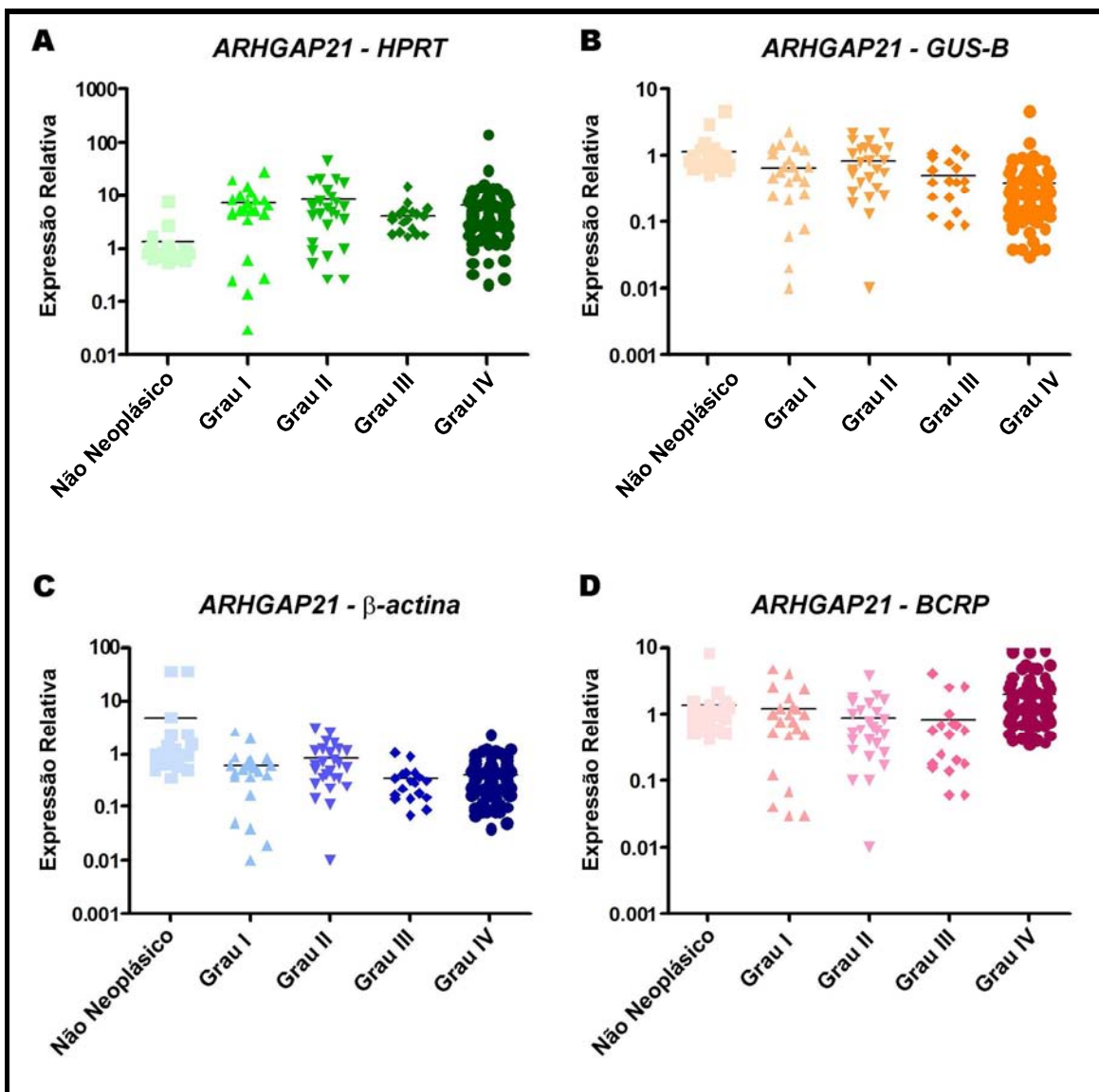


Figura 30: Avaliação da expressão do gene *ARHGAP21* em casuística de astrocitomas. RNAs de amostras de pacientes foram transcritos e utilizados em reação de PCR em tempo-real para avaliação da expressão de *ARHGAP21*. A expressão relativa de *ARHGAP21* foi calculada em relação à *HPRT* (A), *GUS-B* (B), β -actina (C) e *BCRP* (D).

Estes dados foram normalizados pelo programa GeNorm que reavalia a expressão gênica relativa utilizando a média geométrica dos melhores controles endógenos utilizados (definidos como aqueles que menos variam dentro da amostragem). Após a normalização a expressão relativa do RNAm de ARHGAP21 demonstrou não variar significativamente nos diferentes graus de astrocitomas em relação aos tecidos normais, apesar de haver vários casos de astrocitomas graus II e III em que a expressão relativa de ARHGAP21 é menor (Figura 31).

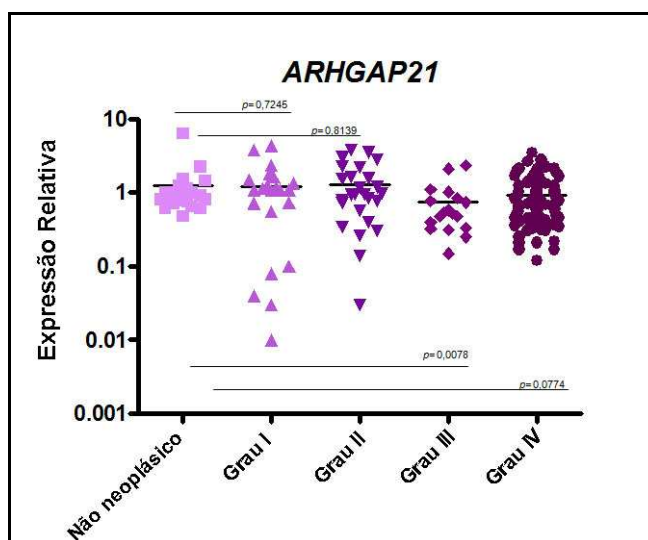


Figura 31: Normalização da expressão relativa de *ARHGAP21*. Para a normalização foi utilizado o programa GeNorm que calcula uma média dos melhores controles endógenos analisados e a utiliza para relativizar a expressão do gene de interesse.

Muito provavelmente, portanto, o RNAm de *ARHGAP21* é expresso constitutivamente tanto em tecidos normais como neoplásicos e o controle de sua expressão é pós-traducional.

Com o objetivo de avaliar esta última hipótese analisamos a expressão da proteína ARHGAP21 por imunohistoquímica em dois casos de astrocitomas graus II e IV.

Os resultados obtidos estão sumarizados na Tabela 5 e exemplificados nas fotos da figura 32. Os parâmetros analisados foram a frequência média de positividade para ARHGAP21 (F+%), a extensão da positividade total e percentual (A(μm) e A%,

respectivamente), e a densidade óptica média das áreas positivas. Estes parâmetros demonstraram que apesar da densidade óptica média ser constante nos graus II e IV, os demais fatores são maiores nos casos de astrocitoma grau IV, indicando que há uma maior expressão da proteína ARHGAP21 nos caso de maior malignidade.

Tabela 5: Resumo dos resultados obtidos das imunohistoquímicas para ARHGAP21 de dois casos de astrocitomas graus II e IV. F+(%) = frequência média de positividade; A (µm) = área total de positividade; A% = área percentual de positividade e DOM = densidade óptica média das regiões positivas.

CASO	GRAU	F+ (%)	A (um)	A%	DO M
725	Astrocitoma grau II	12	179,09	1,3	129,278
9370	Astrocitoma grau II	4	399,5	2,9	161,966
9053	Astrocitoma grau IV	43	1446,5	10,5	159,383
9270	Astrocitoma grau IV	37,5	812,79	5,9	147,847

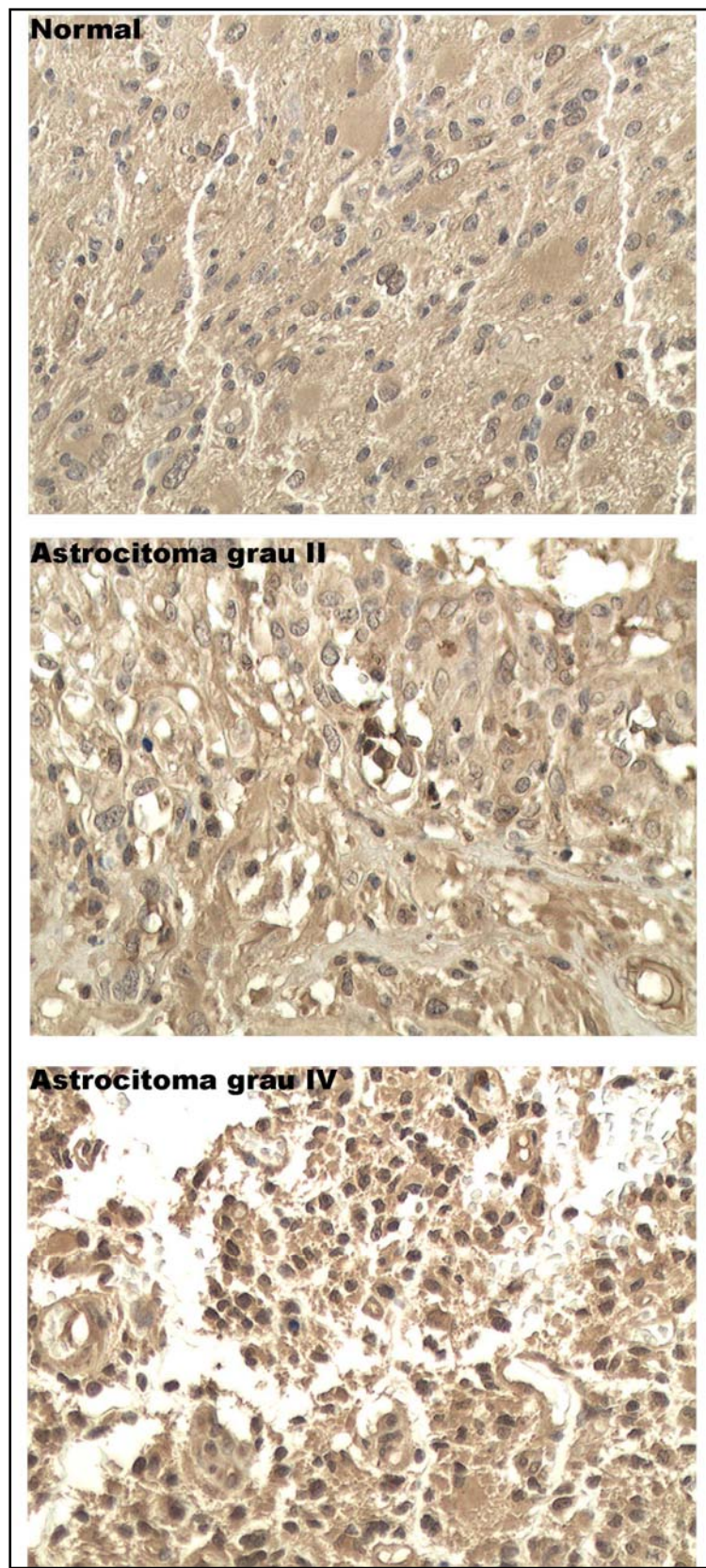


Figura 32: Fotos ilustrativas do padrão de expressão de ARHGAP21 em cortes histológicos de amostras de pacientes com astrocitomas Graus II e IV em comparação ao tecido cerebral normal. As imagens foram capturadas em microscópio Nikon utilizando-se a objetiva de 40X.

4.9 Avaliação da expressão de *ARHGAP21* em tecido cerebral normal

Com o intuito de melhor caracterizar em que regiões do sistema nervoso central o mRNA de *ARHGAP21* era expresso utilizamos uma membrana comercial, obtida da empresa Clontech^{Inc}, contendo RNAs de várias regiões. A sonda produzida para hibridização reconhece uma porção de 900 pb na região carboxi-terminal de *ARHGAP21* (Figura 33A).

Os resultados evidenciaram que o mRNA de *ARHGAP21* é altamente expresso em cerebelo e córtex, e mais fracamente em cordão espinhal (Figura 33B), regiões de elevada especialização.

