

Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia

Ariane da Silva Furlan

Functional and structural studies of proteins involved in
the development and nerve signaling: FEZ1, SCOC
and RARA

Estudos funcionais e estruturais de proteínas
envolvidas no desenvolvimento e sinalização nervosa:
FEZ1, SCOC e RARA

Campinas
2013

Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia

Ariane da Silva Furlan

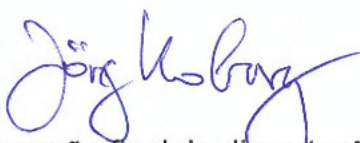
Functional and structural studies of proteins involved in the
development and nerve signaling: FEZ1, SCOC and RARA

Estudos funcionais e estruturais de proteínas envolvidas no
desenvolvimento e sinalização nervosa: FEZ1, SCOC e RARA

Dissertation presented to
the Biology Institute of
University of Campinas in
partial fulfillments of the
requirements for the degree In
Master of Functional and
Molecular Biology, area of
Biochemistry

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biologia para a
obtenção do Título de Mestra
em Biologia Funcional e
Molecular, na área de
Bioquímica

Orientador: Dr. Jörg Kobarg



Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pela aluna
Ariane da Silva Furlan, orientada pelo Dr. Jörg Kobarg e aprovada pela
Comissão Julgadora

Campinas
2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

F978e Furlan, Ariane Silva, 1986-
Estudos funcionais e estruturais de proteínas envolvidas no desenvolvimento e sinalização nervosa : FEZ1, SCOC e RARA / Ariane da Silva Furlan. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Jörg Kobarg.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Proteína FEZ1 humana. 2. Proteína SCOC humana. 3. Receptor de ácido retinóico alfa. I. Kobarg, Jörg. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Structural and functional studies of proteins involved in the development and nerve signaling : FEZ1, SCOC e RARA

Palavras-chave em inglês:

FEZ1 protein, human

SCOC protein, human

Retinoic acid receptor alpha

Área de concentração: Biologia Funcional e Molecular

Titulação: Mestra em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Jörg Kobarg [Orientador]

Andrea Balan Fernandes

David Neves

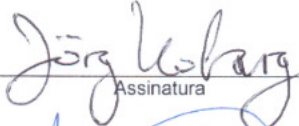
Data de defesa: 10-05-2013

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

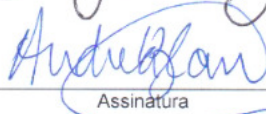
Campinas, 10 de Maio de 2013

BANCA EXAMINADORA


Dr. Jörg Kobarg (Orientador)


Assinatura

Dra. Andréa Balan Fernandes


Assinatura

Dr. David Neves


Assinatura

Profa. Dra. Dora Maria Grassi Kassis

Assinatura

Prof. Dr. Vadim Viviani

Assinatura

Índice

Agradecimentos-----	ix
Lista de Abreviações e Siglas -----	-xiii
Resumo -----	xvi
Abstract -----	xvii
1. Introdução -----	1
1.1 A origem da família FEZ -----	1
1.2 Proteínas Unc envolvidas na crescimento e orientação de neuritos -----	2
1.3 A proteína humana SCOC -----	5
1.4 FEZ1 e SCOC formando um complexo -----	7
1.5 O papel do ácido retinóico no desenvolvimento do sistema nervoso -----	9
1.6 FEZ1 e a transcrição -----	12
2. Objetivos -----	15
2.1 Objetivos gerais -----	15
2.2 Objetivos específicos -----	15
3. Metodologia -----	17
3.1 Ensaio preparatórios de Biologia Molecular: clonagem, expressão e purificação de proteínas -----	17
3.1.1 Clonagem -----	17
3.1.2 Expressão e purificação de proteínas: 6xHisFEZ1, 6xHisSCOC e 6xHisRARA -----	19
3.2 Gel nativo -----	20
3.3 Cross Linking -----	20
3.3.1 Digestão das bandas com tripsina -----	20
3.4 Ensaio de Cristalização de 6xHisSCOC (42-122) -----	20
3.5 Ensaio de Hibridização de RNA <i>in situ</i> (ISH) -----	21
3.6 Ensaio em cultura de células imortalizadas HEK 293 -----	22
3.6.1 Imunocitoquímica: fixação e marcação com anticorpo -----	22
3.6.2 Imunoprecipitação -----	23
3.6.2.1 Western Blot da imunoprecipitação -----	23
3.7 Transativação de luciferase (firefly) com receptor do ácido retinóico -----	24

3.7.1 Lise, adição de substrato de luciferase (luciferina) e leitura da Luminescência	----- 26
3.8 Anisotropia de fluorêscencia	-----26
3.8.1 Marcação de RARA DL com sonda fluoresceína FITC	----- 26
3.8.2 Ensaio de titulação da interação de FEZ1 e RARA DL e leitura de Fluorêscencia	-----27
3.8.3 Ensaio de titulação da interação de DR5, RARA DL e FEZ1 e leitura de fluorescência	
-----	27
3.9 Emprego do sistema de duplo-híbrido para identificação de proteínas que interagem com SCOC	----- 28
3.9.1 Pré-screening: Transformação de leveduras L40	-----28
3.9.1.1 Teste de autoativação dos genes repórteres \square -galactosidase (teste do azul)	-----29
3.9.2 Screening de SCOC como isca	----- 29
3.9.2.1 Amplificação de biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano (clontec) para duplo híbrido	
-----	29
3.9.2.2 Inóculo e plaqueamento das leveduras L40	----- 30
3.9.3 Teste de crescimento das leveduras pós-screening	-----31
3.9.4 Extração de DNA das leveduras	-----31
3.9.5 Transformação das bactérias <i>E. Coli</i> DH5 \square com os DNAs extra dos das leveduras	---32
3.9.6 Confirmação do duplo-híbrido em levedura	----- 32
4. Resultados e Discussão	----- 35
4.1 A interação FEZ1 e RARA	-----35
4.1.1 O padrão de polarização de RARA é alterado com titulação de FEZ1	-----35
4.1.2 Análise da proporção estequiométrica de interação entre FEZ1 e RARA	-----39
4.2 FEZ1 e RARA colocalizam na região perinuclear	----- 42
4.3 A importância da interação RARA e FEZ1 na transcrição gênica	----- 43
4.3.1 Imunoprecipitação de FEZ1	----- 48
4.4 Padrão de expressão de FEZ1 durante o início da neurulação em embrião de galinha	-- 49
4.5 Ensaio de interação de FEZ1 e SCOC	-----52
4.5.1 Duplo híbrido de SCOC identificou FEZ1 e FEZ2 como parceiros de Interação	-----52
4.5.2 FEZ1 e SCOC colocalizam em células de mamíferos	----- 55

4.5.3 Mapeamento da interação de FEZ1 e SCOC -----	56
4.6 Cristalização de SCOC -----	60
5. Conclusões -----	65
6. Perspectivas -----	69
7.Referências bibliográficas -----	71
8.Anexos -----	77

Agradecimentos

Agradeço à Unicamp por esses quase 7 anos de caminhada desde a graduação até o mestrado, por me fornecer todo o suporte necessário para os meus estudos, aos professores que ensinaram a importância e a beleza dessa vasta área que é a Biologia. Agradeço também ao programa de Pós-graduação em Biologia Funcional e Molecular e às agências de fomento que financiaram esse trabalho: à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), ao CNPq (Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

Agradeço ao LNBio (Laboratório Nacional de Biociências) onde pude desenvolver todos os experimentos dessa dissertação e ao meu orientador Dr. Jörg Kobarg por esses 4 anos de convívio desde a iniciação científica. Obrigada pela oportunidade, liberdade e confiança, pelos momentos de discussões científicas e também pelos momentos de lazer, onde pudemos falar sobre filmes, livros, séries... Obrigada pelas inúmeras cartas de recomendação para o doutorado e por me apresentar Theodor Nerdal, meu querido namorado. Agradeço também aos orientadores anteriores; de estágio Dr. Vagner Castro (Hemocentro-Unicamp) e de Iniciação científica Dr. Sérgio Furtado dos Reis (Biologia Animal- Unicamp), os quais me introduziram ao fascinante mundo da Biologia Molecular.

Ao meu tutor e amigo Dr. Marcos Rodrigo Alborghetti, quem me ensinou muito de biologia molecular, sempre otimista, dedicado, criativo e disposto a ajudar. Obrigada pela sua contribuição, ela foi crucial para a produção dessa dissertação.

Agradeço aos membros da Banca de qualificação: profa. Dra. Dora Maria Grassi-Kassisse, Dra. Andrea Balan e Dr. David Neves, pelas contribuições na correção da dissertação e pelas discussões produtivas. Aos membros da Banca de defesa: Dra. Andrea Balan, Dr. David Neves, profa. Dra. Dora Maria Grassi-Kassisse e Dr. Vadim Viviani por aceitarem o convite em avaliar este trabalho.

Muito obrigada aos colaboradores; Dr. Júlio César da Silva, Dr. Maurício Sforça, Dr. Jorge Neves, Dra. Ana Zeri, profa. Dra. Íris Torriani, Dra. Adriana Paes-Leme, prof. Dr. José Xavier Neto e especialmente Dra. Ana Figueira por vários experimentos em colaboração, pelas discussões e pela correção da dissertação, aos demais pesquisadores do LNBio pela troca de reagentes, uso de equipamentos e suporte na execução de experimentos. Agradeço também a técnica Eugênia, por auxiliar na organização e compra de reagentes.

Aos amigos do laboratório pelas discussões e contribuições: Ângela, Fernanda Basei, Andrei, Marcel, Marcos, Gabi, Leandro, Daniel MT, Gustavo Bressan, Germanna, Deivid, Daniel Saito, Felipe, Jéssica, Gustavo Camacho, Eduardo, Edmárcia, Fernanda Costa, Mayra, Priscila, Talita, Vanessa, Diogo, Aline, Mariana Bertini, Mariana Bueno, Jéssica Lóis e Juliana Fattori.

Agradeço especialmente Fernanda, Marcel e Ângela por todos os favores feitos nos finais de semanas e feriados quando eu não pude estar no laboratório.

Aos amigos de graduação em Ciências Biológicas da Unicamp; Érica, Ana Érica, Edilaine, Flávia, Thalita, Diego, Felipe, Ângela, Priscila, Izabel, Larissa, Ariane Saldanha, Milena, Aneci, Murilo, Chaiene, Ézio, Carol Ayume, Dani Razoli e Priscila Arruda. A todos os amigos que trabalharam comigo intensamente no Apoio ao Vestibular da Unicamp (Comvest); Simone e Larissa Shiozawa, Alexandre (Gaúcho), Simone Dena, Matheus, Natália, Beatriz, Jéssica, Thiago, Rafaela e Anderson e ao chefe e amigo Renato Hirata, trabalhamos duro mas também nos divertimos muito. Aos amigos da moradia onde vivi 4 anos: Vânia, Carlos, Conan, Jonas, Digão, Fernanda, Aline, Chaiene, Vivi e Tati.

Aos amigos de restaurante japonês: Ângela, Marcel, Fabiana, Américo e Ígor, juntos apreciamos diversos restaurantes diferentes com o paladar seletivo dos representantes orientais Marcel e Ângela. A minha querida amiga de forró Érica, que foi companheira em muitos shows na cooperativa e no Rudá desde o início da graduação.