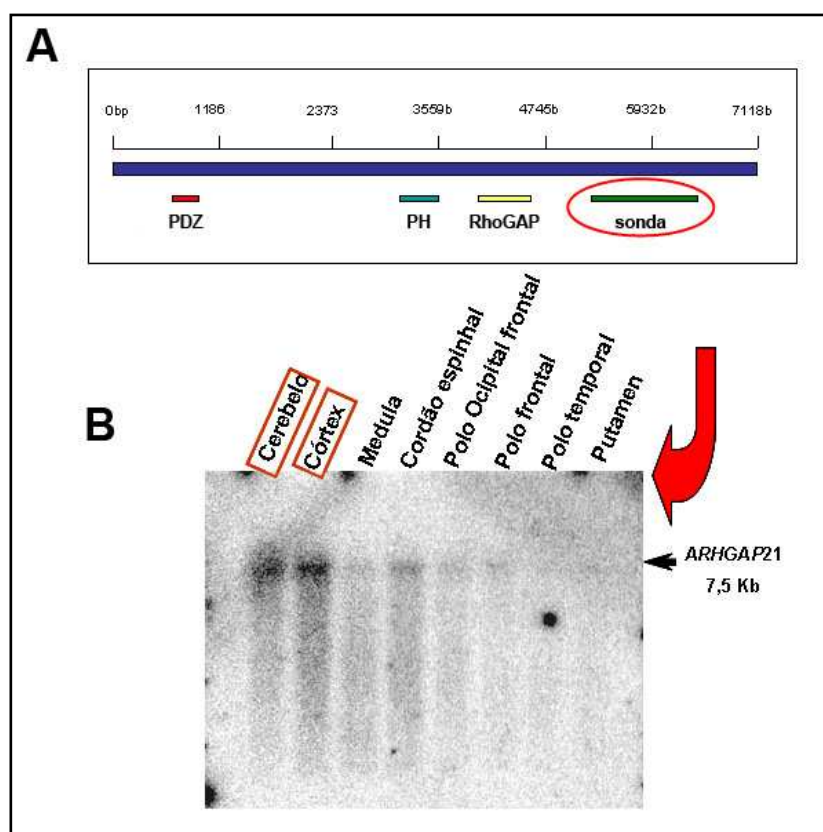


Figura 33: Regiões do sistema nervoso central em que *ARHGAP21* é mais expresso. A, esquema de *ARHGAP21* com seus domínios e a região reconhecida pela sonda utilizada na hibridização. B, Northern blotting multi tecidual (Clontech) evidenciando a alta expressão de *ARHGAP21* (7,5 Kb) em cerebelo e córtex, e uma expressão mais fraca em cordão espinhal.

A extração de células do córtex de camundongos embrionários (E16 e E18) ou pós-natos (P0) nos permitiu evidenciar localização intracelular diferencial de *ARHGAP21* de acordo com o tipo celular. *ARHGAP21* localiza-se no núcleo de astrócitos obtidos de

animais P0, e no núcleo e nas projeções celulares de neurônios obtidos de animais embrionários de 16 ou 18 dias (N16 e N18, respectivamente) e cultivados sobre astrócitos para melhor manutenção dos mesmos (Figura 34). A localização diferencial de ARHGAP21 pode indicar funções diferentes desta proteína em astrócitos e neurônios.

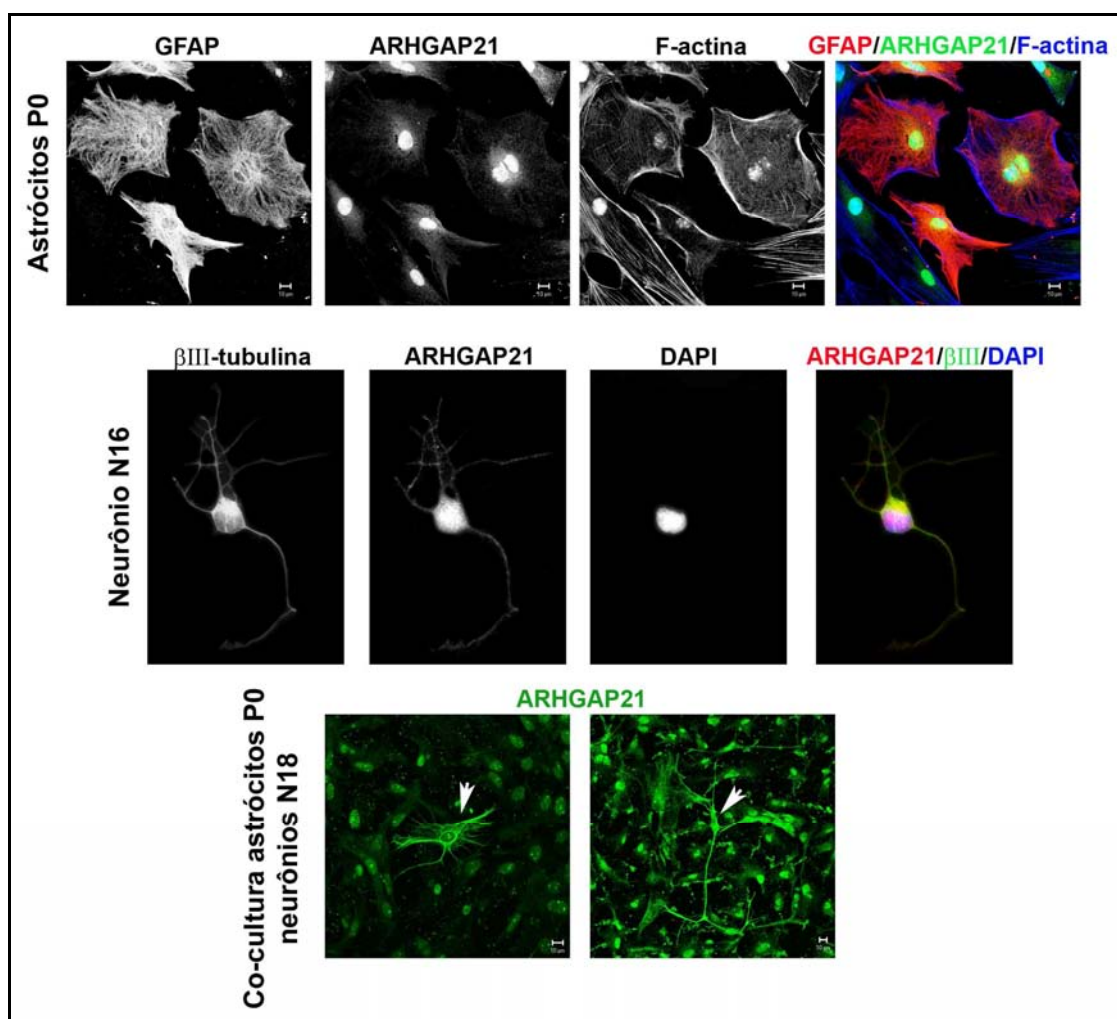


Figura 34: Culturas primárias de astrócitos (P0) e neurônios (N16 e N18) de camundongos evidenciando localização intracelular distinta de ARHGAP21 nestas células. Setas brancas, indicam neurônios nas co-culturas. GFAP = proteína fibrilar glial, presente somente em astrócitos; β III-tubulina = marcador de neurônios.

Em co-culturas de neurônios N18 também pudemos evidenciar a interação entre ARHGAP21 e FAK (Figura 35). Este resultado indica que em sistema nervoso normal ARHGAP21 possa modular as mesmas vias de sinalização que em tecido neoplásico.

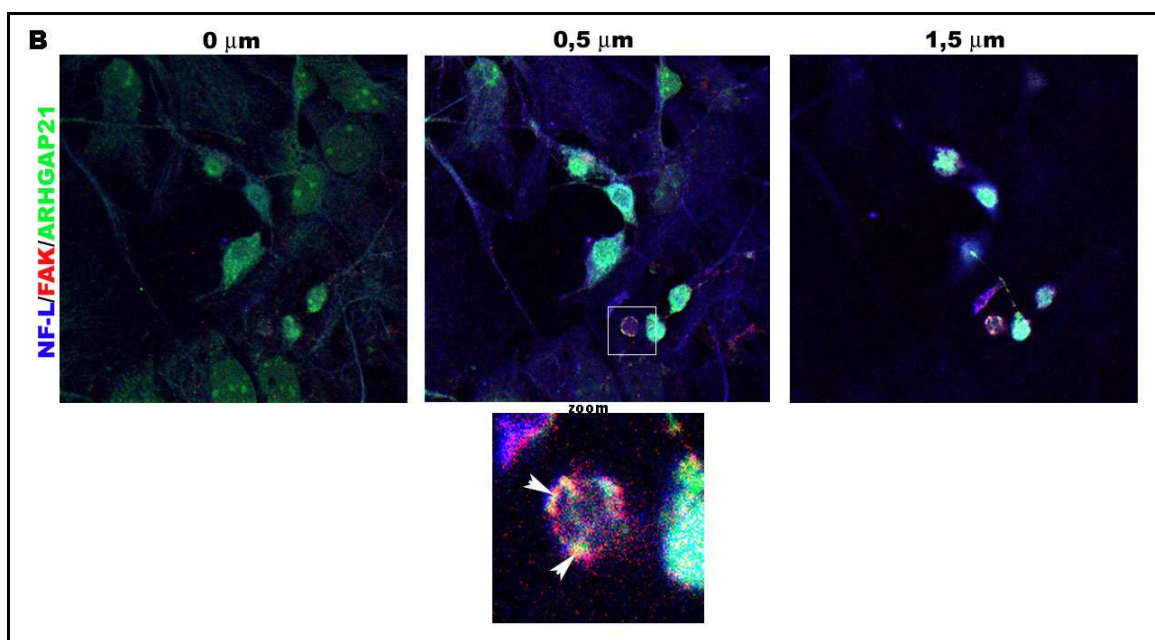


Figura 35: Imunofluorescência de cultura de neurônios N18 seccionada por microscopia confocal, mostrando detalhe em zoom da região de co-localização entre ARHGAP21 e FAK. NF-L = proteína neurofilamentar, marcadora de neurônios.

4.10. Avaliação da expressão de ARHGAP21 ao longo do desenvolvimento embrionário de camundongos.

Na tentativa de investigar se haveria variação da expressão do gene *ARHGAP21* em camundongos coletamos amostras de RNA de cérebro de camundongos Balb-c em diferentes fases de desenvolvimento (embrionário (E): E15, E17 e E18 e pós-natos (P): P1, P7, P14 e P28). As amostras dos hemisférios direito e esquerdo para cada idade foram coletadas de três animais. Estas coletas foram realizadas em colaboração com a aluna de doutorado da Dra. Íscia Lopes-Cendes, Patrícia Ribeiro.

Analizamos a expressão do gene *ARHGAP21* por PCR em tempo real utilizando iniciadores específicos para este gene de camundongo, de modo a avaliar sua expressão em relação ao controle endógeno *Gapdh*.

Pela análise dos resultados obtidos na realização de duas reações independentes pudemos evidenciar que em ambos os hemisférios a expressão de *ARHGAP21* é bem mais elevada em animais embrionários. A expressão deste gene mostrou-se especificamente elevada no dia E17 em hemisfério direito (média de 225 ± 100 folds maior que em animais adultos) (Figura 36A). Já nas amostras de hemisfério esquerdo a máxima expressão nas amostras de embriões foi 8 vezes maior, mas não houve um dia específico em que a expressão fosse significativamente maior, como em hemisfério direito (Figura 36 B).

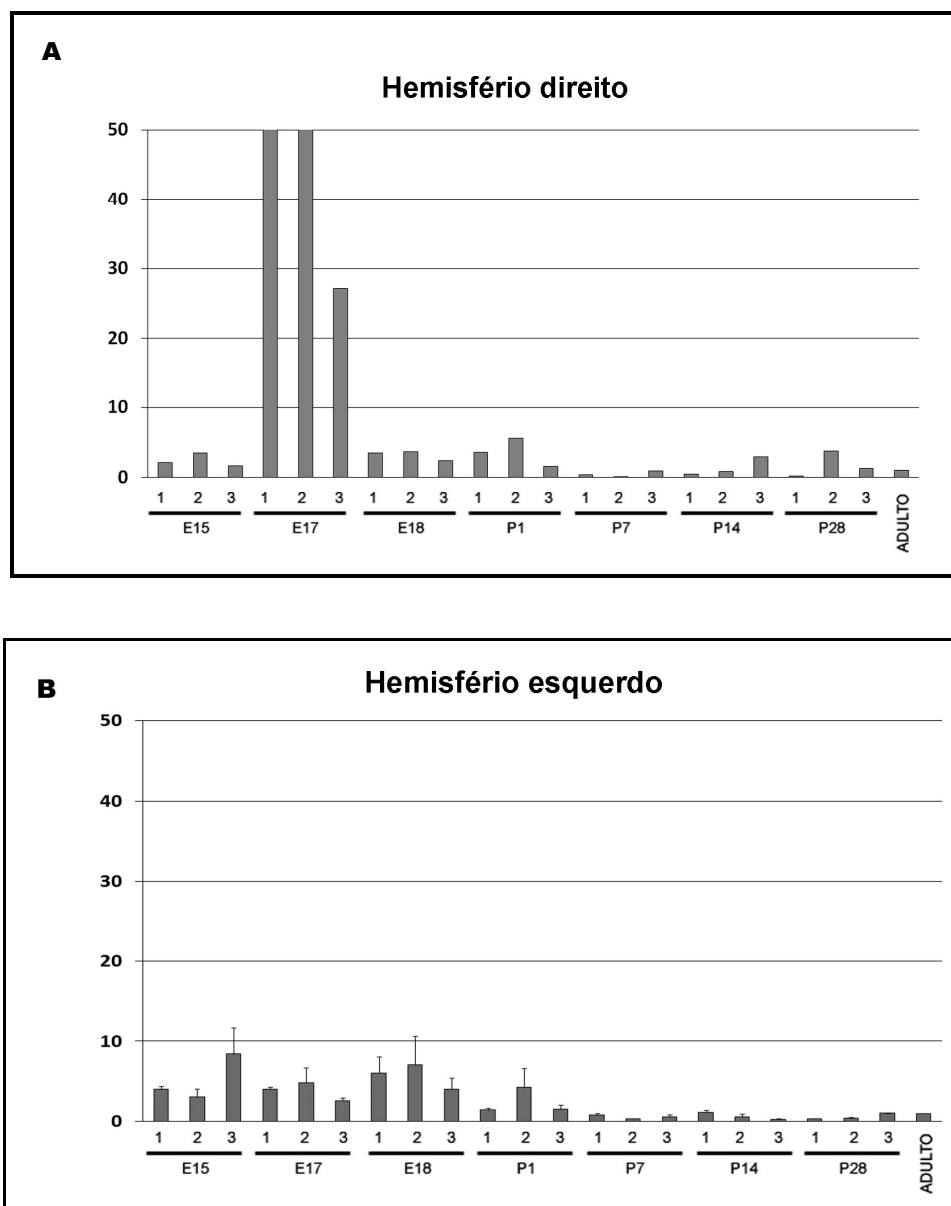


Figura 36: Curva de expressão de *ARHGAP21* em diferentes fases do desenvolvimento embrionário (E) e pós-nato (P) de camundongos. RNAs dos hemisférios direito (A) e esquerdo (B) de três animais de cada idade foram coletados, transcritos e a reação de PCR em tempo real foi realizada utilizando-se iniciadores específicos para o gene *ARHGAP21* de camundongo e para o controle endógeno *Gapdh*.

Devido ao envolvimento de metaloproteases durante a formação do encéfalo, principalmente as metaloproteases 2 e 9 que são intensamente produzidas por células endoteliais neurais estimulando a migração de progenitores neurais da zona subventricular ao córtex e sub-córtex (WANG et al., 2006), e, também, devido à depleção de ARHGAP21 resultar em aumento da secreção de MMP-2 em células T98G, resolvemos investigar a expressão dos genes *Mmp-2* e *Mmp-9* nas amostras de tecido cerebral de camundongos.

Os resultados demonstraram que em hemisfério direito há elevada expressão, principalmente de *Mmp-2* em E15 e após este dia de desenvolvimento os níveis de expressão destes genes caem mantendo-se praticamente constante até o indivíduo adulto (Figura 37A). Já no hemisfério esquerdo há elevada expressão de *Mmp-9* também em E15 e após este dia os níveis de expressão deste gene caem e se mantêm constantes. Não detectamos expressão de *Mmp-2* nas amostras de hemisfério esquerdo (Figura 37B).

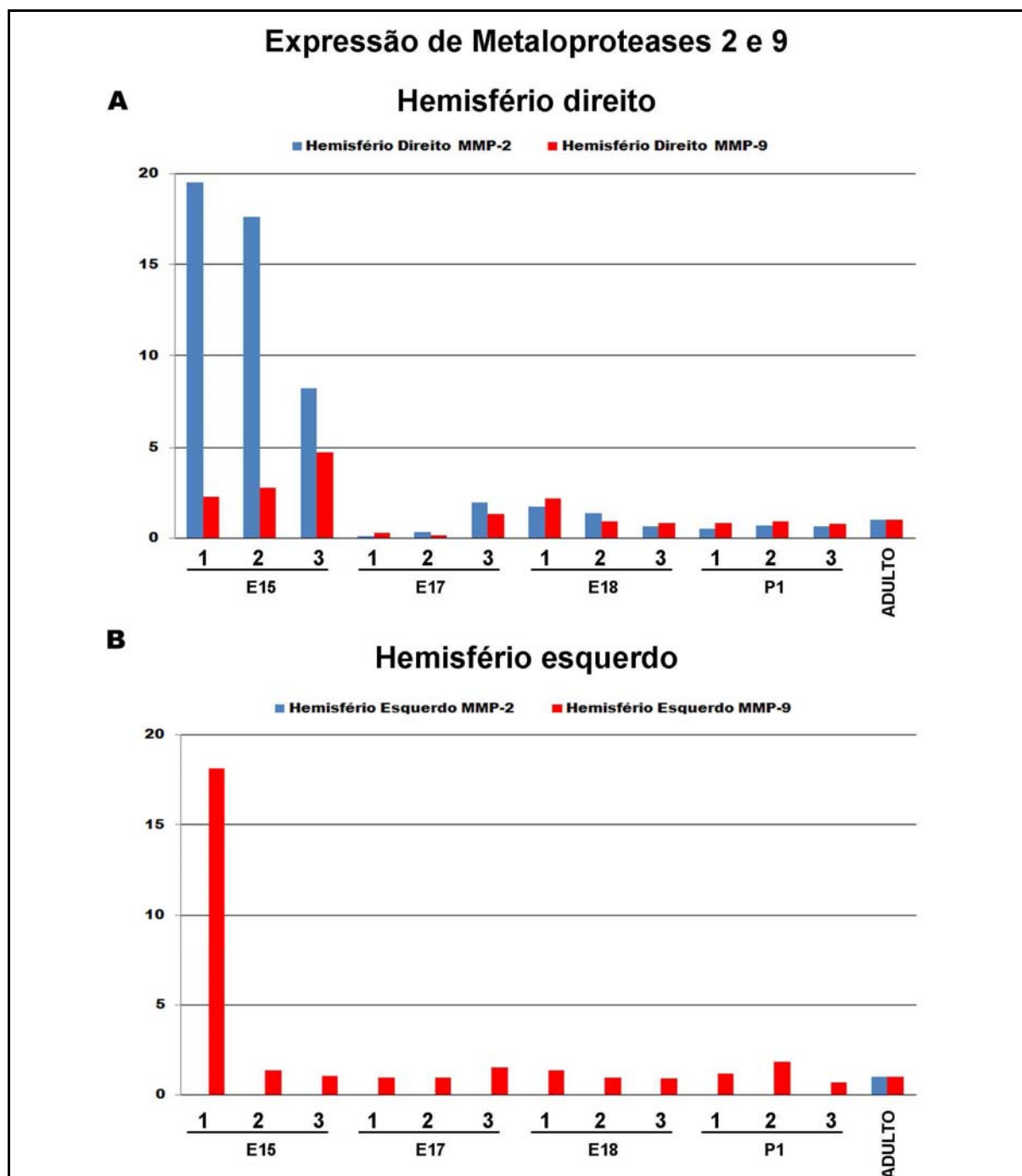


Figura 37: Curva de expressão de *Mmp-2* e *Mmp-9* em diferentes fases do desenvolvimento embrionário (E) e pós-nato (P) de camundongos. RNAs dos hemisférios direito (A) e esquerdo (B) de três animais de cada idade foram coletados, transcritos e a reação de PCR em tempo real foi realizada utilizando-se iniciadores específicos para o gene *ARHGAP21* e o controle endógeno *Gapdh* de camundongo.

4.11. Avaliação do envolvimento de *ARHGAP21* na diferenciação neural de células tronco embrionárias de camundongo.

A partir de 2006 foram disponibilizadas à comunidade científica milhares de células tronco embrionárias murinas com mutações insercionais em diversos genes (NORD et al., 2006), geradas pelos laboratórios pertencentes ao consórcio internacional intitulado “Gene Trap”. As linhagens AK0286, RR629 e AP0884, (Tabela 6) que adquirimos, apresentam bloqueio da transcrição do gene *ARHGAP21*.

Tabela 6: Células tronco embrionárias contendo inserções no gene *ARHGAP21* adquiridas para geração de camundongos nocaute para este gene.

Clone	Laboratório de origem
AK0286	Sanger Institute – UK
AP0884	Sanger Institute – UK
RRR629	BayGenomics - USA

Como o RNAm de *ARHGAP21* mostrou-se mais expresso em idades embrionárias de camundongo, resolvemos investigar se este gene teria algum papel na diferenciação neuronal de células tronco embrionárias. Para isto diferenciamos a linhagem AK0286 derivada da linhagem E14Tg2a.4 cuja inibição do gene *ARHGAP21* fora confirmada (Figura 38A), seguindo protocolo sugerido na literatura (Bibel et al., 2007).

O fenótipo das células parental (E14Tg2a.4) e AK0286 são similares e o padrão de agregação quando estas células foram mantidas em placas não aderentes também foi muito similar (Figura 38B, indiferenciada e corpos embriônicos). Após quatro dias em placas não aderentes adicionamos ácido retinóico ou DMSO (células controle) e mantivemos por mais quatro dias. Após este período, os corpos embriônicos foram desagregados e a células foram semeadas em placas previamente tratadas com poli-lisina e laminina. Após dois dias pudemos encontrar células com fenótipo neuronal tanto na célula parental como na célula que não expressa *ARHGAP21* tratadas com ácido retinóico em comparação às células controle (Figura 38, dois dias laminina), e após 5 dias houve uma redução dramática do número de células.