Ao meu sogro Hinrich Hansen por me ajudar na busca por um orientador de doutorado na Alemanha, também por me receber em sua casa e por ter um filho tão especial que me conquistou plenamente. Agradeço ao meu namorado Theo, que apesar de distante está muito presente na minha vida, sempre disposto a me ouvir, obrigada pela paciência e perseverança, em breve estaremos juntos.

Agora um agradecimento especial aqueles que estão comigo desde o começo!

Agradeço aos meus pais, Geraldo e Autemides Furlan que sempre se dedicaram para que eu e meus irmãos frequentássemos boas escolas e na simplicidade buscaram com muito esforço oferecer para nós oportunidades que não tiveram, e aos meus irmãos Tati e Fabiano que mesmo sem entender muito bem o meu trabalho, aceitaram às minhas decisões. À Tati ainda, por nossas viagens improvisadas com muita aventura, por muitos favores prestados, favores que só irmãos podem fazer. A minha querida amiga-irmã, Fabiana, por esses 13 anos de convívio, por nossas inúmeras experiências juntas, pelas frustrações e alegrias compartilhadas. Muito obrigada, por compartilhar comigo sonhos e por me apoiar nos momentos mais difíceis. Agradeço também ao Val, por todo apoio e suporte, sua ajuda vai ser passada adiante.

Enfim, gostaria de agradecer a todos que acreditaram em mim e me deram oportunidades ao longo da minha vida e apresentar esse trabalho com fruto desse investimento. Obrigada!

O assunto mais importante do mundo pode ser simplificado até ao ponto em que todos possam apreciá-lo e compreendê-lo. Isso é - ou deveria ser – a mais elevada forma de arte.

(Charles Chaplin)

Abreviaturas e siglas

3AT- 3-Amino-1,2,4-triazole
6xHis – cauda de 6 histidinas em proteína recombinantes
ACAP3- ArfGAP with Coile-coil Ankyrin repeat and PH domain 3
APPL- Amyloid Precursor Protein-Like
ARF- ADP Ribosylation Factor
ARL1- ARF Like 1
ATRA- All trans Retinoic Acid
BAF60a- BRG-1 60 kDa associada à subunidade A
BERT- Short Coiled Coil (*Gallus gallus*)
BL21- Cepa de *Escherichia coli* para expressão de proteína
BRM- Brahma protein (enzima remodeladora de cromatina)
cDNA – complementary DNA (DNA complementar)
C. elegans- *Caenorhabditis elegans*
CLASP2 – CLIP-associating protein 2
CMV- Human Cytomegalovirus Promoter
CRABP2- Cellular Retinoic Acid Binding Protein 2
DBD- DNA Binding Domain
DH5 α - Cepa de *Escherichia coli* para amplificação de DNA
DISC1 – Disrupted-in-Schizophrenia 1
DL- DNA Binding Domain and Ligand Binding Domain
DLS- Dinamic Light Scattering
DMEM- Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO- Dimethyl Sulfoxide
DNA – Deoxyribonucleic Acid
DR1- sequência de 5 repetições randômicas 5'-AGGTCA-3 espaçados por 1 nucleotideo
DR5- 2 repetição randômica 5'-AGGTCA-3 espaçados por 5 nucleotideos
DRAP1- DR1-Associated Protein 1
DSS- Suberic acid bis (N-hydroxysuccinimide Ester)
DUnc- *Drosophila melanogaster* Uncoordinated protein
E. coli- *Escherichia coli*
EMS- Etil Metanosulfato
ERNI- Early Response to Neural Induction
FEZ – Fasciculation and Elongation protein Zeta (gene)
FEZ – Fasciculation and Elongation protein Zeta (proteína)
FEZ1 - Fasciculation and Elongation protein Zeta 1
FEZ2- Fasciculation and Elongation protein Zeta 2
FITC- Fluorescein-5-Isothiocyanate
FLAG- peptídeo DYKDDDDK
GFP- Green Fluorescent Protein
GMVN – Grupo de Materiais Vitreos e Nanoestruturas
GNG3- Guanine Nucleotide binding protein G gamma 3
Golgin-95- Golgi autoantigen, golgin subfamily a, 2
GST – Glutathione S-transferase
GTF2IRD2 - General transcription factor II-I repeat domain-containing protein 2A
HP1 α - chromobox homolog
Hyb - Hybridization
IFGW – Instituto de Física Gleb Wataghin-Unicamp
IMH1- IgM Hypergammaglobulinemia 1
INFABIC- Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica Aplicada à Biologia Celular
ILF3- Interleukin Enhancer Binding Factor 3
ISH- *In situ* Hybridization
JIP1 – *c-Jun N-terminal Kinase-Interacting Protein 1*
KHC – Kinesin Heavy Chain

KLC – Kinesin Light Chain
KIBRA- Kidney and Brain protein
KIF3A- kinesin Family member 3A
L40- cepa de *Saccharomyces cerevisiae* para expressão de proteína
LARII- Luciferase Assay Reagent II (luciferina de *Photinus pyralis*)
LB- meio Luria-Bertani
LBD- Ligand Binding Domain
LEC- Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria
LNBio- Laboratório Nacional de Biociências
MAB(T) – Maleic Acid Tris Base
MAPK- Mitogen-Activated Protein Kinases
MCM7 - DNA replication licensing factor MCM7
MED7 - Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 7
MLF1IP - Myeloid leukemia Factor-1 Interacting Protein
mRNA – messenger RNA
MT- microtubule
mTORC1- mammalian Target of Rapamycin 1
Ngd- Neuroguidin protein
NGF – Nerve Growth Factor
PAGE – Polyacrilamide Gel Electrophoresis
PCR- Polymerase Chain Reaction
PEG- Polyethylene Glycol
PEI – Polyethyteneimine
PFA - Paraformaldehyde
PKC- Protein Kinase C
UNC – uncoordinated (proteína)
RA- Retinoic Acid
Rab3-GAP- RAB3 GTPase Activating Protein
Ral- Retinaldehyde
RALDH2- Retinaldehyde Dehydrogenase
RAR- Retinoic Acid Receptor
RARA- Retinoic Acid Receptor isoform □
RARA DL- Retinoic Acid Receptor isoform □ DNA Binding Domain and Ligand Binding Domain
RARE- Retinoic Acid Responsive Element
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
RNA- Ribonucleic Acid
ROBOlab- laboratório cristalografia LNBio
RXR- Retinoid X Receptor
SAP30 – 30 kDa Sin3-Associated Polypeptide
SAP30L - Sin3-Associated Protein p30-Like
SAXS – Small Angle X-ray Scattering
SCOC – Short Coiled-Coil protein
SD-L -meio diferencial serratia sem Leucina
SD-W- meio diferencial serratia sem triptofano
SD-WH- meio diferencial serratia sem Triptofano e sem Histidina
SD-WL - *meio diferencial serratia*, sem triptofano e sem leucina
SD-WLH- meio diferencial serratia triptofato sem leucina e histidina
SFRS8 – splicing factor, arginine/serine-rich 8
SG- Stop & Glo® Reagent (luciferina de Renilla)
SHH- Sonic Hedgehog
SLTM – SAFB-like Transcription Modulator
SNARE- Soluble N-ethylmaleimide-sensitive Factor [NSF] Attachment protein Receptor
Soxs 2 – SRY-box containing gene 2
SSC – Saline Sodium Citrate
SSDNA- DNA salmon sperm

STMN2- Stathimin like 2
SV- Vesícula Sináptica
SYD – Sunday Driver protein
Syt-1- synaptotagmin 1
TrKA – Neurotrophic Tyrosine Kinase Receptor
tRNA- transporter RNA
TGN- Trans-golgi Network
TI-VAMP -Tetanus neurotoxin-insensitive Vesicle-Associated Membrane Protein
ULK1- UNC-51 like Kinase 1
ULK3-UNC-51 like Kinase 3
unc – *uncoordinated* (gene)
UNC- uncoordinated (proteína)
UVRAG- UV radiation Resistance-Associated Gene (protein)
Vps34 - Vacuolar Protein Sorting phosphatidylinositol 3-kinase
Y2H – yeast two hybrid
YPD- yeast extract

Resumo

As proteínas humanas da família FEZ (*fasciculation and elongation protein zeta*) são ortólogas da proteína UNC-76 de *C. elegans* e estão envolvidas no crescimento e na fasciculação dos axônios através de interações que envolvem quinesinas, mitocôndrias e vesículas sinápticas. Sua estrutura intrinsecamente desordenada, com regiões super-espirladas (*coiled-coil*) ao longo da sequência, contribui para sua função e permite a interação com outras proteínas, sendo uma delas a proteína SCOC (*short coiled coil*) que tem um importante papel na maquinaria de transcrição do gene *Sox2*, precursor da placa neural em embriões. A interação das ortólogas de FEZ1 e SCOC, UNC-76 e UNC-69, respectivamente, já foi descrita, observou-se que ambas cooperam no crescimento axonal. Além disso, estudos de interactoma da FEZ1 revelaram várias proteínas fatores de transcrição, dentre essas a proteína RARA (Receptor de Ácido Retinóico alfa) que atua na regulação gênica em vários processos biológicos e seu ligante ácido retinóico all trans (ATRA) tem um importante papel no desenvolvimento do sistema nervoso. Nesse trabalho foram estudadas principalmente duas proteínas parceiras de interação de FEZ1 envolvidas na regulação da transcrição gênica durante desenvolvimento do sistema nervoso; RARA e SCOC, na tentativa de sugerir um papel nuclear para FEZ1, até então desconhecido. Primeiramente pudemos verificar o padrão de expressão de FEZ1 durante desenvolvimento embrionário de aves que pôde ser comparável com o perfil de expressão da enzima precursora do ácido retinóico (RALDH2) no sistema nervoso. Vimos também que FEZ1 e RARA podem atuar juntos na maquinaria de transcrição celular, promovendo a transativação de luciferase mesmo na ausência de ATRA. Um ensaio de anisotropia por fluorêscencia revelou que FEZ1 e RARA interagem e que FEZ1 provoca monomerização de RARA. Também traçamos o perfil funcional de SCOC através da identificação de seus parceiros de interação, dentre eles, proteínas da família FEZ, bem como outras proteínas envolvidas no desenvolvimento do sistema nervoso e/ou formação de vesículas sinápticas (FEZ1; FEZ2; ULK3; Sinaptotagmina; estatimina; neuroguidina), resultados condizentes com dados da literatura. Todas essas informações sugerem que FEZ1 pode ter envolvimento na regulação gênica durante o desenvolvimento do sistema nervoso, uma vez que as 3 proteínas estudadas estão envolvidas nesse processo e formam complexos entre si.