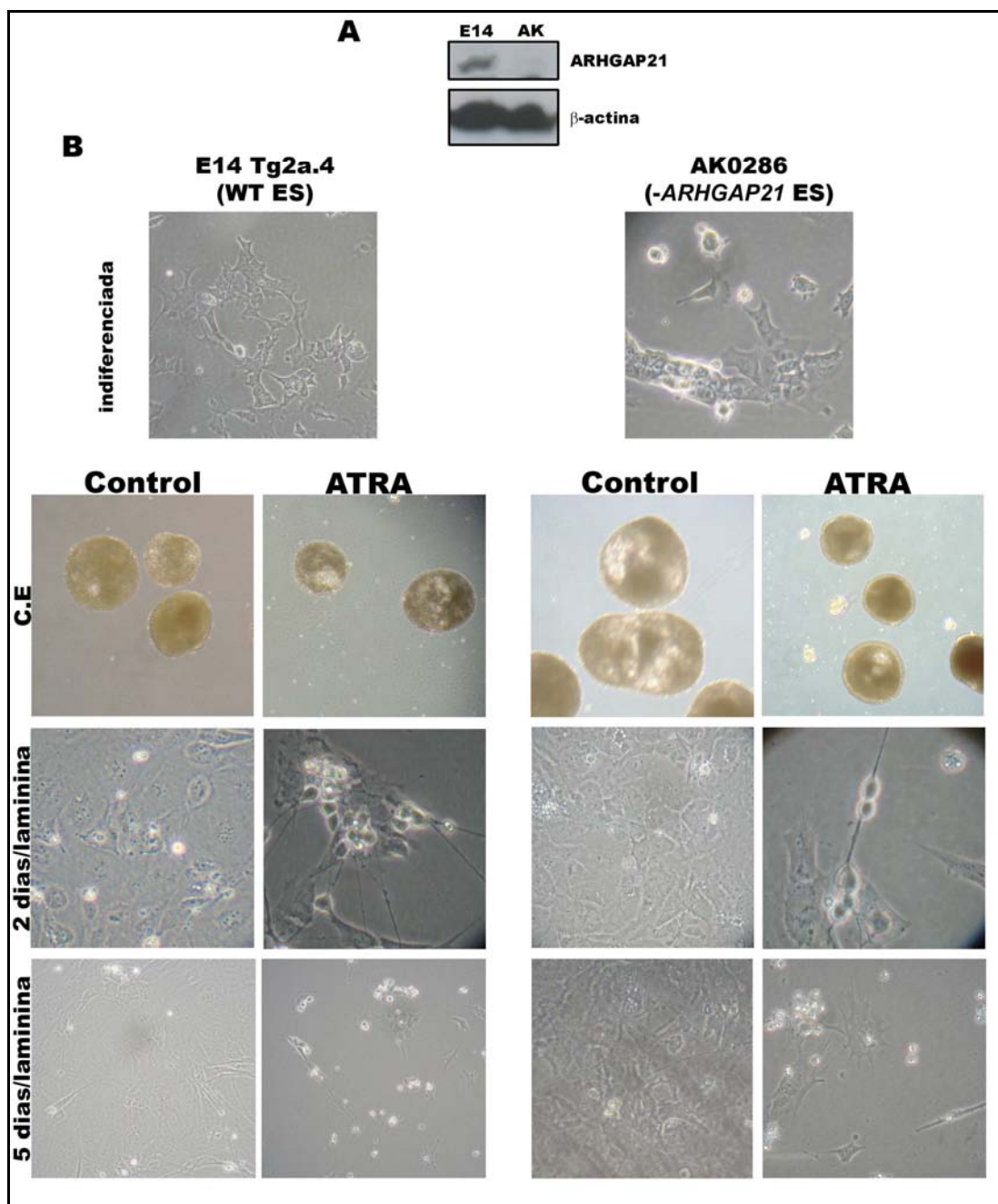


Figura 38: Células tronco embrionárias (ES) que não expressam o gene ARHGAP21 diferenciam-se em linhagens neuronais normalmente. A, western blotting evidenciando a ausência da proteína ARHGAP21 na linhagem AK0286. B, As linhagens E14Tg1a.4 e AK0286 foram diferenciadas com ácido-trans-retinóico segundo o protocolo apresentado em Material e Métodos. Após o término da diferenciação, células com fenótipo neuronal puderam ser observadas em ambas as linhagens. C.E. = corpos embriônicos; ES = célula tronco embrionária; ATRA = ácido All-Trans-retinóico.

Com isto, pudemos concluir que a ausência de *ARHGAP21* não afeta a diferenciação neuronal de células tronco embrionárias.

4.12. Produção de um animal nocaute para o gene *ARHGAP21*

As linhagens de células tronco embrionárias obtidas do Consórcio Internacional Gene Trap foram utilizadas para geração de animais nocautes para o gene *ARHGAP21*.

Os procedimentos de injeção das células em blastocistos foram realizados no laboratório de Transgênicos, CEDEME, Universidade Federal de São Paulo, sob responsabilidade da Dra. Heloisa Allegro Baptista e do Dr. João Bosco Pesqueiro.

Até o momento foram obtidos dois animais quiméricos originários da injeção da linhagem AK0286: um macho, com baixo grau de quimerismo, e uma fêmea, altamente quimérica (Figura 39). Como as células que têm inibição de *ARHGAP21* são originárias da linhagem de camundongos H129 e elas foram injetadas em blastocistos provenientes de animais C57BL/6, os animais quiméricos terão de ser cruzados por cinco gerações, sendo cada prole genotipada quanto ao nocaute, para limpeza do *background* genético da linhagem H129, antes de podermos cruzar dois animais heterozigotos para obtenção de um animal nocaute homozigoto.

Até o momento apenas o macho foi capaz de cruzar com uma fêmea selvagem. A prole é constituída por 5 animais pretos e 1 animal aguti, o que indica que o macho, apesar do baixo grau de quimerismo, foi capaz de transmitir à prole as características da célula H129 (Figura 39). Os próximos passos são a genotipagem da prole e cruzamentos dos filhotes identificados como heterozigotos com animais selvagens para dar continuidade à limpeza do *background* genético, e a análise do fenótipo da fêmea quimérica (Figura 39) para compreender o porquê da aparente esterilidade da mesma.

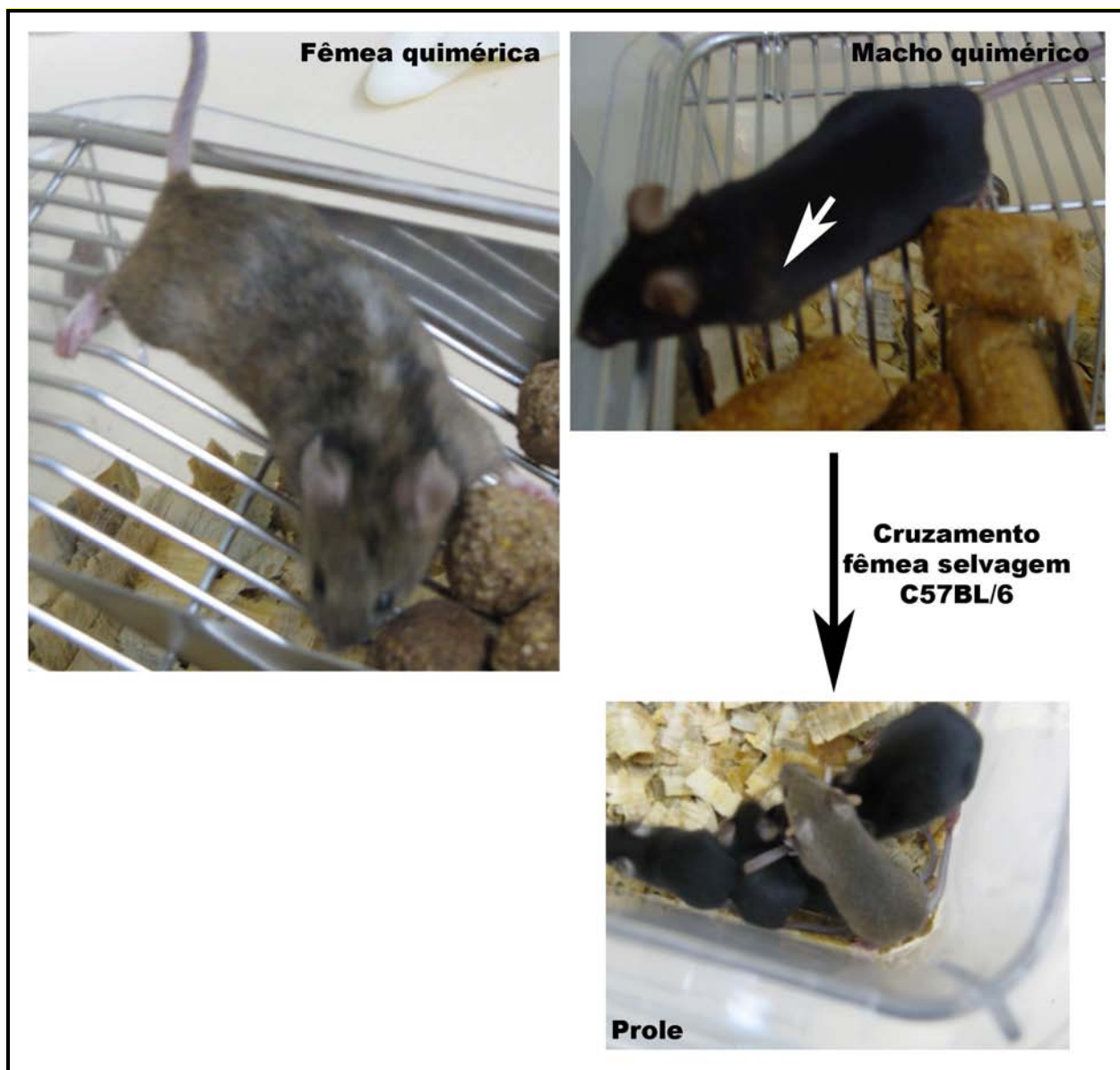


Figura 39: Animais quiméricos obtidos pela injeção de células AK0886 em blastocistos de animais C57BL/6. A cor aguti na pelagem, conferida pela linhagem AK0886, indica o quimerismo. A fêmea apresenta nível de quimerismo bem maior que o macho (seta branca indicando a mancha na pelagem). O macho foi capaz de transmitir a cor aguti na pelagem para um filhote.

5. Discussão

A caracterização inicial do gene (*ARHGAP21* NM_020824), que codifica a proteína ARHGAP21, foi realizada por nosso grupo de pesquisa e ficou demonstrada a elevada expressão deste gene em sistema nervoso (BASSERES et al., 2002). Este resultado originou o interesse de investigar o papel de ARHGAP21 neste tecido altamente diferenciado e cujas neoplasias têm péssimo prognóstico.

Na presente tese demonstramos que a proteína ARHGAP21, ainda pouco caracterizada, apresenta localização nuclear e peri-nuclear em diversas linhagens celulares tumorais e em culturas primárias de fibroblastos, e também encontra-se localizada nos prolongamentos celulares de neurônios primários. Recentemente, nosso grupo de pesquisa caracterizou a ocorrência de translocação de ARHGAP21 do núcleo para a membrana plasmática em células cardíacas de ratos submetidos à coarctação da aorta (BORGES et al., 2008), porém em linhagens de glioblastoma multiforme *in vitro* não encontramos nenhum estímulo capaz de induzir esta translocação, o que hipotetizamos ser devido ao caráter maligno destas células.

Dentre os tumores astrocíticos (graus I, II, III e IV), os glioblastomas (astrocitoma grau IV) são os tumores primários mais frequentes e mais malignos que atingem o encéfalo humano (OHGAKI e KLEIHUES, 2007). Os glioblastomas podem se originar a partir de astrocitomas de baixo grau (glioblastomas secundários) ou *de novo* (glioblastomas primários). Estes dois tipos são molecularmente bem distintos. Um exemplo importante de diferença entre eles são as mutações do gene TP53 que ocorrem mais frequentemente nos glioblastomas secundários (FURNARI et al., 2007). Pacientes com glioblastomas primários recém diagnosticados têm em média uma sobrevida de um ano, geralmente com péssima resposta às modalidades terapêuticas (MISCHEL e CLOUGHESY, 2003) sendo portanto, o descobrimento de novos alvos terapêuticos imperativo.

As linhagens de glioblastoma humano A172 e T98G utilizadas em experimentos de cultivo sobre diferentes proteínas de matriz extracelular apresentam diferentes status de p53: A172 apresenta o gene TP53 normal (MIRZAYANS et al., 2005) enquanto T98G apresenta TP53 mutado e inativo. Esta diferença pode ser a responsável pela menor expressão de FAK encontrada em A172 em relação à T98G, já que na região promotora do gene *Ptk2* (que codifica a proteína FAK) há regiões de ligação a p53,

sendo esta ligação responsável pelo bloqueio da transcrição deste gene (GOLUBOVSKAYA V. et al., 2004; GOLUBOVSKAYA V. M. e CANCE, 2007; GOLUBOVSKAYA V. M. et al., 2008). São também exemplos de linhagens de glioblastoma que apresentam status oposto de TP53: U138MG, que apresenta TP53 mutado, e U87MG, que apresenta TP53 normal.

Durante a padronização da utilização do anticorpo anti-ARHGAP21 pela técnica de *western blotting* notamos que eram reconhecidas três bandas expressas diferencialmente de acordo com a linhagem celular considerada (com pesos aproximados de 150, 200 e 250 kDa). No presente estudo observamos depleção da banda de 200 kDa de ARHGAP21 no cultivo em Matrigel, tanto em T98G como em A172, indicando que esta proteína não está relacionada com o processo invasivo de T98G. Porém, a depleção desta banda sugeriu o envolvimento de ARHGAP21 em vias de transmissão de sinal, desencadeadas por integrinas. Consequentemente iniciamos nossa busca por possíveis proteínas transdutoras dos sinais das integrinas ao interior celular que interagissem com ARHGAP21 e demonstramos a ocorrência de interação com a porção C-terminal da quinase de adesão focal – FAK - na região peri-nuclear das linhagens de glioblastoma T98G e U138MG.

Em tumores humanos o aumento da expressão de FAK está relacionado com a progressão a fenótipos altamente malignos e metastáticos (SCHLAEPFER e MITRA, 2004), isto é condizente com o caráter invasivo de T98G, diferentemente de A172 (NAKAGAWA et al., 1996). FAK é atualmente proposta como proteína adaptadora chave por sequestrar proteínas pro-apoptóticas, tais como p53, que mediam a sobrevivência celular (CANCE e GOLUBOVSKAYA, 2008). Interessantemente, nunca fomos bem sucedidos na depleção de ARHGAP21 por shRNAi em linhagens de glioblastoma que apresentam p53 funcional (tais como A172 e U87MG), o que hipotetizamos ser devido à atuação de ARHGAP21 junto ao complexo FAK-p53, mediando o fino balanço entre apoptose e sobrevivência, eventos estes regulados por estas proteínas (CANCE e GOLUBOVSKAYA, 2008). Deste modo, a depleção de ARHGAP21 em células com p53 funcional provavelmente libera p53 do complexo com FAK possibilitando a ativação de proteínas pro-apoptóticas tais como p21 e Bax

(GOLUBOVSKAYA V. M. et al., 2005) resultando, em última instância, em morte celular.

Por outro lado, sabe-se que a proteína FAK promove migração celular pela ativação de diversas vias de sinalização. Uma destas vias utiliza as proteínas da família “CAS” (substratos associados a Crk), que inclui a proteína p130^{CAS}. O domínio SH3 de p130^{CAS} medeia sua associação com as regiões ricas em prolina 2 e 3 (PR-2 e PR-3) de FAK. Esta associação promove a fosforilação de p130^{CAS} pela proteína Src. p130^{CAS} fosforilada recruta as proteínas adaptadoras Crk, resultando na ativação de Rac1, Cdc42 ou JNK (Jun quinase) o que, em última instância, promove a formação de protrusões membranares e migração celular (COX et al., 2006; HSIA et al., 2003). Portanto, a interação de ARHGAP21 com a porção C-terminal de FAK provavelmente impede a associação de p130^{CAS} às regiões ricas em prolinas de FAK e, conseqüentemente bloqueia a ativação de sinais à jusante desta via de sinalização (figura 40A).

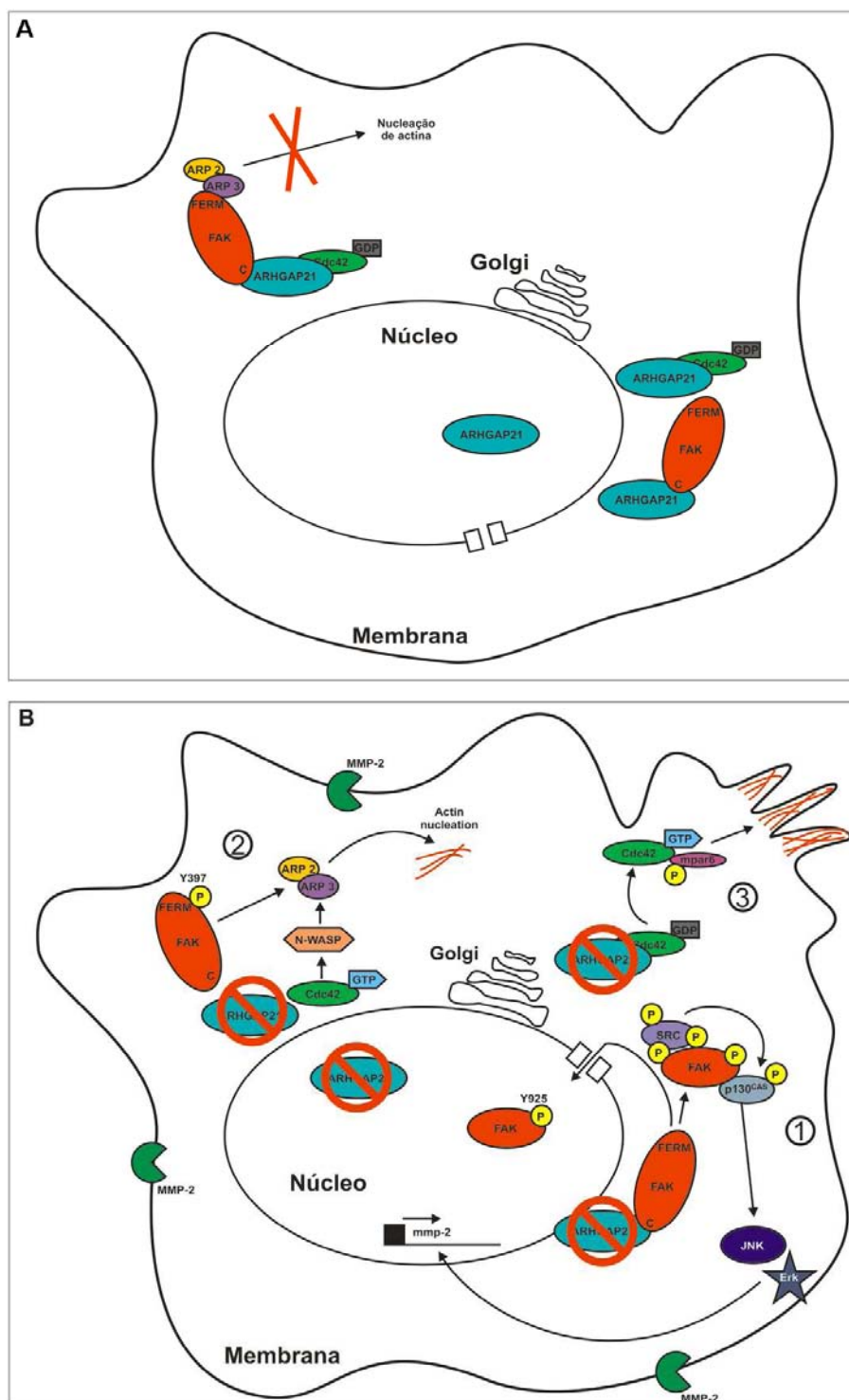


Figura 40: Representação esquemática do mecanismo de atuação de ARHGAP21. ARHGAP21 localiza-se no núcleo e na região peri-nuclear. Sua interação com FAK e seu controle negativo sobre Cdc42 bloqueiam a nucleação de actina pelo complexo Arp2/3 no Golgi. B, a depleção de ARHGAP21 resulta: (1) na fosforilação de FAK com a consequente ativação de p130^{CAS}, culminando na ativação da transcrição de mmp-2; (2) no aumento da atividade de Cdc42,

em paralelo a FAK, resultando na ativação de Arp2/3 e aumento da nucleação de actina; e (3) no aumento de Cdc42 ativa agindo na formação de protrusões membranares.

A depleção de ARHGAP21 em células T98G mostrou alterar drasticamente a morfologia celular desta linhagem e resultar em alterações do citoesqueleto de actina (Figura 40B). Foram caracterizados a perda da actina cortical, o acúmulo de pontos de actina peri-nuclear, a formação de protrusões celulares e a ativação de Cdc42 paralelamente a FAK. O acúmulo peri-nuclear de Cdc42 e de actina se deve provavelmente ao aumento da nucleação de actina nas membranas do Golgi quando ARHGAP21 é depletada, como descrito por Dubois e colaboradores (2005). Ainda, a atividade de Cdc42 foi relatada como sendo dependente de FAK, já que o nocaute de FAK reduz a ativação de p130^{CAS} que, por sua vez, reduz a ativação de Cdc42 (COX et al., 2006; HSIA et al., 2003). Logo, ARHGAP21 pode exercer um controle duplo sobre Cdc42: através de sua atividade RhoGAP e pelo bloqueio da ativação de p130^{CAS}, à jusante de FAK. Além disso, a ação negativa de ARHGAP21 sobre Cdc42 foi previamente relatada como sendo importante para o controle do complexo nucleador de actina Arp2/3, que atua na dinâmica de actina filamentar nas membranas do Golgi (DUBOIS e CHAVRIER, 2005). Interessantemente, o domínio FERM de FAK se liga ao complexo Arp2/3 e a fosforilação do resíduo de tirosina 397 de FAK induz a dissociação do complexo dinâmico FAK-Arp3, resultando na ativação de Arp3 que é necessária ao desenvolvimento de protrusões celulares (SERRELS et al., 2007). Por outro lado, foi sugerido que o complexo FAK/Arp2/3 é desfeito quando Arp3 é ativada por Cdc42-GTP (ativa), o que então permite a ativação de FAK. Nossos resultados corroboram as hipóteses anteriores, já que a perda de ARHGAP21 aumenta Cdc42 ativa, que é então capaz de ativar Arp3 e, conseqüentemente, liberá-la do complexo com FAK possibilitando a fosforilação da tirosina 397 observada por nós (Figura 40B, itens 1 e 2).

Além do exposto acima e conforme observado em nosso estudo, como a interação entre ARHGAP21 e FAK ocorre na região peri-nuclear e como a depleção de ARHGAP21 aumenta os níveis de FAK fosforilada na tirosina Y925 resultando em sua translocação para o núcleo (Figura 40, item 1), nossa hipótese é de que ARHGAP21 sequestre FAK em seu estado inativo na região peri-nuclear. O relato da translocação ao núcleo de uma construção contendo o domínio FAT, no qual reside a tirosina 925 corrobora estes dados (KOVACIC-MILIVOJEVIC et al., 2001). Sabe-se também que

estímulos de estresse ou rompimento da adesão celular desencadeiam o aumento de FAK nuclear (LIM et al., 2008). Portanto, como a depleção de ARHGAP21 é capaz de alterar a composição das junções aderentes em células epiteliais (SOUSA et al., 2005) e nossos dados evidenciaram que em células tumorais há clara alteração da morfologia do citoesqueleto de actina, a alteração da localização de FAK era esperada.

Sabe-se também, que nos tumores cerebrais astrocíticos há elevada expressão de FAK (GIRAULT et al., 1999). A invasão de tecidos cerebrais adjacentes por células transformadas é mediada principalmente pela secreção de metaloproteases de matriz (MMPs), uma família de enzimas capaz de degradar vários componentes da matriz extracelular, tais como colágeno, fibronectina e proteoglicanas (RAO et al., 1993). Há relatos da capacidade de angiopoetina II induzir, em linhagens de glioblastoma, o aumento da expressão de metaloprotease-2 (MMP-2) através da ativação da sinalização FAK→p130^{CAS} (HU et al., 2006). Ainda, a depleção de FAK em linhagens de tumores escamosos de cabeça e pescoço leva à redução da invasibilidade celular via redução da expressão de MMP-2 (CANEL et al., 2008). Dado que a depleção de ARHGAP21 induz um aumento significativo da secreção de MMP-2 e que, com os devidos estímulos de proteínas da matriz, há aumento da secreção de MMP-9, ARHGAP21 pode exercer um papel essencial na modulação da progressão do glioblastoma multiforme através da inativação de Cdc42 e FAK.

Nossos estudos da expressão do gene ARHGAP21 na casuística de astrocitomas e em cortes histológicos de amostras de dois pacientes com astrocitomas graus II e IV demonstraram que o controle da expressão deste gene é pós-transcricional. Além disso, a expressão de ARHGAP21 pareceu ser tanto maior quanto maior o grau do tumor. Tendo em vista nossos dados sobre os efeitos da depleção de ARHGAP21 *in vitro*, a maior expressão de ARHGAP21 em glioblastoma pode indicar ainda um possível último controle negativo de ARHGAP21 sobre a transformação destes tumores.