Abstract

The human proteins FEZ (fasciculation and elongation protein zeta) are the mammalian orthologs of the *C. elegans* protein UNC-76 and are involved in growth and fasciculation of axons through interactions, involving Kinesin, mitochondria and synaptic vesicles. Its structure is intrinsically disordered, with coiled-coils along the sequence, thereby allowing interactions with other proteins, such as the protein SCOC (short coiled-coil) which has an important role in the transcriptional regulation of the *Sox2* gene, a plate neural precursor in embryos. The interaction of FEZ1 and SCOC orthologs UNC-76 and UNC-69 were the first interactions characterized in depth and the cooperation of these protein-pairs has been shown crucial for axonal growth. Furthermore, studies of the FEZ1 interactome revealed several transcription regulatory proteins, including RARA (Retinoic Acid Receptor alfa) that acts in the gene regulation of various biological processes and which ligand retinoic acid plays an important role in the nervous systems development. Here, we studied in detail RARA and SCOC, two proteins from the FEZ1 interactome to address a possible regulatory role of these proteins complex in the gene transcription during the development of the nervous system. Our results included FEZ1 expression patterns during embryonic development of birds that are comparable with the expression profile of the enzyme precursor of retinoic acid (RALDH2). We also saw that FEZ1 and RARA can act together to promote transcriptional activation of a luciferase reporter in the absence of ligand *ATRA* retinoic acid. Fluorescence anisotropy assays in vitro showed out a strong binding between FEZ1 and RARA and that FEZ1 promotes RARA monomerization. Finally, we also identified SCOC interacting partners that included FEZ family proteins and other proteins involved in the nervous system development and formation of synaptic vesicles (FEZ1; FEZ2; ULK3; synaptotagmin; sthatimin; neuroguidin). All these data suggest that FEZ1 might be involved in gene regulation during development of the nervous system, since the three proteins studied are involved in this process and form complexes.

1.Introdução

1.1 A origem da família FEZ

Em um estudo para identificar os fatores genéticos básicos de *Caenorhabditis elegans* realizado por Brenner S. (1974), observou-se pela primeira vez um grupo de genes doravante denominados *uncoordinated* (Unc). Nesse trabalho, utilizou-se o agente mutagênico Etil metanosulfato (EMS) e observou-se a locomoção dos vermes no ágar para identificar mutantes com movimentos motores alterados. Os animais não mutados apresentavam movimentos suavemente sinuosos pela superfície do ágar, enquanto um grupo de mutantes destacaram-se por apresentarem deficiências notáveis no movimento reverso. Um total de 56 genes mutados foram identificados e relacionados à esse fenótipo de movimento descoordenado e constituíram o grupo de Uncs. Uma gama muito ampla de fenótipos de paralisia de movimentos foi identificada nesse grupo, embora houvesse mutantes com propriedades singulares, a maioria foi difícil descrever, por isso todos foram agrupados como Uncs. Mais tarde, Bloom e Horvitz (1997) fizeram um screening genético em *C. elegans* mutados para identificar genes relacionados com fasciculação dos axônios, o principal gene encontrado foi *unc-76*, cuja mutação interferiu na fasciculação, orientação e adesão dos neurônios e na locomoção do verme, fenótipo semelhante ao identificado por Brenner (1974). Entretanto, quando o gene humano *FEZ1* foi introduzido em células germinativas de linhagens de *C. elegans* mutados em *unc-76* não se observou mais o fenótipo de locomoção descoordenada, resgatando-se também a normalidade do crescimento e da fasciculação axonal (figura 1). Esse trabalho identificou e caracterizou, pela primeira vez, o gene *FEZ1* como homólogo de *unc-76*, agrupando-os como família FEZ.

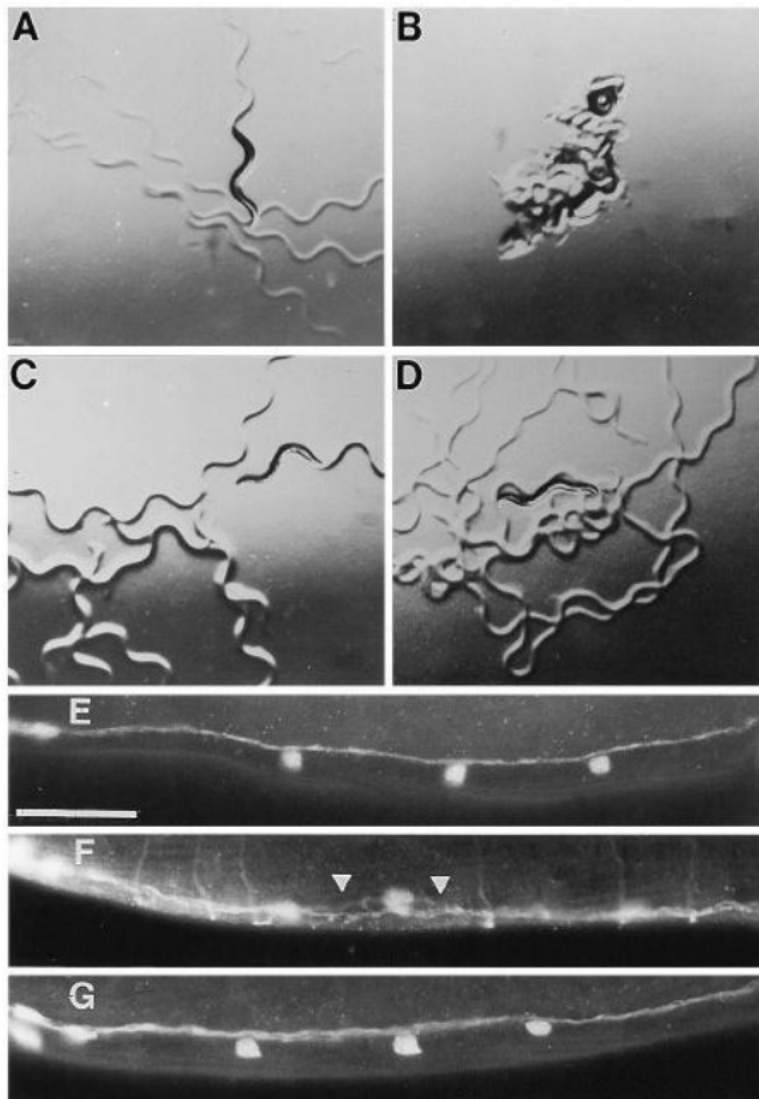


Figura 1. Restauração da locomoção e fasciculação do cordão nervoso ventral em vermes mutados em *unc-76* por *FEZ1*. (A –D) Animais foram fotografados (detectando-se as distâncias percorridas e os movimentos corporais) no período de 1 hora em placa contendo ágar; (A) tipo selvagem; (B) mutado em *unc-76*; (C) mutado em *unc-76* complementado com o gene de *C. elegans unc-76*; (D) mutado em *unc-76* complementado com o gene humano *FEZ1*. (EG) Cortes histológicos de cordões nervosos ventrais posteriormente localizados à cabeça de adultos marcados com anti-GABA. A porção anterior está à esquerda. (E) Tipo selvagem; (F) mutado em *unc-76*; (G) mutado em *unc-76* e complementado com o gene humano *FEZ1*. Pontas de seta indicam as regiões de desfasciculação. (Barra: 5 "m.). Reproduzido de Bloom & Horvitz (1997).

1.2 Proteínas Unc envolvidas no crescimento e orientação de neuritos

Os neurônios são células altamente polarizadas e a diferenciação neural envolve mudança coordenada em vários níveis, incluindo expressão gênica, aumento do citoesqueleto, tráfego de proteínas e um aumento massivo da área superficial da célula

(Futerman e Banker 1996, Tang 2001), de forma que as células neuronais possuem uma superfície 10000 vezes maior que os outros tipos celulares. O aumento de membrana ocorre em uma estrutura axonal chamada de cone de crescimento, sendo que todo esse processo é dependente da Trans-golgi Network (TGN), uma série altamente dinâmica de túbulos interligados e vesículas na superfície trans do complexo Golgiense. A extensão dos cones de crescimento é dependente de vesículas derivadas do TGN que se fundem com a membrana plasmática através de um processo de exocitose regulada. Sendo assim, o uso de uma neurotoxina (TI-VAMP Tetanus *neurotoxin*-insensitive vesicle-associated membrane protein) que atua sobre as proteínas SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor [NSF] attachment protein receptor), componente da maquinaria protéica envolvida no processo de exocitose, interrompe o crescimento de neuritos (Martinez-Arca *et al.* 2001, Sann *et al.* 2009), uma vez que esse crescimento é dependente do aumento de membrana proveniente do cone de crescimento. Componentes do complexo SNARE são proteínas que possuem pelo menos um domínio de 70 resíduos de aminoácidos comum ao grupo, 4 domínios juntos (de pelo menos 3 proteínas diferentes) formam um núcleo interligado e promovem a fusão de membranas. Essas proteínas estão distribuídas pela membrana plasmática, sendo que existe uma quantidade abundante em sítios de sinapses (Galli *et al.* 1995), evidenciando sua importância no transporte de neurotransmissores e na neuritogênese.

Muitas proteínas Unc estão envolvidas no processo de polarização, alongação neuronal e transporte de vesículas (figura 2). A UNC-51, por exemplo, é conhecida por atuar na formação dos endossomos, estágio inicial do processo de exocitose, e consequentemente no crescimento dos neuritos através do tráfego de endossomos prematuros (Sann *et al.* 2009). Trata-se de uma proteína serina/treonina quinase conservada evolutivamente que está associada com autofagia tanto em leveduras, como em células de mamíferos, nesse caso conhecida como UNC-51 like Quinase (ULK1) (Ogura *et al.* 1994, Matsuura *et al.* 1997, McKnight *et al.* 2012). Muitos estudos demonstram que a quinase UNC-51 auxilia na distribuição de receptores essenciais para a orientação da extensão do axônio. A proteína de *D. melanogaster* DUnc-51 se liga e fosforila DUnc-76. DUnc-76 fosforilada interage diretamente com a proteína de vesícula sináptica Synaptotagmina-1 (Toda *et al.* 2008), que é uma proteína essencial para formação sináptica e desenvolvimento neural, envolvida na formação de vesículas por interagir diretamente com SNAREs.

Além do aumento membranar, para que ocorra neurogênese é necessário que aconteça o transporte intracelular de cargas (proteínas, organelas etc), para isso existem proteínas motoras que caminham pelos microtúbulos e conduzem os cargos para os seus destinos, essa função é especialmente importante em células alongadas como os neurônios, cujo transporte pode percorrer longas distâncias dos corpos celulares para as junções sinápticas, as principais proteínas Unc envolvidas nesse processo são: UNC 104 e UNC116 ortólogas das quinesinas de mamíferos KIF1A e KHC respectivamente. A superfamília das quinesinas tem o papel de transporte nas células nervosas (figura 2)(Gindhart *et al.* 2003, Hirokawa e Takemura 2005) e a localização de dendritos, axônios e proteínas pré-sinápticas é dependente desse transporte (Mahoney *et al.* 2006).