Com relação às isoformas da proteína ARHGAP21 identificadas por espectrometria de massas pudemos evidenciar que a isoforma de 250 kDa sofre sumoilação por SUMO2/3. Atualmente sabe-se que os níveis de SUMO2/3 nas células são superiores aos de SUMO-1, sugerindo que a modificação de proteínas por SUMO2/3 seja um

evento mais freqüente (SAITOH e HINCHEY, 2000). Além do mais, a conjugação de cadeias poliméricas de SUMO-2 e SUMO-3 já foi constatada como chave em estados patológicos cerebrais tais como na sumoilação massiva de proteínas ocorrida após isquemia cerebral transitória (YANG et al., 2008) e a redução da conversão de APP em peptídeo A β na patologia da doença de Alzheimer devido ao aumento da sumoilação por SUMO2/3 (LI et al., 2003). Sendo assim, a sumoilação de ARHGAP21 em células T98G pode estar relacionada com a tumorigênese destas células, devendo ser verificada sua ocorrência em tecido cerebral normal.

Nosso grupo havia caracterizado também o aumento da expressão do RNAm de ARHGAP21 ao longo da diferenciação de células tronco hematopoiéticas (BASSERES et al., 2002). Portanto, após investigar a expressão do gene *ARHGAP21* em diferentes porções do sistema nervoso central como também em algumas fases do desenvolvimento embrionário e pós-nato de camundongos e evidenciar sua elevada expressão em embriões de 17 dias, apenas no hemisfério direito, resolvemos avaliar se a depleção de ARHGAP21 em células tronco embrionárias murinas poderia afetar a diferenciação neuronal destas células. Nossos resultados, diferentemente do que esperávamos, demonstraram que a depleção deste gene em células tronco embrionárias murinas em nada interferiu em sua diferenciação neuronal, o que não inviabiliza o potencial papel de ARHGAP21 na diferenciação de outros tipos de tecidos, como por exemplo, seu envolvimento na diferenciação hematopoiética.

Sabe-se que ao longo do desenvolvimento do sistema nervoso murino a neurogênese ocorre entre os dias E11 e E17 e que o período de gliogênese sobrepõe-se, pois em E15 já existem precursores astrogliais. Também é sabido que em E17 ocorre a migração dos precursores astrogliais da zona ventricular para as zonas corticais e sub-corticais (YUASA, 2001). Portanto, o aumento da expressão de ARHGAP21 em E17 pode estar relacionado ao final do período de migração dos precursores neurogliais (YUASA, 2001). A expressão do gene *Mmp-2*, que atua no remodelamento do tecido cerebral através do controle da migração de precursores neuronais, demonstrou queda de sua expressão exatamente em E17, dia de desenvolvimento em que há maior expressão de ARHGAP21. Portanto, corroborando nossos dados sobre a depleção de ARHGAP21 *in vitro* com o conseqüente aumento da

secreção de MMP-2 e da migração celular *in vivo*, o aumento da expressão do gene *ARHGAP21* coincide com a redução da expressão de *Mmp-2* e com o término da migração dos precursores neurogliais. Não sabemos ainda o porquê deste aumento de expressão gênica ocorrer somente no hemisfério direito mas sabe-se que os hemisférios cerebrais apresentam algumas funções distintas. Na espécie humana, por exemplo, o hemisfério direito percebe e comanda funções globais, encarregando-se do controle emocional e das capacidades artísticas e espaciais (LENT, 2001). Em roedores há relatos de alterações do controle motor do animal devido à hemisferectomia unilateral direita (FILGUEIRAS et al., 2006). Portanto, podemos especular que o gene *ARHGAP21* murino pode estar relacionado ao controle da movimentação de roedores.

Pelos motivos expostos acima, o modelo de animal nocaute para o gene *ARHGAP21* gerado neste estudo é de grande interesse para uma melhor caracterização de *ARHGAP21* que, como demonstrado em nosso trabalho e nos trabalhos de outros autores (BORGES et al., 2008; DUBOIS e CHAVRIER, 2005; SOUSA et al., 2005), tem importante papel em diversas vias de sinalização intracelular .

6. Conclusões

Por todos os dados apresentados acima conclui-se que:

- 1) ARHGAP21 é uma proteína localizada no núcleo e na região peri-nuclear de várias linhagens, entre elas, linhagens de glioblastomas humanos;
- 2) A expressão gênica de *ARHGAP21* é constitutiva tanto em linhagens de glioblastoma *in vitro* como em amostras de pacientes com astrocitomas (graus I a IV);
- 3) A proteína ARHGAP21 apresenta três isoformas de pesos moleculares aproximados: 150, 200 e 250 kDa. Quando células de glioblastoma A172 e T98G são cultivadas em Matrigel por 7 dias ocorre transição da banda de 200 kDa para a de 150 kDa. A isoforma de 250 kDa corresponde à ARHGAP21 sumoilada por SUMO2/3, o que pode ser devido ao caráter maligno de células T98G já que a adição de SUMO2/3 relaciona-se a isquemia cerebral e a outras patologias cerebrais;
- 4) ARHGAP21 interage com a porção C-terminal de FAK, seqüestrando-a em um estado inativo na região peri-nuclear;
- 5) Os resultados da depleção de ARHGAP21 por moléculas de shRNAi indicaram que ARHGAP21 inibe a migração de células derivadas de glioblastoma multiforme *in vitro*. Esta inibição é mediada pelo controle negativo de ARHGAP21 sobre Cdc42, pela inativação da sinalização FAK→p130^{CAS}, e pelo controle da secreção de metaloproteases-2 e 9.
- 6) A expressão da proteína ARHGAP21 correlaciona-se com o grau tumoral de astrocitomas *in vivo*, indicando a existência de um possível controle negativo de ARHGAP21 sobre a transformação destas células, já que sua depleção *in vitro* demonstrou correlação negativa já que resultou em aumento do grau tumoral das células T98G;
- 7) O gene *ARHGAP21* apresenta elevada expressão em córtex e cerebelo humanos e durante o desenvolvimento embrionário murino, principalmente no 17º dia embrionário em hemisfério direito, justamente quando há uma queda de expressão do gene que codifica a metaloprotease 2 (*Mmp-2*). Estes eventos coincidem com o término da migração dos precursores neurogliais e, portanto, ARHGAP21 demonstra, em sistema nervoso normal, correlação semelhante com a expressão do gene *mmp-2* ao observado em linhagens de glioblastoma.

8) ARHGAP21 não somente exerce papel importante no controle da agressividade dos glioblastoma, mas nossos resultados indicam que a proteína ARHGAP21 pode ser uma poderosa reguladora da migração celular em diferentes tecidos e, assim, ter papel crucial no controle da progressão de diferentes tipos tumorais.

7. Referências Bibliográficas

BASSERES, D. S., TIZZEI, E. V., DUARTE, A. A., COSTA, F. F., SAAD, S. T. ARHGAP10, a novel human gene coding for a potentially cytoskeletal Rho-GTPase activating protein. **Biochem Biophys Res Commun** 2002;294(3):579-85.

BIANCHI, M., DE LUCCHINI, S., MARIN, O., TURNER, D. L., HANKS, S. K., VILLAMORUZZI, E. Regulation of FAK Ser-722 phosphorylation and kinase activity by GSK3 and PP1 during cell spreading and migration. **Biochem J** 2005;391(Pt 2):359-70.

BIBEL, M., RICHTER, J., LACROIX, E., BARDE, Y. A. Generation of a defined and uniform population of CNS progenitors and neurons from mouse embryonic stem cells. **Nat Protoc** 2007;2(5):1034-43.

BORGES, L., BIGARELLA, C. L., BARATTI, M. O., CROSARA-ALBERTO, D. P., JOAZEIRO, P. P., FRANCHINI, K. G., et al. ARHGAP21 associates with FAK and PKCzeta and is redistributed after cardiac pressure overload. **Biochem Biophys Res Commun** 2008;374(4):641-6.

BRAKEBUSCH, C., BOUVARD, D., STANCHI, F., SAKAI, T., FASSLER, R. Integrins in invasive growth. **J Clin Invest** 2002;109(8):999-1006.

BRUNTON, V. G., AVIZIENYTE, E., FINCHAM, V. J., SERRELS, B., METCALF, C. A., 3RD, SAWYER, T. K., et al. Identification of Src-specific phosphorylation site on focal adhesion kinase: dissection of the role of Src SH2 and catalytic functions and their consequences for tumor cell behavior. **Cancer Res** 2005;65(4):1335-42.

CANCE, W. G., GOLUBOVSKAYA, V. M. Focal adhesion kinase versus p53: apoptosis or survival? **Sci Signal** 2008;1(20):pe22.

CANEL, M., SECADES, P., GARZON-ARANGO, M., ALLONCA, E., SUAREZ, C., SERRELS, A., et al. Involvement of focal adhesion kinase in cellular invasion of head and neck squamous cell carcinomas via regulation of MMP-2 expression. **Br J Cancer** 2008;98(7):1274-84.

CARLES, A., MILLON, R., CROMER, A., GANGULI, G., LEMAIRE, F., YOUNG, J., et al. Head and neck squamous cell carcinoma transcriptome analysis by comprehensive validated differential display. **Oncogene** 2006;25(12):1821-31.

CARY, L. A., HAN, D. C., POLTE, T. R., HANKS, S. K., GUAN, J. L. Identification of p130Cas as a mediator of focal adhesion kinase-promoted cell migration. **J Cell Biol** 1998;140(1):211-21.

CHO, S. Y., KLEMKE, R. L. Extracellular-regulated kinase activation and CAS/Crk coupling regulate cell migration and suppress apoptosis during invasion of the extracellular matrix. **J Cell Biol** 2000;149(1):223-36.

COOPER, L. A., SHEN, T. L., GUAN, J. L. Regulation of focal adhesion kinase by its amino-terminal domain through an autoinhibitory interaction. **Mol Cell Biol** 2003;23(22):8030-41.

COX, B. D., NATARAJAN, M., STETTNER, M. R., GLADSON, C. L. New concepts regarding focal adhesion kinase promotion of cell migration and proliferation. **J Cell Biochem** 2006;99(1):35-52.

DANG, D., BAMBURG, J. R., RAMOS, D. M. Alpha β 3 integrin and cofilin modulate K1735 melanoma cell invasion. **Exp Cell Res** 2006;312(4):468-77.

DEMUTH, T., BERENS, M. E. Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. **J Neurooncol** 2004;70(2):217-28.

DOLFI, F., GARCIA-GUZMAN, M., OJANIEMI, M., NAKAMURA, H., MATSUDA, M., VUORI, K. The adaptor protein Crk connects multiple cellular stimuli to the JNK signaling pathway. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1998;95(26):15394-9.

DUBOIS, T., CHAVRIER, P. [ARHGAP10, a novel RhoGAP at the cross-road between ARF1 and Cdc42 pathways, regulates Arp2/3 complex and actin dynamics on Golgi membranes]. **Med Sci (Paris)** 2005;21(8-9):692-4.

FASHENA, S. J., EINARSON, M. B., O'NEILL, G. M., PATRIOTIS, C., GOLEMIS, E. A. Dissection of HEF1-dependent functions in motility and transcriptional regulation. **J Cell Sci** 2002;115(Pt 1):99-111.

FILGUEIRAS, C. C., ABREU-VILLACA, Y., KRAHE, T. E., MANHAES, A. C. Unilateral hemispherectomy at adulthood asymmetrically affects immobile behavior of male Swiss mice. **Behav Brain Res** 2006;172(1):33-8.

FURNARI, F. B., FENTON, T., BACHOO, R. M., MUKASA, A., STOMMEL, J. M., STEGH, A., et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. **Genes Dev** 2007;21(21):2683-710.

FURUTA, M., WEIL, R. J., VORTMEYER, A. O., HUANG, S., LEI, J., HUANG, T. N., et al. Protein patterns and proteins that identify subtypes of glioblastoma multiforme. **Oncogene** 2004;23(40):6806-14.

GABARRA-NIECKO, V., SCHALLER, M. D., DUNTY, J. M. FAK regulates biological processes important for the pathogenesis of cancer. **Cancer Metastasis Rev** 2003;22(4):359-74.

GAMBLIN, S. J., SMERDON, S. J. GTPase-activating proteins and their complexes. **Curr Opin Struct Biol** 1998;8(2):195-201.

GIRAULT, J. A., COSTA, A., DERKINDEREN, P., STUDLER, J. M., TOUTANT, M. FAK and PYK2/CAKbeta in the nervous system: a link between neuronal activity, plasticity and survival? **Trends Neurosci** 1999;22(6):257-63.

GODARD, S., GETZ, G., DELORENZI, M., FARMER, P., KOBAYASHI, H., DESBAILLETS, I., et al. Classification of human astrocytic gliomas on the basis of gene expression: a correlated group of genes with angiogenic activity emerges as a strong predictor of subtypes. **Cancer Res** 2003;63(20):6613-25.

GOLUBOVSKAYA, V., KAUR, A., CANCE, W. Cloning and characterization of the promoter region of human focal adhesion kinase gene: nuclear factor kappa B and p53 binding sites. **Biochim Biophys Acta** 2004;1678(2-3):111-25.

GOLUBOVSKAYA, V. M., CANCE, W. G. Focal adhesion kinase and p53 signaling in cancer cells. **Int Rev Cytol** 2007;263(103-53).

GOLUBOVSKAYA, V. M., FINCH, R., CANCE, W. G. Direct interaction of the N-terminal domain of focal adhesion kinase with the N-terminal transactivation domain of p53. **J Biol Chem** 2005;280(26):25008-21.

GOLUBOVSKAYA, V. M., FINCH, R., KWEH, F., MASSOLL, N. A., CAMPBELL-THOMPSON, M., WALLACE, M. R., et al. p53 regulates FAK expression in human tumor cells. **Mol Carcinog** 2008;47(5):373-82.

HALL, A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. **Science** 1998;279(5350):509-14.

HSIA, D. A., MITRA, S. K., HAUCK, C. R., STREBLOW, D. N., NELSON, J. A., ILIC, D., et al. Differential regulation of cell motility and invasion by FAK. **J Cell Biol** 2003;160(5):753-67.

HU, B., JARZYNSKA, M. J., GUO, P., IMANISHI, Y., SCHLAEPFER, D. D., CHENG, S. Y. Angiopoietin 2 induces glioma cell invasion by stimulating matrix metalloprotease 2 expression through the alphavbeta1 integrin and focal adhesion kinase signaling pathway. **Cancer Res** 2006;66(2):775-83.

HYNES, R. O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. **Cell** 2002;110(6):673-87.

ISPANOVIC, E., SERIO, D., HAAS, T. L. Cdc42 and RhoA have opposing roles in regulating membrane type 1-matrix metalloproteinase localization and matrix metalloproteinase-2 activation. **Am J Physiol Cell Physiol** 2008;295(3):C600-10.

KANDPAL, R. P. Rho GTPase activating proteins in cancer phenotypes. **Curr Protein Pept Sci** 2006;7(4):355-65.

KIM, S. H., LI, Z., SACKS, D. B. E-cadherin-mediated cell-cell attachment activates Cdc42. **J Biol Chem** 2000;275(47):36999-7005.

KIYOKAWA, E., HASHIMOTO, Y., KOBAYASHI, S., SUGIMURA, H., KURATA, T., MATSUDA, M. Activation of Rac1 by a Crk SH3-binding protein, DOCK180. **Genes Dev** 1998;12(21):3331-6.

KJELDSEN, L., JOHNSEN, A. H., SENGELOV, H., BORREGAARD, N. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. **J Biol Chem** 1993;268(14):10425-32.

KLEIHUES, P., LOUIS, D. N., SCHEITHAUER, B. W., RORKE, L. B., REIFENBERGER, G., BURGER, P. C., et al. The WHO classification of tumors of the nervous system. **J Neuropathol Exp Neurol** 2002;61(3):215-25; discussion 26-9.

KLEIHUES, P., OHGAKI, H. Phenotype vs genotype in the evolution of astrocytic brain tumors. **Toxicol Pathol** 2000;28(1):164-70.

KLEMKE, R. L., LENG, J., MOLANDER, R., BROOKS, P. C., VUORI, K., CHERESH, D. A. CAS/Crk coupling serves as a "molecular switch" for induction of cell migration. **J Cell Biol** 1998;140(4):961-72.

KOVACIC-MILIVOJEVIC, B., ROEDIGER, F., ALMEIDA, E. A., DAMSKY, C. H., GARDNER, D. G., ILIC, D. Focal adhesion kinase and p130Cas mediate both sarcomeric organization and activation of genes associated with cardiac myocyte hypertrophy. **Mol Biol Cell** 2001;12(8):2290-307.

LAMARCHE, N., HALL, A. GAPs for rho-related GTPases. **Trends Genet** 1994;10(12):436-40.

LI, Y., WANG, H., WANG, S., QUON, D., LIU, Y. W., CORDELL, B. Positive and negative regulation of APP amyloidogenesis by sumoylation. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2003;100(1):259-64.

LIM, S. T., MIKOLON, D., STUPACK, D. G., SCHLAEPFER, D. D. FERM control of FAK function: implications for cancer therapy. **Cell Cycle** 2008;7(15):2306-14.

LUO, L. Rho GTPases in neuronal morphogenesis. **Nat Rev Neurosci** 2000;1(3):173-80.

MA, A., RICHARDSON, A., SCHAEFER, E. M., PARSONS, J. T. Serine phosphorylation of focal adhesion kinase in interphase and mitosis: a possible role in modulating binding to p130(Cas). **Mol Biol Cell** 2001;12(1):1-12.

MAHER, E. A., FURNARI, F. B., BACHOO, R. M., ROWITCH, D. H., LOUIS, D. N., CAVENEE, W. K., et al. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. **Genes Dev** 2001;15(11):1311-33.

MIRZAYANS, R., SCOTT, A., CAMERON, M., MURRAY, D. Induction of accelerated senescence by gamma radiation in human solid tumor-derived cell lines expressing wild-type TP53. **Radiat Res** 2005;163(1):53-62.

MISCHEL, P. S., CLOUGHESY, T. F. Targeted molecular therapy of GBM. **Brain Pathol** 2003;13(1):52-61.

MITRA, S. K., HANSON, D. A., SCHLAEPFER, D. D. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2005;6(1):56-68.

MON, N. N., HASEGAWA, H., THANT, A. A., HUANG, P., TANIMURA, Y., SENG, T., et al. A role for focal adhesion kinase signaling in tumor necrosis factor- α -dependent matrix metalloproteinase-9 production in a cholangiocarcinoma cell line, CCKS1. **Cancer Res** 2006;66(13):6778-84.

MOON, S. Y., ZHENG, Y. Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. **Trends Cell Biol** 2003;13(1):13-22.

MUIR, D., SUKHU, L., JOHNSON, J., LAHORRA, M. A., MARIA, B. L. Quantitative methods for scoring cell migration and invasion in filter-based assays. **Anal Biochem** 1993;215(1):104-9.

NAKAGAWA, T., KUBOTA, T., KABUTO, M., FUJIMOTO, N., OKADA, Y. Secretion of matrix metalloproteinase-2 (72 kD gelatinase/type IV collagenase = gelatinase A) by malignant human glioma cell lines: implications for the growth and cellular invasion of the extracellular matrix. **J Neurooncol** 1996;28(1):13-24.

NATARAJAN, M., STEWART, J. E., GOLEMIS, E. A., PUGACHEVA, E. N., ALEXANDROPOULOS, K., COX, B. D., et al. HGF is a necessary and specific downstream effector of FAK that promotes the migration of glioblastoma cells. **Oncogene** 2006;25(12):1721-32.

NORD, A. S., CHANG, P. J., CONKLIN, B. R., COX, A. V., HARPER, C. A., HICKS, G. G., et al. The International Gene Trap Consortium Website: a portal to all publicly available gene trap cell lines in mouse. **Nucleic Acids Res** 2006;34(Database issue):D642-8.

NOURRY, C., GRANT, S. G., BORG, J. P. PDZ domain proteins: plug and play! **Sci STKE** 2003;2003(179):RE7.

OHGAKI, H., DESSEN, P., JOURDE, B., HORSTMANN, S., NISHIKAWA, T., DI PATRE, P. L., et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. **Cancer Res** 2004;64(19):6892-9.

OHGAKI, H., KLEIHUES, P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. **Am J Pathol** 2007;170(5):1445-53.

OHGAKI, H., KLEIHUES, P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. **J Neuropathol Exp Neurol** 2005;64(6):479-89.

OLOFSSON, B. Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. **Cell Signal** 1999;11(8):545-54.

PECK, J., DOUGLAS, G. T., WU, C. H., BURBELO, P. D. Human RhoGAP domain-containing proteins: structure, function and evolutionary relationships. **FEBS Lett** 2002;528(1-3):27-34.

PEREGO, C., VANONI, C., MASSARI, S., RAIMONDI, A., POLA, S., CATTANEO, M. G., et al. Invasive behaviour of glioblastoma cell lines is associated with altered organisation of the cadherin-catenin adhesion system. **J Cell Sci** 2002;115(Pt 16):3331-40.

POVEY, S., LOVERING, R., BRUFORD, E., WRIGHT, M., LUSH, M., WAIN, H. The HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC). **Hum Genet** 2001;109(6):678-80.

RAO, J. S., STECK, P. A., MOHANAM, S., STETLER-STEVENSON, W. G., LIOTTA, L. A., SAWAYA, R. Elevated levels of M(r) 92,000 type IV collagenase in human brain tumors. **Cancer Res** 1993;53(10 Suppl):2208-11.

REN, X. D., KIOSSES, W. B., SCHWARTZ, M. A. Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. **Embo J** 1999;18(3):578-85.

SAITOH, H., HINCHEY, J. Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. **J Biol Chem** 2000;275(9):6252-8.

SANDER, E. E., VAN DELFT, S., TEN KLOOSTER, J. P., REID, T., VAN DER KAMMEN, R. A., MICHIELS, F., et al. Matrix-dependent Tiam1/Rac signaling in epithelial cells promotes either cell-cell adhesion or cell migration and is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase. **J Cell Biol** 1998;143(5):1385-98.

SARAS, J., HELDIN, C. H. PDZ domains bind carboxy-terminal sequences of target proteins. **Trends Biochem Sci** 1996;21(12):455-8.

SCHALLER, M. D., HILDEBRAND, J. D., SHANNON, J. D., FOX, J. W., VINES, R. R., PARSONS, J. T. Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. **Mol Cell Biol** 1994;14(3):1680-8.

SCHALLER, M. D., OTEY, C. A., HILDEBRAND, J. D., PARSONS, J. T. Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains. **J Cell Biol** 1995;130(5):1181-7.

SCHLAEPFER, D. D., MITRA, S. K. Multiple connections link FAK to cell motility and invasion. **Curr Opin Genet Dev** 2004;14(1):92-101.

SHI, Q., HJELMELAND, A. B., KEIR, S. T., SONG, L., WICKMAN, S., JACKSON, D., et al. A novel low-molecular weight inhibitor of focal adhesion kinase, TAE226, inhibits glioma growth. **Mol Carcinog** 2007;46(6):488-96.

SOUSA, S., CABANES, D., ARCHAMBAUD, C., COLLAND, F., LEMICHEZ, E., POPOFF, M., et al. ARHGAP10 is necessary for alpha-catenin recruitment at adherens junctions and for Listeria invasion. **Nat Cell Biol** 2005;7(10):954-60.

STEWART, L. A. Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. **Lancet** 2002;359(9311):1011-8.

STRAUSBERG, R. L., CAMARGO, A. A., RIGGINS, G. J., SCHAEFER, C. F., DE SOUZA, S. J., GROUSE, L. H., et al. An international database and integrated analysis tools for the study of cancer gene expression. **Pharmacogenomics J** 2002;2(3):156-64.

TSO, C. L., FREIJE, W. A., DAY, A., CHEN, Z., MERRIMAN, B., PERLINA, A., et al. Distinct transcription profiles of primary and secondary glioblastoma subgroups. **Cancer Res** 2006;66(1):159-67.

WANG, Y., KONG, W., YUE, J., SUN, D., LI, W., YAO, Q., et al. Vascular endothelial growth factor165-regulated nasopharyngeal carcinoma cell lines invasion and migration involve expression and activation of matrix metalloproteinase-2. **J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci** 2006;26(5):621-4.

YAMAGUCHI, H., LORENZ, M., KEMPIAK, S., SARMIENTO, C., CONIGLIO, S., SYMONS, M., et al. Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin. **J Cell Biol** 2005;168(3):441-52.

YAMAKITA, Y., TOTSUKAWA, G., YAMASHIRO, S., FRY, D., ZHANG, X., HANKS, S. K., et al. Dissociation of FAK/p130(CAS)/c-Src complex during mitosis: role of mitosis-specific serine phosphorylation of FAK. **J Cell Biol** 1999;144(2):315-24.