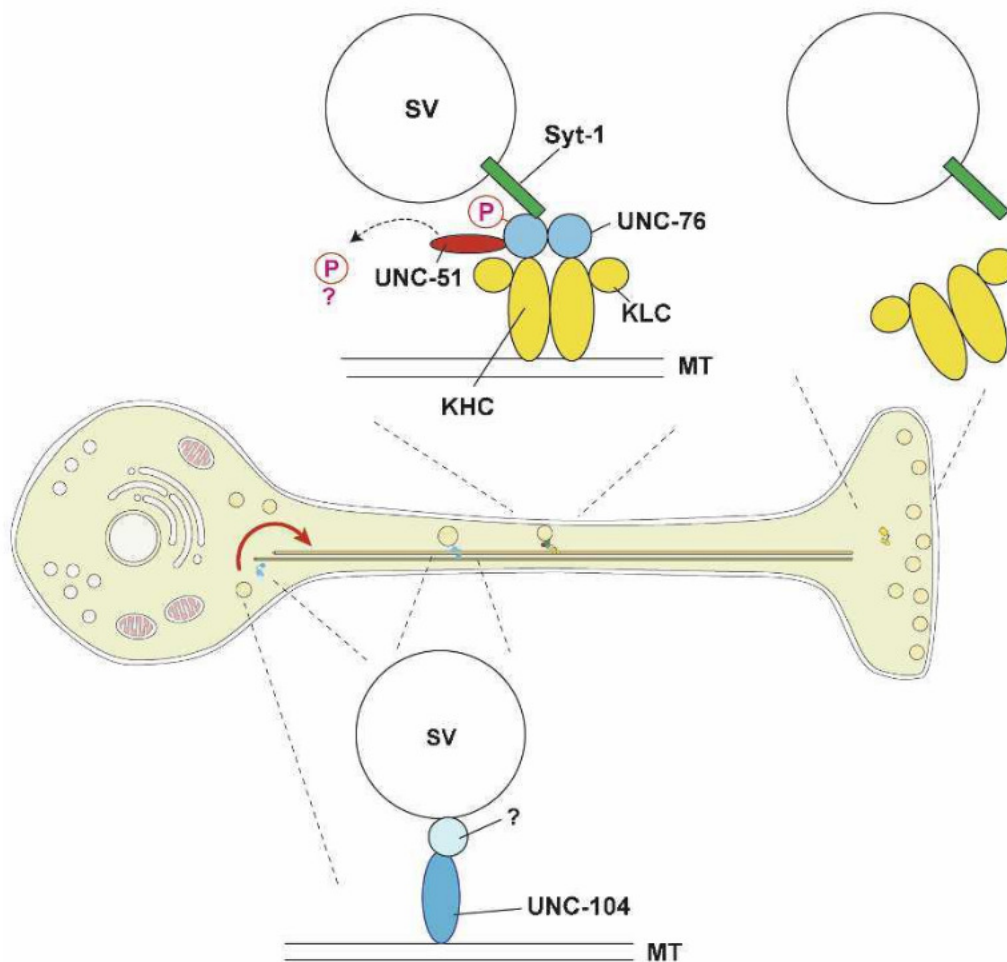


Figura 2. Modelo representativo de UNC-51 como uma proteína quinase de UNC-76 (proteína adaptadora de quinesina). UNC-51 age como quinase no transporte via Quinesina 1 através do axônio. Quando fosforilada por UNC-51, UNC-76 se liga a cadeia pesada da quinesina 1 (KHC) que caminha no microtúbulo (MT) e promove o aumento da afinidade das proteínas de

membrana da vesícula sináptica (SV) como Syt-1, UNC-51 também fosforila substratos que são essenciais para o transporte pelo axônio (seta vermelha). Diminuição ou ausência da função de quinase de UNC-51 pode resultar em menor afinidade de UNC-76 pela membrana da SV e dissociação da mesma da proteína motora. Reproduzido de Toda, H. *et al*, 2008

As quinesinas possuem duas cadeias: leve e pesada sendo que a cadeia pesada da quinesina UNC-116 é necessária para a distribuição subcelular de UNC-76 e UNC-69, outra proteína envolvida no crescimento e fasciculação dos axônios (Su *et al.* 2006). *Knock down* de quinesinas não só impede a localização dessas proteínas nos dendritos e axônios como também suprime o crescimento dos neuritos por bloquear o transporte de vesículas dependentes de quinesinas (Ferreira *et al.* 1992, Morfini *et al.* 1997). Em uma triagem com o C-terminal da proteína motora quinesina-I (KHC – *kinesin heavy chain*) em uma biblioteca de cDNA de embrião de *D. melanogaster* na busca por proteínas parceiras de interação, identificou-se a proteína *unc-76* interagindo diretamente com a quinesina I (UNC-116) (Gindhart *et al.* 2003). Em *C. elegans*, mutações no gene *unc-116* (gene homólogo à KHC) também foram relacionadas com deficiências de locomoção e desenvolvimento anormal dos axônios. Mutações em outras proteínas que interagem com a cadeia leve da quinesina 1 (por exemplo, *Amyloid precursor protein-like* [APPL] e *Sunday driver* [SYD]) acarretaram no mesmo fenótipo que mutações em *unc-76*, que se caracterizava por interrupção do transporte axonal em nervos de segmentos larvais de *D. Melanogaster*.

1.3 A proteína humana SCOC (*Short Coiled Coil protein*)

A proteína UNC-69 de *C. elegans*, homóloga de SCOC em mamíferos, é necessária para o crescimento axonal, orientação, fasciculação e organização pré-sináptica, atuando juntamente com UNC-76 através de seu domínio de *coiled coil* no carboxil terminal conservado evolutivamente. Estudos funcionais revelaram que UNC-76 e UNC-69 colocalizam-se, agindo na mesma via para controle e extensão dos axônios e regulando a organização pré-sináptica cooperativamente (Su *et al.* 2006).

SCOC foi identificada primeiramente como parceira de interação de ARL1. ARFs são GTPases que agem no complexo de Golgi para regular aspectos do tráfego de membranas com auxílio da proteína G, ARFs ativadas recrutam proteínas adaptadoras do tráfego de membranas a partir do Golgi/TGN. ARL1 desempenha um papel adicional na regulação da dinâmica dos microtúbulos, ciliogênese e citocinese (Cockcroft *et al.* 1994).

Northern blot de mRNA de SCOC de tecidos humano identificou sua presença predominantemente no cérebro, coração e músculo esquelético, caracterizando-a como uma proteína ubíqua. Através de ensaio com SCOC em cultura de células de mamíferos foi possível identificar sua localização no complexo de golgi, citoplasma e membrana plasmática. Além disso, foi observada alta identidade (mais de 50%) de SCOC com três proteínas (Golgin-95, IMH1 e VPS30) envolvidas no tráfego de vesículas do complexo de Golgi (Valkenburgh et al. 2001).

Recentemente, realizou-se um estudo para identificar proteínas moduladoras de autofagia induzida por privação de aminoácidos, onde SCOC foi caracterizada como um regulador positivo desse processo, atuando no sequestro de FEZ1 do complexo ULK1-FEZ1 e liberando ULK1, que atua como um regulador positivo na via de mTORC1 (figura 3) (Chan et al. 2009, McKnight et al. 2012).

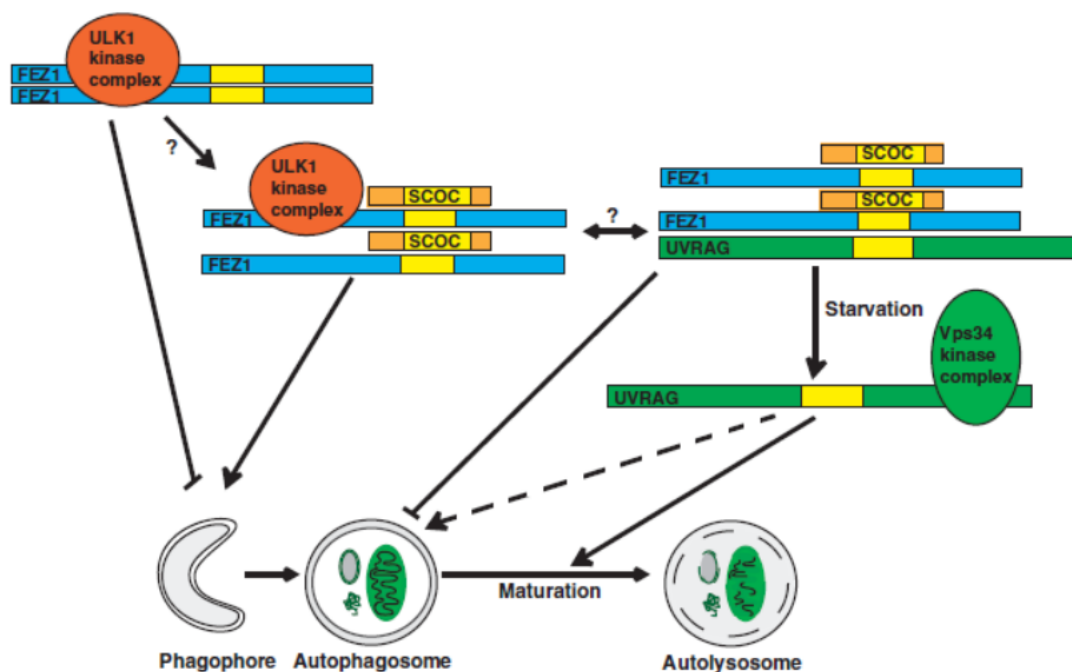


Figura 3. O papel de SCOC e FEZ1 durante autofagia desencadeada pela privação de aminoácidos. SCOC se liga a FEZ1 que está em complexo com a proteína UVRAG (gene associado à resistência a radiação UV) ou ULK1. Os resultados sugerem que a inibição da indução de autofagia por FEZ1 ocorre devido à inibição da atividade de quinase de ULK1 ou é revertida devido à associação de SCOC ao complexo ULK1-FEZ1. A privação de aminoácido (starvation) causa dissociação de UVRAG do complexo FEZ1- SCOC e isso pode permitir a associação de UVRAG com o Vps34 (proteína envolvida no complexo Beclin 1 fosfatidilinositol 3-quinase). A hipótese é de que SCOC ou o complexo FEZ1-SCOC podem coordenar a regulação de ULK1 e do complexo Vps34 quinase. Reproduzido de McKnight, N.C., et al 2012.

Outro trabalho, demonstrou que a proteína BERT (homóloga de SCOC em *Gallus gallus*) interage com o complexo de ativação transcricional do gene *sox2*, responsável

pelo desenvolvimento inicial da placa neural (figura 4) (Papanayotou *et al.* 2008), revelando um possível papel dessa proteína no núcleo da célula durante desenvolvimento do sistema nervoso.