YANG, W., SHENG, H., WARNER, D. S., PASCHEN, W. Transient global cerebral ischemia induces a massive increase in protein sumoylation. **J Cereb Blood Flow Metab** 2008;28(2):269-79.

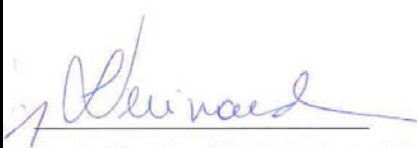
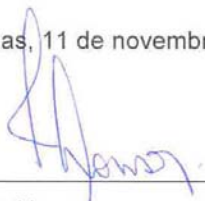
YAO, I., HATA, Y., IDE, N., HIRAO, K., DEGUCHI, M., NISHIOKA, H., et al. MAGUIN, a novel neuronal membrane-associated guanylate kinase-interacting protein. **J Biol Chem** 1999;274(17):11889-96.

YUASA, S. Development of astrocytes in the mouse embryonic cerebrum tracked by tenascin-C gene expression. **Arch Histol Cytol** 2001;64(1):119-26.

ZHENG, Y. Dbl family guanine nucleotide exchange factors. **Trends Biochem Sci** 2001;26(12):724-32.

8. Anexos

8.1 ANEXO 1 – Parecer do Comitê de Ética na Experimentação Animal

	
Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEAA/Unicamp	
CERTIFICADO	
Certificamos que o Protocolo nº <u>1633-1</u>, sobre "<u>Análise da expressão e função da nova RhoGAP, ARHGAP21, em sistema nervoso</u>", sob a responsabilidade de <u>Profa. Dra. Sara Teresinha Olalla Saad / Carolina Louzão Bigarella</u>, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEAA/Unicamp em <u>11 de novembro de 2008</u>.	
CERTIFICATE	
We certify that the protocol nº <u>1633-1</u>, entitled "<u>Expression and functional analysis of the novel RhoGAP, ARHGAP21, in nervous system</u>", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on <u>November 11, 2008</u>.	
	
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo Presidente	Fátima Alonso Secretária Executiva
CEEAA – Unicamp Caixa Postal 6109 13083-970 Campinas, SP – Brasil	Telefone: (19) 3521-6359 E-mail: comisib@unicamp.br http://www.ib.unicamp.br/ceea/

8.2 ANEXO 2 – Artigos publicado e aceito para publicação

Biochemical and Biophysical Research Communications 374 (2008) 641–646



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc



ARHGAP21 associates with FAK and PKC ζ and is redistributed after cardiac pressure overload

Luciene Borges^a, Carolina Louzão Bigarella^a, Mariana Ozello Baratti^a, Daniella P. Crosara-Alberto^a, Paulo P. Joazeiro^b, Kleber G. Franchini^c, Fernando F. Costa^a, Sara Teresinha Olalla Saad^{a,*}

^a Department of Internal Medicine, Hematology and Hemotherapy Center, School of Medical Science, University of Campinas—UNICAMP, Campinas, São Paulo 13083-970, Brazil
^b Department of Histology and Embryology, UNICAMP, Brazil
^c Department of Internal Medicine, Cardiology, UNICAMP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 1 July 2008
Available online 26 July 2008

Keywords:
ARHGAP21
Cardiomyocyte
Acute mechanical stress
Rat
Cell signaling

ABSTRACT

ARHGAP21 is highly expressed in the heart, which demonstrates activity over Cdc42 and interacts with proteins of the cytoskeleton and adherent junctions. The main cause of cardiac hypertrophy is mechanical stimulus; therefore we analyzed ARHGAP21 expression after acute mechanical stress in the myocardium and its association with FAK and PKC ζ . We demonstrated that ARHGAP21 is relocated to Z-lines and costameres after pressure overload, and interacts with PKC ζ and FAK in control rats (sham), rats submitted to aortic clamping and spontaneously hypertensive rats (SHR). Co-transfection using ARHGAP21 and PKC ζ constructions demonstrated that ARHGAP21 associates with PKC ζ -GST and endogenous FAK. Pull-down assay showed that ARHGAP21 binds to the C-terminal region of FAK. Moreover, ARHGAP21 binds to PKC ζ phosphorylated on Thr410 in sham and SHR. However, ARHGAP21 only binds to FAK phosphorylated on Tyr925 of SHR. Additionally, PKC ζ is phosphorylated by mechanical stimuli. These results suggest that ARHGAP21 may act as a signaling or scaffold protein of FAK and PKC ζ signaling pathways, developing an important function during cardiac stress.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

The recently described member of RhoGAPs, ARHGAP21, codes for 1957aa protein with PDZ, pleckstrin homology (PH) and RhoGAP domains [1]. Although this gene is highly expressed in brain, skeletal, and cardiac muscles, there are few reports regarding ARHGAP21, and none regarding function in the heart. ARHGAP21 is located in nucleus, juxtanuclear, and adherent junctions of several cell lines, acting preferentially upon Cdc42 and RhoA, which have a fundamental participation during cardiac hypertrophy [2,3]. Moreover, ARHGAP21 interacts with ARF1, ARF6, and α -catenin, important proteins in cytoskeleton and adherent junctions [4,5], suggesting that this protein may play a crucial role in the signaling cascade activated by cardiac hypertrophic stimuli.

Cardiac hypertrophy involves different stimuli, e.g., neurohumoral activation, growth factors, cytokines, and mechanical stress [6]. A primary event that triggers cardiac hypertrophy is pressure

overload, which imposes a mechanical stress on cardiac walls affecting pathways such as proliferation, differentiation, growth, and cellular survival. Protein complexes involved in these events engage members of the small GTPases, such as RhoA, Rac1, and Cdc42. Focal adhesion kinase (FAK) controls the cardiac hypertrophic genetic program, growth and cardiac cell survival, with phosphorylation state and activity tightly linked to cardiac stress after pressure overload [7–9]. PKC ζ is a regulator of cardiomyocyte myofilament protein phosphorylation [10], but PKC ζ participation in cardiac remodeling process is controversial. However, PKC ζ involvement in MAPK and NF κ B pathways [11,12], well-known proteins implicated in cardiac hypertrophy, indicates that PKC ζ might play an important role during the hypertrophic process.

Herein, we demonstrated that ARHGAP21 relocates from the nucleus to cardiomyocyte Z-lines and costameres after pressure overload, implying a possible role of ARHGAP21 in mechanical stress. Additionally, ARHGAP21 interacts with PKC ζ and the carboxyl-terminal portion of FAK in NWR, SHR, and animals submitted to aortic clamping (AoCo).

Materials and methods

Experimental animal model. Male Wistar rats (160–200 g) underwent acute pressure overload induced by controlled constriction of

Abbreviations: LV, left ventricle; NWR, normal Wistar rats; SHR, spontaneously hypertensive rats; RhoGAP, Rho GTPase activating protein; PKC ζ , zeta isotype of protein kinase C; FAK, focal adhesion kinase; FAT, focal adhesion targeting; FERM, band 4.1, ezrin, radixin, moesin; MAPK, mitogen-activated protein kinase; PIP3, phosphatidylinositol phosphate-3,4,5-triphosphate; NF κ B, nuclear factor kappa B.

* Corresponding author. Address: Hemocentro—UNICAMP, R. Carlos Chagas, 480, Cidade Universitária “Zeferino Vaz”, CEP 13083-970, Campinas/SP, Brazil. Fax: +55 19 3289 1089.

E-mail address: sara@unicamp.br (S.T.O. Saad).

0006-291X/\$ - see front matter © 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.bbrc.2008.07.085



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbamcr

ARHGAP21 modulates FAK activity and impairs glioblastoma cell migration

Carolina Louzão Bigarella, Luciene Borges, Fernando Ferreira Costa, Sara Terezinha Olalla Saad *

Department of Internal Medicine, School of Medical Science, Hematology and Hemotherapy Center – Hemocentro, University of Campinas - UNICAMP, Campinas, São Paulo 13083-970, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 September 2008

Received in revised form 8 January 2009

Accepted 13 February 2009

Available online xxxx

Keywords:

ARHGAP21

Glioblastoma multiforme (GBM)

FAK

Migration

ABSTRACT

Glioblastoma multiforme is highly aggressive and is the most common glial tumor type. Although there have been advances in treatment, the average survival expectancy is 12–15 months. Several genes have been shown to influence glioblastoma progression. In the present work, we demonstrate that the RhoGTPase Activating Protein 21 (ARHGAP21) is expressed in the nuclear and perinuclear regions of several cell lines. In T98G and U138MG, glioblastoma derived cell lines, ARHGAP21 interacts with the C-terminal region of Focal Adhesion Kinase (FAK). ARHGAP21 depletion by shRNAi in T98G cells alters cellular morphology and increases FAK phosphorylation states and activation of downstream signaling; the activity state of Cdc42; the production of metalloproteinase 2 (MMP-2) and cell migration rates. These modifications were found to be mainly due to the loss of ARHGAP21 action on FAK and, consequently, the activation of downstream effectors. These results suggest not only that ARHGAP21 might act as a tumor suppressor gene, but also indicate that ARHGAP21 might be a master regulator of migration having a crucial role in controlling the progression of different tumor types.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The Rho-family GTPases are the main regulators of actin cytoskeleton dynamics [1]. These molecules cycle between an active GTP-bound form and an inactive GDP-bound form. This cycle is controlled by guanine nucleotide exchange factors (RhoGEFs), positive regulators that promote the release of bound GDP and facilitate GTP binding [2], guanine nucleotide dissociation inhibitors (RhoGDIs), which sequester the GDP-bound form of RhoGTPase and may also regulate their intracellular localization [3], and by GTPase activating proteins (RhoGAPs), negative regulators that increase the intrinsic GTPase activity of the RhoGTPase [4].

Currently, over 70 RhoGAP proteins encoded by the human genome have been described [5]. An important member is ARHGAP21, a protein identified in a Brazilian cancer EST database that contains, in addition to its RhoGAP domain, a Pleckstrin Homology domain (PH) and a PSD-95/Disks-large/ZO-1 (PDZ) domain [6]. As PDZ domains are commonly conserved protein–protein interaction domains found in organisms ranging from bacteria to humans [7] and as the modular structures of GAPs are important for their interaction with other

proteins [5], ARHGAP21 is thought to have additional functions other than the negative control of RhoGTPases. In fact, recently, ARHGAP21 was shown not only to have preferential GAP activity over Cdc42, but also to bind to ARF1-GTPase to control vesicular trafficking on Golgi membranes, and to interact with α -catenin, recruiting this protein to endothelial sites of bacterial invasion [8]. Thus, ARHGAP21 is being characterized as a controller of actin cytoskeleton dynamics.

Glioblastoma multiforme (GBM; astrocytoma WHO grade 4) is a highly malignant brain tumor that accounts for over 50% of all glial tumor types, with a median survival rate of under 1 year [9]. Current treatments of these tumors include surgery followed by radiation and chemotherapy with highly toxic, non-specific agents [10]. The key contributor to treatment failure is the high capacity of malignant gliomas to infiltrate and invade adjacent brain structures, which renders surgical removal difficult [11]. Therefore, if novel targets for therapy design are to be identified, a better understanding of the molecular mechanisms that control glioblastoma cell migration is imperative.

Given the importance of RhoGAPs in inhibiting actin dynamics and the high levels of ARHGAP21 in the normal human brain [6], we postulated that ARHGAP21 might play an important role in glioblastoma cell migration. In agreement with our hypothesis, we found that ARHGAP21 interacts with the Focal Adhesion Kinase (FAK) in glioblastoma cell lines (T98G and U138MG), and that its knockdown in T98G cells leads to increased cellular migratory properties; furthermore, the pathways leading to this event are mediated by FAK and Cdc42 increased activity states. Our results identify ARHGAP21 as

* Corresponding author. Department of Internal Medicine, Hematology and Hemotherapy Center, University of Campinas, Rua Carlos Chagas 480, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Barão Geraldo, CEP 13083-970, Caixa Postal 6198, Campinas-SP, Brazil. Fax: +55 19 3289 1089.

E-mail addresses: carolbiga@yahoo.com.br (C.L. Bigarella), sara@unicamp.br (S.T.O. Saad).