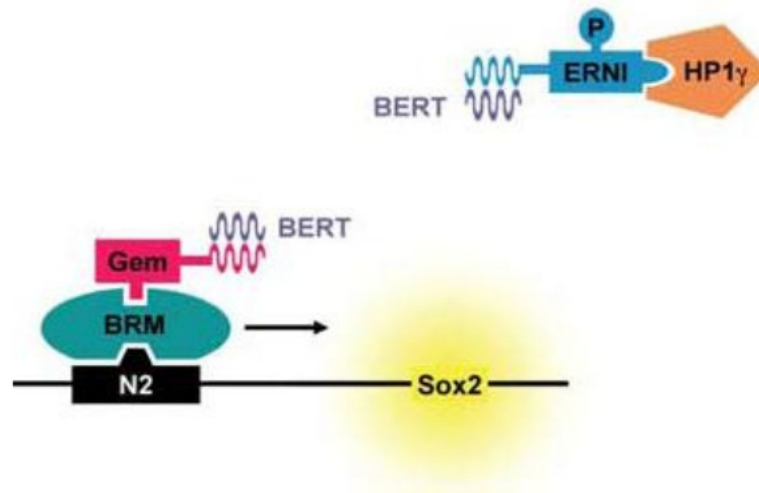


Figura 4. Modelo representativo de SCOC (BERT) em *Gallus gallus* como regulador positivo na maquinaria de transcrição do gene Sox2. BERT promove a transcrição do gene Sox2 por duas ações: ao interagir com ERNI fosforilada (uma proteína amplamente expressa nos epiblastos em estágios precoces e é rapidamente reprimida no estágio 4 de desenvolvimento da placa neural), que está ligada à HP1 γ (repressor de transcrição) SCOC impede que a mesma iniba a maquinaria de transcrição de Sox2 e, ao interagir com Germinina (uma proteína expressa no início da gastrulação e que induz a expressão de Sox2) ela promove a transcrição, uma vez que Germinina está ligada ao fator de transcrição BRM (enzima Brahma remodeladora de cromatina) que por sua vez, encontra-se no enhancer N2. Sox2 é responsável pela formação da placa neural em embrião de galinha. Reproduzido de Papanayotou, C. *et al.* (2008)

1.4 FEZ1 e SCOC formando um complexo

Como adaptador molecular, a proteína FEZ1 recruta elementos regulatórios e efetores para o processo de formação e transporte de vesículas. De fato, em drosófila, a proteína DUnc-76, homóloga de FEZ1, está envolvida com a Quinesina 1 no transporte de precursores de vesículas sinápticas, interagindo com sinaptotagmina quando DUnc-76 é fosforilada por DUnc-51 (Toda *et al.* 2008), como também foi observado em humanos, onde a proteína FEZ1 interage com a syntaxina 1 (UNC-64), outra proteína envolvida no processo de exocitose (Chua *et al.* 2012). Além disso, o complexo FEZ1 SCOC está envolvido no alongamento axonal, formação de vesículas sinápticas, bem

como na autofagia induzida por privação de aminoácidos, pela via de ULK1, como já foi mencionado anteriormente.

Através de análise de estrutura por RMN (ressonância magnética nuclear) e por small angle X-ray scattering (SAXs) realizado pelo nosso grupo (dados não publicados) verificou-se que o complexo FEZ1 SCOC está associado em uma proporção estequiométrica de 2:2 com uma topologia provavelmente antiparalela do dímero de FEZ1 sendo que FEZ1 forma dímero pelo N-terminal através de ponte dissulfeto (Alborghetti *et al.* 2010) e interage com SCOC pelo C-terminal (figura 5). Nesse modelo, SCOC está associada com uma calda de GST pelo N-terminal e interage com o dímero de FEZ1 pelo C-terminal.

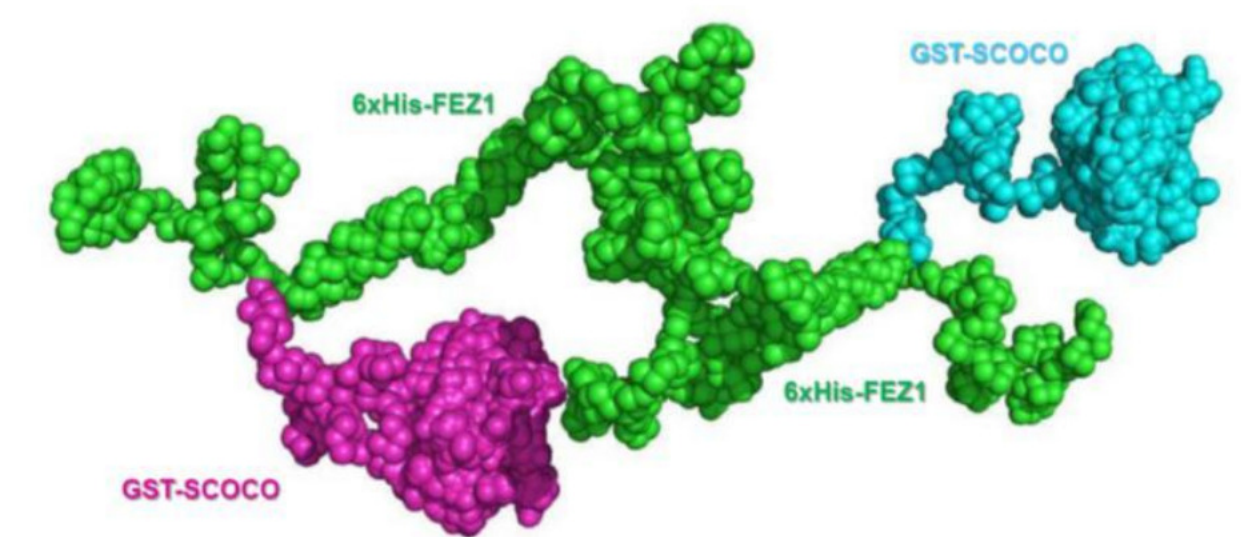


Figura 5. Modelo de interação antiparalela e heterotetramérica de FEZ1 e SCOC. Modelo de baixa resolução (*ab initio*) para 6xHis-FEZ1(1-392) com GST-SCOC(2-82) derivada dos dados de SAXS. Modelo único representativo de resíduos. Um estado heterotetramérico é observado, que consiste de duas moléculas de GST-SCOC (azul e rosa) anexadas ao dímero de 6xHis-FEZ1 (verde).

Pode-se sugerir que FEZ1 atua como uma proteína adaptadora dimérica e bivalente *in vivo*. Nesse caso, a região *coiled-coil* que constitui o c-terminal de FEZ1 funcionaria como um domínio de *docking* promíscuo para um grande número de proteínas *–eargos*|| muitas delas, interessante, também possuidoras de domínios

coiled-coils e envolvidas no desenvolvimento do sistema nervoso, como o Receptor do Ácido Retinóico Alpha (RARA) (Surpili *et al.* 2003, Assmann *et al.* 2006) (figura 6).

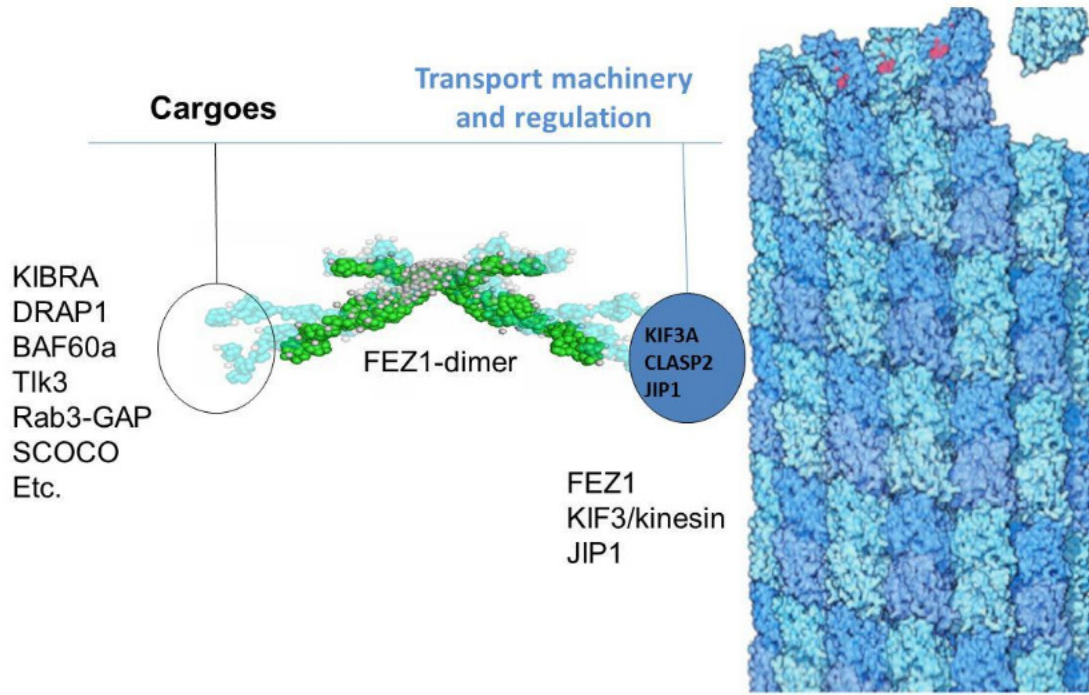


Figura 6. Modelo representativo de FEZ1 como um adaptador bivalente no transporte de cargas. A figura mostra que um dos C-terminais de FEZ1 pode interagir com proteínas motoras (KIF3A, CLASP2 e JIP1) e concomitantemente, o outro c-terminal é responsável por carregar os cargas, uma vez que a dimerização de FEZ1 ocorre pelo N-terminal e as regiões C-terminais com *coiled-coil* ficam expostas. Modelos baseados em dados de SAXS das proteínas 6xHis-FEZ1 (1-227) (verde) e 6xHis-FEZ1 (1-392) (azul). As esferas cinzas representam moléculas de água, presentes em regiões com elevado índice de aminoácidos ácidos.

1.5 O papel do ácido retinóico no desenvolvimento do sistema nervoso

A Vitamina A e seus metabólitos são coletivamente chamados de retinóides e são essenciais para o desenvolvimento embrionário adequado. Retinóides produzem efeito pleiotrópico no embrião uma vez que iniciam sinalização da diferenciação neural (Corral e Storey 2004), promovem a diferenciação de regiões do tubo neural como rombencéfalo e medula espinhal (Niederreither *et al.* 2000, Liu *et al.* 2001) e controlam o padrão de diferenciação dos neurônios motores espinhais e interneurônios (Sockanathan e Jessell 1998, Pierani *et al.* 1999, Novitch *et al.* 2003), ao regular a transcrição gênica, permitem que neurônios imaturos se desenvolvam e respondam ao

NGF (fator de crescimento do nervo) (Plum e Clagett-Dame 1996, Plum *et al.* 2001, Clagett-Dame *et al.* 2006).

A síntese de RA a partir da vitamina A ocorre em dois passos enzimáticos com o retinaldeído como intermediário (figura 7). Estudos genéticos em ratos demonstraram que a oxidação de retinol para retinaldeído é ubíqua durante o desenvolvimento embrionário e é controlada especificamente nos tecidos pela enzima RALDH2 (retinaldeído desidrogenase). Camundongos nocaute para essa enzima apresentam defeito de crescimento em fase embrionária E8,5 para E10,5, (quando coração e cérebro estão em estágio inicial de desenvolvimento) seguindo para letalidade em E11,5 (Niederreither *et al.* 1999, Mic *et al.* 2002). RALDH2 atua no citoplasma na etapa final de formação do ácido retinóico como mostra a figura 7:

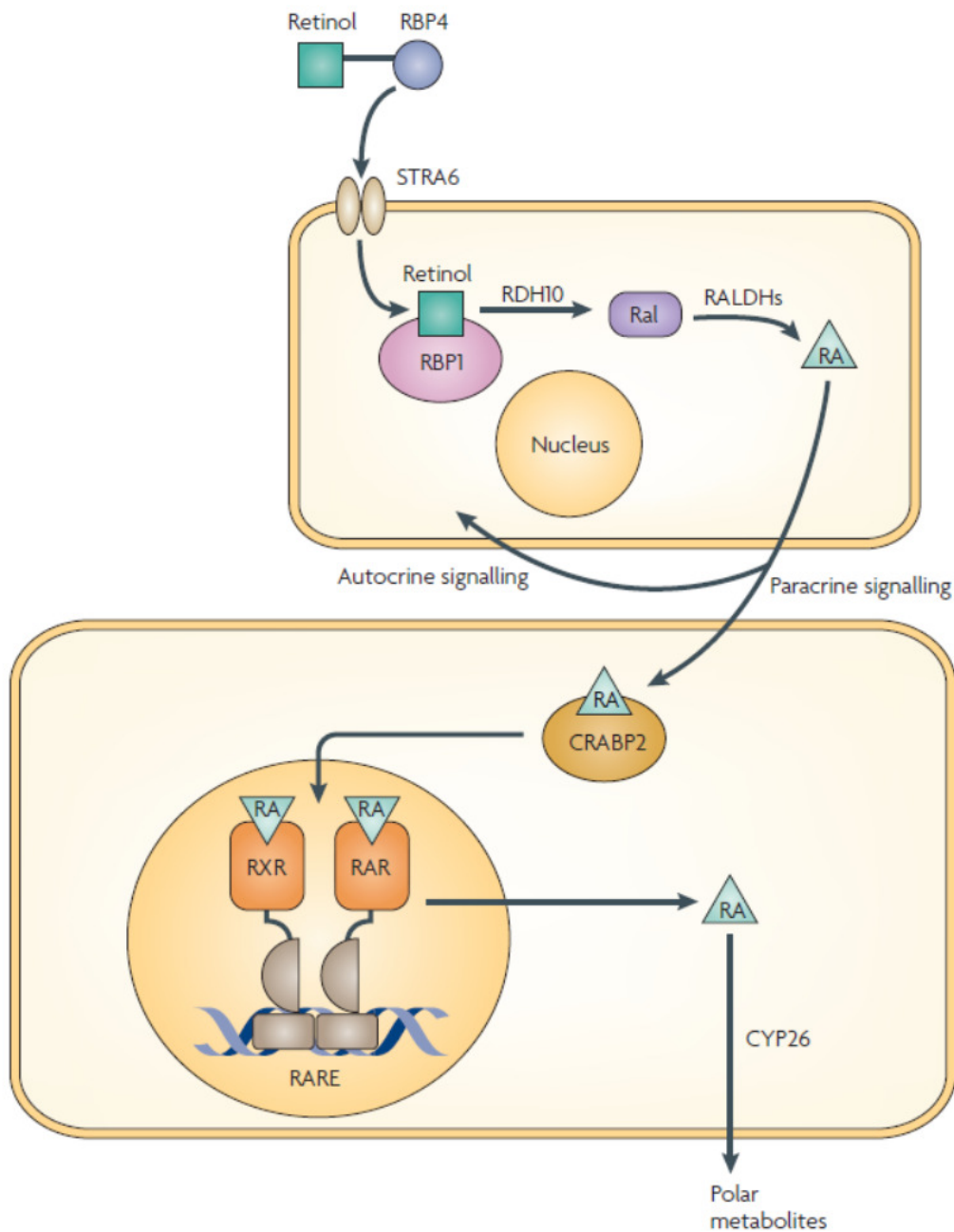


Figura 7. Os caminhos de geração, ação e catabolismo de ácido retinóico (RA) em células nervosas. Retinol, ligado na RBP4 (retinol-binding protein 4, plasma), é retomado pela célula através do receptor de membrana (STRA6) que interage com RBP4. Em embriões, RDH10 (retinol desidrogenase) metaboliza retinol para retinaldeído (Corral), que é então metabolizado para RA pela RALDHs (retinaldehyde dehydrogenases). RA pode ser liberado do citoplasma e retomado por uma célula receptora (sinal parácrino), ou pode agir no núcleo da mesma célula onde foi formado (sinal autócrino). CRABP2 (Cellular retinoic-acid-binding protein 2) auxilia a

entrada de RA no núcleo. No núcleo, RA liga-se em seu receptor RARs (Retinoic Acid Receptor) e no RXRs (Retinoid X Receptor), esses heterodimerizam e se ligam em uma sequência de DNA conhecido como RARE (Retinoid Acid Response Element). Esta ligação ativa a transcrição de genes alvos. RA é catabolizado no citoplasma pela proteína CYP26 (cytochrome P450 hydroxylase). Reproduzido de Maden M. (2007).

A sinalização defeituosa de ácido retinóico está diretamente relacionada com doenças degenerativas tais como Alzheimer e esclerose lateral amiotrófica (Corcoran *et al.* 2002, Goodman e Pardee 2003), enquanto níveis inadequados desse composto (excesso ou deficiência), durante desenvolvimento embrionário, pode resultar em um conjunto de doenças classificadas como embriopatologia do ácido retinóico, as quais podem provocar defeitos no desenvolvimento da crista neural (Mulder *et al.* 2000, Ross *et al.* 2000, Maden 2006), má formação dos membros e outras manifestações esqueléticas (Ali-khan e Hales 2006, Zile 1998).

1.6 FEZ1 e a transcrição

O receptor de ácido retinóico alpha (RARA) bem como outras 9 proteínas envolvidas na maquinaria de transcrição (DRAP1, GTF2IRD2, MCM7, MED7, MLF1IP, SAP30, SAP30L, SFRS8, SLTM) foram identificadas em uma triagem por duplo híbrido como parceiras de interação de todas as proteínas da família FEZ (UNC-76, FEZ1 e FEZ2)(Alborghetti *et al.* 2011) sugerindo que, além de um papel como proteína adaptadora do transporte, FEZ1 também teria função na repressão ou ativação da transcrição gênica.

RAR possui 3 isoformas (alpha, beta e gama), todas elas são conhecidas por promoverem a transcrição gênica após interação com seu parceiro RXR formando um complexo heterodimérico, sendo que a diferença entre as isoformas está no padrão de expressão nos tecidos. As isoformas alpha e beta são mais abundantes no tubo neural durante o início do desenvolvimento embrionário de camundongos (E 8,5-9,5) (Dolle *et al.* 1990, Ruberte *et al.* 1993). A ativação da transcrição pelo heterodímero de RAR RXR é dependente da interação desses receptores com seus respectivos ligantes: ácido retinóico *all trans* e *9 cis*. Porém, mesmo na ausência do ligante, os receptores RAR-RXR ligam-se em sequências conhecidas de DNA e nesse caso, recrutam corepressores e inibem transcrição. Esses corepressores modulam negativamente a transcrição pelo recrutamento do complexo de histonas desacetilases e a transferência

de radicais metil para o DNA ligado à histonas, estabilizando o nucleossomo. Entretanto, a interação dos receptores com seus ligantes causa mudanças conformacionais no domínio de ligação ao ligante (LBD), promovendo a liberação dos corepressores e o recrutamento de coativadores. Enquanto alguns coativadores interagem com a maquinaria basal de transcrição, outros induzem o remodelamento da cromatina e ativação transcricional específica (Aranda e Pascual 2001, Privalsky 2004). A figura 8 exemplifica o modo de transcrição mediado pelo heterodímero RAR-RXR:

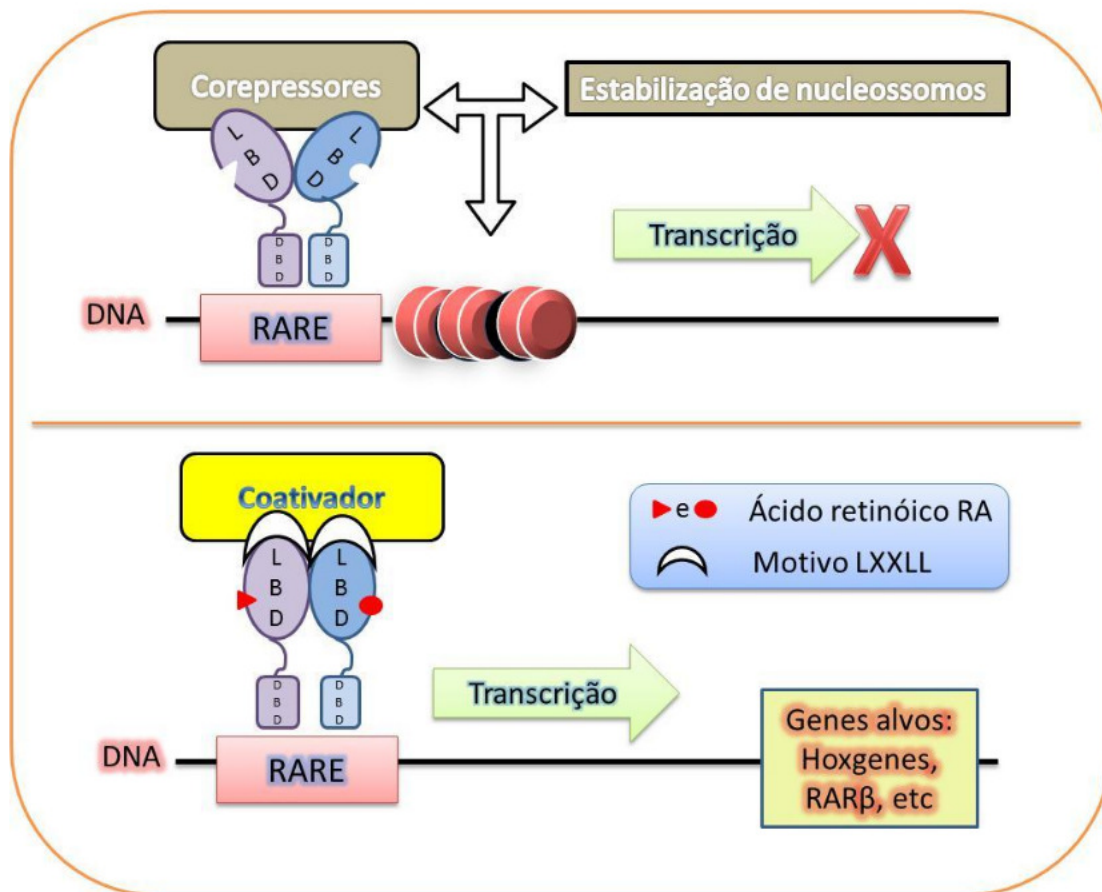


Figura 8. Esquema representativo para ilustrar a transcrição mediada pelo heterodímero RAR-RXR. Os receptores nucleares RXR e RAR representados em lilás e azul respectivamente, formam um complexo e estão constitutivamente ligados ao DNA através de seus domínios DBD com a sequência RARE do DNA localizada antes do promotor. Na ausência do ligante (esquema superior) os domínios LBD dos receptores estão dispostos de forma que as hélices 12 de ambos estão escondidas, essa conformação facilita a interação com corepressores que atuam na estabilização dos nucleossomos através da desacetilação de histonas. Na presença do ligante ácido retinóico, os receptores mudam de conformação expondo suas hélices 12 que interagem com motivos LXXLL de coativadores, promovendo transcrição de genes alvos, como as proteínas da família homeobox responsáveis pela diferenciação rostro caudal dos embriões e o próprio RAR α , exemplos citados no esquema acima.

Os dados de interação de RARA com FEZ1 obtidos no duplo híbrido também foram confirmados por teste *in vitro* através da coexpressão de 6xHisFEZ1 e GST-RARA, purificação de 6xHisFEZ1 em resina com afinidade para cauda de Histidina (Hitrap) e identificação de ambas proteínas por western blot (dados não publicados). Além disso, sabe-se que FEZ1 possui um domínio LXXLL (L é o aminoácido Leucina e X é qualquer aminoácido) que é comum entre vários coativadores de receptores nucleares, necessário e suficiente para mediar a associação de coativadores e um domínio LBD (domínio de ligação ao ligante) dos receptores nucleares (figura 8). Análise estrutural do domínio LXXLL revelou que ele forma uma α -hélice hidrofóbica com as leucinas, essa conformação lembra a hélice 12 do RAR que é requerida para a interação com coativadores e também forma uma β -hélice anfipática. Acredita-se que ambos domínios (LXXLL do coativador e hélice 12 do receptor) estão envolvidos para formar um modelo de montagem receptor-coativador (Darimont *et al.* 1998). A figura 9 mostra os principais domínios de FEZ1, o domínio LXXLL situa-se em sua região de *coiled coil*, além disso FEZ1 possui 3 regiões ácidas, ricas em ácido glutâmico em seu N-terminal, essa característica também é comum para coativadores de receptores nucleares (Heery *et al.* 1997, Torchia *et al.* 1997, Ding *et al.* 1998):

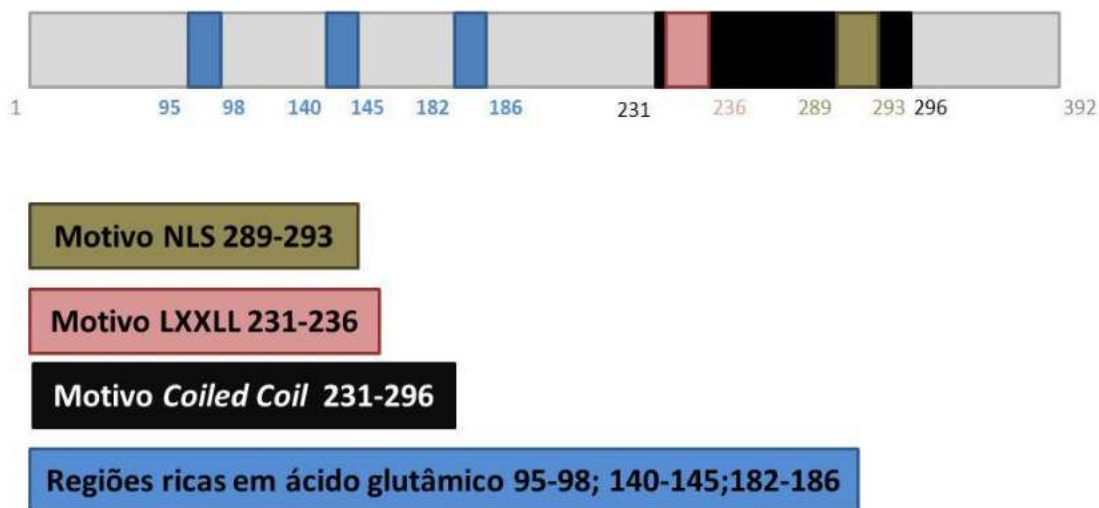


Figura 9. Principais motivos de FEZ1 que podem estar envolvidos no recrutamento de coativadores da maquinaria de transcrição juntamente com RARA.

2. Objetivos

2.1 Gerais

Caracterização estrutural e funcional das proteínas FEZ1 e SCOC, bem como dos complexos entre FEZ1 e suas parceiras de interação SCOC e RARA.

2.2 Específicos

- Compreender o papel de FEZ1 na regulação da transcrição gênica mediada por RARA;
- Estudo do padrão de expressão de FEZ1 durante desenvolvimento inicial da neurulação em embrião de galinha correlacionando com o padrão de expressão da enzima envolvida na formação de ácido retinóico RALDH2 (retinaldehyde dehydrogenase);
- Obter novas pistas sobre a função celular de SCOC através de identificação de parceiros de interação por técnica de duplo híbrido em levedura;
- Identificação das interfaces de interação entre FEZ1 e SCOC por cross-linking;
- Expressão, purificação e cristalização da 6xHis SCOC para estudos estruturais e funcionais

3. Metodologia

3.1 Ensaios preparatórios de Biologia molecular: clonagem, expressão e purificação de proteínas

3.1.1 Clonagem

Os Fragmentos de DNA que codificam as proteínas humanas SCOC e FEZ1 foram amplificados por PCR no termociclador automático da Applied Biosystems a partir de biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano (clontec obtida em QIAfilter™ Plasmid Maxi Kit) como modelo e um par de olinucleotídeos específicos que foram desenhados exclusivamente para cada uma das sequências de DNA de SCOC e FEZ1 (tabela 1).

Tabela 1. Oligonucleotídeos para amplificação de SCOC e FEZ1

SCOC
Primer sense: CGG AAT TCA TGG ACG GGT CCA GGA AAG
Primer antisense: GTC GAC TTA CTT TCT TTT GCT TTT TGT GTC
FEZ1
Primer sense: CGA GGC TCT GAA TGG CAA CT
Primer antisense: TAC CGG AAT CAT TTT CAC TCT TCT C

As quantidades de cada componente e as condições de amplificação dos genes de SCOC e FEZ1 estão descritas nas Tabelas 2 e 3

Tabela 2. Reagentes utilizados para preparo de PCR

Componente	Volume μL
Água	14,25
Tampão da enzima*[1mM]	2,50
Biblioteca cDNA [1μg]	2,00
dNTP [0,3mM]	3,00
Primer foward [0,2mM]	1,00
Primer reverse [0,2mM]	1,00
MgSO₄ [0,75mM]	0,75

Platinum®TaqDNA [0,5U]	0,50
-------------------------------	------

(*) Invitrogen™.

Tabela 3. Condições usadas para preparo de PCR

Estágio	Temp (°C)	Tempo(s)
Pré-incubação	95	300
Desnaturação	95	45
Anelamento	55	60
Extensão	72	120
Pós-incubação	72	900
		40 ciclos

Os genes amplificados foram extraídos do gel com QIAquick® Gel Extraction Kit e clonados no vetor pGEM®-T da Promega em um procedimento também já descrito no relatório anterior. Usou-se enzimas de restrição específicas para subclonagem nos vetores de interesse (tabela 4)

Tabela 4. Vetores de expressão onde os DNA's de FEZ1 e SCOC foram subclonados

Vetor	Finalidade
pET28a modificado*	Expressão da proteína recombinante em bactéria DH5α
pBTM116K	Expressão de proteína em levedura
pCDNAFLAG modificado**	Expressão de proteína em célula de mamífero

*pET28a modificado em nosso laboratório pelo grupo do Prof. Dr. Nilson Zanchin, tendo sido removido o sítio de clivagem pela Trombina e substituído por um sítio de clivagem pela protease TEV em fusão com uma seqüência que codifica para a glutathione S transferase (GST), sendo identificado neste relatório como pET28aTG.

Recebemos a construção pCDNAFLAG RARA (proteína inteira) e pET28a RARA DL do grupo da Doutora Ana Carolina Migliorini Figueira (LEC-LNBio). A região de RARA clonada em pET28a contém o domínio de ligação ao DNA (DBD) e o domínio de ligação ao ligante (LBD), como mostra o esquema abaixo da proteína inteira comparando-a com a região clonada:

RARA completo (462 aa):



RARA DL (88-419):



3.1.2 Expressão e purificação das proteínas em *E. coli*: 6xHisFEZ1, 6xHisSCOC e 6xHisRARA DL

A indução com 0,5mM de IPTG foi realizada em bactérias *E. coli* BL21 (DE3), transformadas com as construções pET28aTEVHISFEZ1(1-392) e pET28aSCOCTEVHIS(42-120), durante 4h à 30°C enquanto para a expressão de pET28aTEVHIS RARA DL(88-419) usou-se 0,5mM de IPTG e 10mM de ZnCl₂ em *E. Coli* BL21 Rosetta 2 (DE3) durante 15 horas a 22°C Após a indução de 4L em meio Luria-Bertani (LB), centrifugação à 7000rpm por 10 minutos, pET28aTEVHISFEZ1(1-392) e pET28aSCOCTEVHIS(42-122) foram ressuspensos em 40mL de tampão A (PBS 1X + 15mM imidazol pH 7,4) e pET28aTEVHIS RARA DL foi ressuspensado em tampão de lise (20mM de Hapes, 300mM de NaCl, 5% de glicerol, 0,014% de β -mercaptoetanol, 0,02% de PMSF e 0,008% de lisozima). A lise de pET28aTEVHISFEZ1(1-392) e pET28aSCOCTEVHIS(42-120) foi realizada com 375 μ gmL⁻¹ de lisozima seguida por sonicação em 20 ciclos (10s de sonicação e intervalo de 30s) em gelo. A fração solúvel foi obtida após 40 minutos de centrifugação em 18000rpm à 4°C em centrífuga HITACHI Himac CR22G. As frações solúveis contendo as proteínas recombinantes com cauda de histidina foram submetidas à cromatografia

liquida de afinidade por metal (níquel) e posteriormente, cromatografia por exclusão molecular. Para a cromatografia de afinidade usou-se coluna *HiTrap Chelating* 5mL (GE Healthcare), empacotada com a resina Chelating Sepharose™ High Performance e carregada com 5 volumes de coluna (VC) com 0,1M NiSO₄ em um aparelho ÄKTA FPLC (GE Healthcare), para a cromatografia de exclusão molecular usou-se coluna HiLoad® 16/60 Superdex® 75. Ambas purificações foram eluídas com PBS, sendo que para a cromatografia de afinidade acrescentou-se 300mM de Imidazol ao PBS.

3.2 Gel Nativo

Preparou-se o gel nativo com 1,5% de agarose em Tampão Native PAGE invitrogen. Os complexos FEZ1 SCOC; FEZ1 RARA foram expressos e purificados separadamente e incubados durante 1h, 4°C antes de aplicar no gel. As concentrações crescentes de FEZ1 (0,5 a 40 μM) foram incubadas com 20 μM de RAR seguindo as mesmas condições das incubações anteriores. Aplicou-se 10 μl de cada incubação, a migração ocorreu durante 3 horas, 4°C, 60V.

3.3 Cross Linking

As prote nas FEZ1 e SCOC (7 μM de cada) foram incubadas durante 30 minutos a 4°C, posteriormente, adicionou-se 1,8mM de DSS e incubou-se por mais 2 horas em temperatura ambiente sob agitação leve. Essas amostras foram corridas em gel de acrilamida SDS-PAGE e a bandas obtidas foram retiradas com bisturi para digestão com tripsina.

3.3.1 Digestão das bandas com tripsina

A digestão foi feita segundo o protocolo Anal.Chem., 1996 68:850-858 modificado obtido no site do Lnbio (<http://lnbio.cnpem.br/massspectrometry/main/sample-preparation/>, 04/01/2013)

3.4 Ensaio de Cristalização de 6xHisSCOC (42-122)

Foram feitos *varreduras* iniciais com kits comerciais de cristalização (*Crystal Screen and Crystal Screen 2* e *SaltRx* da *Hampton Research*; *Wizard I e II*, *Precipitant*

Synergy da *Emerald BioSystems* ; e *PACT* e *JCSG+* da *Nextal/Qiagen*). Os ensaios foram feitos em placas de 96 poços, com método de difusão de vapor com gota sentada, montadas pelo robô de pipetagem *HoneyBee 963* (*Genomic Solutions*), com gotas de 1 μ L de proteína e 1 μ L solução de poço, com 80 μ L de solução no poço. As placas foram mantidas a 18°C em robô de fotodocumentação *Rock Imager UV* (*Formulatrix*), sendo fotodocumentadas em tempos específicos com luz visível e UV.

3.5 Ensaio de Hibridação de RNA *in situ* (ISH)

As hibridações de RNA *in situ* foram realizadas em colaboração com a pesquisadora Dra. Hozana A. Castillo (LNBio), com embriões de galinha nos estágios: HH7, HH8, HH10, HH12 e HH14 (Hamburger e Hamilton 1951) e usando sondas de RNA anti sense para FEZ1.

Inicialmente, o cDNA de FEZ1 foi amplificado a partir de uma biblioteca de embrião de galinha com a enzima Taq polimerase e os oligonucleotídeos específicos para cada gene. Os produtos de PCR foram observados em gel de agarose 1%, o DNA foi purificado, clonado no vetor pGEM-T Easy e seqüenciado. Os clones foram então digeridos com enzimas de restrição localizadas a jusante e a montante do gene clonado. Em seguida, o vetor linearizado foi utilizado na reação de transcrição *in vitro*, para sintetizar as sondas de RNA sense e antisense. A transcrição *in vitro* foi realizada a 37°C por 3 horas com 1 μ g de DNA plasmídeo linearizado, 2 μ L de tampão de transcrição 10x, 1 μ L de DTT 100 mM, 1 μ L de mix contendo digoxigenina-11-UTP, 0,5 μ L de Rnasin e 2 μ L de T7 ou Sp6 RNA polimerase.

O vetor contendo o gene de FEZ1 de galinha foi linearizado com a enzima de restrição *Nde-I* e em seguida, o vetor linearizado foi utilizado na reação de transcrição com a T7 RNA polimerase, que sintetizou a sonda de RNA sense. O DNA plasmídeo linearizado com a enzima *Apa-I* foi substrato para a reação de transcrição com a SP6 RNA polimerase e gerou a sonda antisense. Após a reação de transcrição *in vitro*, as amostras foram tratadas com DNaseI e incubadas a 37°C por 15 minutos. As sondas foram purificadas em colunas 450G (GE).

Brevemente, o protocolo de ISH consiste em: Coleta e fixação dos embriões de galinha com paraformaldeído 4%. Desidratação em metanol (25%, 50%, 75% e 2x100%). Pode-se armazenar os embriões em -20°C por tempo indeterminado. No primeiro dia da *in situ*: hidratação em bateria de metanol (75%, 50%, 25% e 2xPBS(T).

Clarear o embrião com H₂O₂, seguida por lavagens em PBS. Permeabilização com Proteinase K 10 ug/mL (tempo de incubação de acordo com o tamanho do embrião), seguida por lavagens. Pós-fixação com PFA 4%, glutaraldeído 0,2%. Pré-hibridação com solução Hyb (50% Formamida, 5X SSC, 50µg/ml Heparina, 500 µg/ml tRNA, 0.1% Tween-20, 92 µl de ácido cítrico 1M pH 6.0) em câmara úmida a 65°C por 3h. Hibridação da sonda (desnaturada e diluída em solução hyb) por 16 horas a 65°C. Lavagem quente com solução de formamida, SSC (3 M NaCl, 0.3 M citrato de sódio, pH 7) para aumentar a estringência de ligação da sonda com o mRNA. Lavagem pós-hibridação com o tampão MAB(T)-levamisole para inativar a fosfatase alcalina endógena. Incubação do anticorpo anti-digoxigenina conjugado com fosfatase alcalina por 16 horas a 4°C.

3.6 Ensaio em cultura de célula imortalizada HEK293T

3.6.1 Imunocitoquímica: Fixação e marcação com anticorpo.

Em cada poço de uma microplaca de 24 poços, 150000 células foram transfectadas com pCDNA-SCOC e EGFP-FEZ1, utilizando como agente carreador a *Lipofectamine 2000* (Invitrogen). Após 48 horas da transfecção, as células foram fixadas com 300 µL de paraformol 2% em PBS, pH 7.4 e temperatura de 37°C. Em seguida, elas foram lavadas 2 vezes com PBS para retirar o excesso de fixador. A permeabilização das células consistiu em incubação das mesmas com Triton X-100 0,3% em PBS por 10 min a temperatura ambiente. Em seguida, foram feitas 3 lavagens de 5 min cada com PBS e incubadas com anticorpos primários anti-flag mouse (1:100, Sigma) e anti-RARA (1:300 abcam) em PBS contendo 0,1% de BSA durante uma hora em temperatura ambiente, os poços foram lavados 5 vezes com PBS e incubados com o anticorpo secundário anti-mouse conjugado à rodamina (1:200, Santa Cruz Biotechnology), Hoechst 33258 (1 µg/mL) foi usado para corar o núcleo. As laminulas foram incubadas novamente durante 1 hora a temperatura ambiente, e, finalmente foram lavado 10 vezes com PBS e fixadas na lâminas com fluoramount e vedadas com esmalte. Essas lâminas foram fotografadas no microscopia confocal multifóton (DEQ - GMVN - Grupo de Materiais Vitreos e Nanoestruturas) - Prof Carlos Lenz César (Grupo de Biofotônica, Departamento de eletrônica quântica, Instituto de Física Gleb Wataghin-Unicamp (IFGW), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica Aplicada à Biologia Celular (INFABIC)

3.6.2 Imunoprecipitação.

Para ensaio de imunoprecipitação de FLAGFEZ1, as células foram transfectadas com 6E de PEI (Polyethyleneimine) e 15mM NaCl e 20 µg de pCDNA FLAGFEZ1 em garrafa de 75cm². Depois de 48 horas que as células foram transfectadas, foram colocadas no gelo e lisadas com 600 µl de tampão (50mM Tris; 150mM NaCl; 1mM EDTA; 1%triton; 1 pastilha protease inhibitor cocktail Roche/10 ml de tampão) . O conteúdo foi transferido para um tubo de fundo cônico de 1,5ml deixado no gelo por 20 minutos e agitado de 5 em 5 minutos. O lisado foi centrifugado (14000rpm/20 min/4°C), o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e 40 µl de cada amostra foram reservados para correr no gel de poliacrilamida (lisado total). A concentração de proteínas totais foi medida pelo método de Bradford.

O sobrenadante foi incubado com resina conjugada a FLAG (anti-flag m2 affinity gel sigma) 16h/4°C e posteriormente, realizou-se a eluição com peptídeo 150ng/µl (3X FLAG Peptide sigma) durante 2 horas a 4°C sob agitação e correu-se gel SDS –PAGE das amostras para western blot.

3.6.2.1 Western blot da imunoprecipitação

Para a transferência das proteínas para a membrana foi utilizado o *Semi-Dry Blotting System* (The W.E.P. Company). Para tanto, papéis Whatman 3 MM embebidos na solução de transferência (300 mM Tris-HCl pH 10,4 e 10% de metanol) foram postos em contato com a membrana PVDF (fluorida de polivinilino) seguida do gel e mais 3 papéis equilibrados também com solução de transferência sendo estes últimos postos em contato com o pólo negativo do aparelho. A transferência foi feita por um intervalo de 60 a 90 minutos a 1 mA por cada cm² de gel. Após a transferência, a membrana foi bloqueada em solução contendo 5% de Leite em pó Molico desnatado em tampão TBS 1X (10 mM Tris-HCl pH 7,2; 150 mM NaCl) com 0,05% Tween 20 e incubada por 2 horas à temperatura ambiente sob agitação a 40 rpm ou durante a noite.

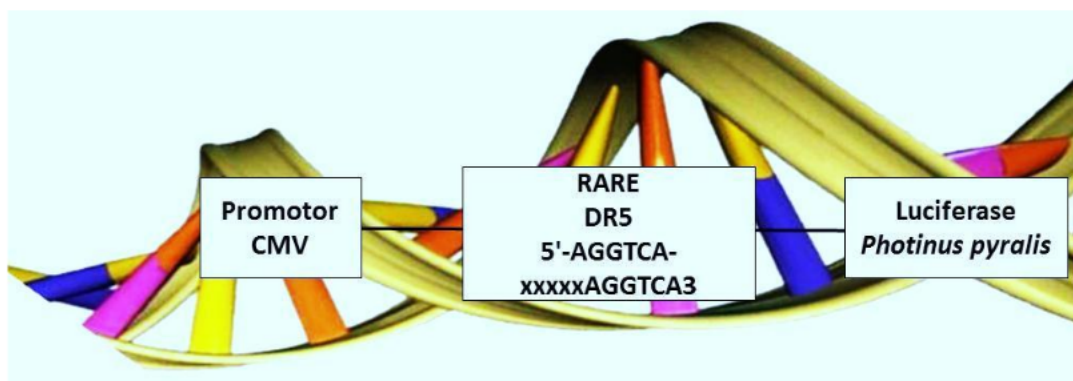
Usou-se anticorpo primário anti-flag (1:2000 Sigma) e anticorpo secundário anti-rabbit (1:5000 Qiagen) sendo que cada um deles foi diluído em TBS 1X e a membrana de transferência foi incubada durante 1 hora a temperatura ambiente com o anticorpo-primário, lavou-se 3x com TBS 1X e incubou-se com o anticorpo secundário por mais 1

hora . A membrana foi lavada novamente três vezes consecutiva por 10 minutos em solução 1X TBS. Os sinais foram visualizados com o uso do *Western Blotting Luminol Regent* (Santa Cruz Biotechnology) e os procedimentos para essa etapa final foram feitos de acordo com as especificações do fabricante. A membrana foi exposta em Hyperfilm-MP (GE Healthcare) de 2-7 minutos para as membranas com anticorpo anti-his e de 10 minutos para as membranas com anticorpo anti-flag foram reveladas.

3.7 Transativação de luciferase (firefly) com receptor do ácido retinóico RARA

Nesse estudo, objetivou-se entender o papel de FEZ1 na maquinaria regulatória de transcrição onde o RARA esta envolvido. Para isso usou-se um sistema de transativação de luciferase dependente da interação do RARA com seu elemento responsivo DR5. Utilizou-se o elemento responsivo DR5 (2 repetição randômica 5'-AGGTCA-3 com 5 nucleotídeos entre elas- RARE) pois essa sequência é reconhecida por RARA que esta localizada posteriormente ao promotor CMV e a enzima luciferase (como será descrito a seguir) Esse ensaio foi feito em colaboração com a Doutora Ana Carolina Migliorini Figueira (LEC-LNBio), de quem também recebemos os plásmideos necessários para o funcionamento do sistema, sendo eles:

□ pGL3-DR5tk-Luc; esse vetor é composto pelo RARE DR5 localizado posterior ao promotor CMV e posteriormente ao promotor, está localizada a sequência de DNA da luciferase de *Photinus pyralis*, como mostra o esquema a seguir:



□ pRL-CMV; vetor tipicamente usado como controle de transfecção para experimentos de transativação, uma vez que ele apresenta a sequência de DNA de Luciferase de *Renilla* que pode ser transcrito independentemente de transativação.

Uma vez que o RARA se liga ao DR5, promove a transcrição de luciferase que é detectada, indiretamente. Após lise das células, adição do substrato luciferina, produzindo luminescência detectada em luminômetro (Glomax-Promega). As células HEK 293T foram plaqueadas e transfectadas nas mesmas condições descritas no item 3.6.1. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas, os plasmídeos utilizados em cada poço estão descritos na figura 10:

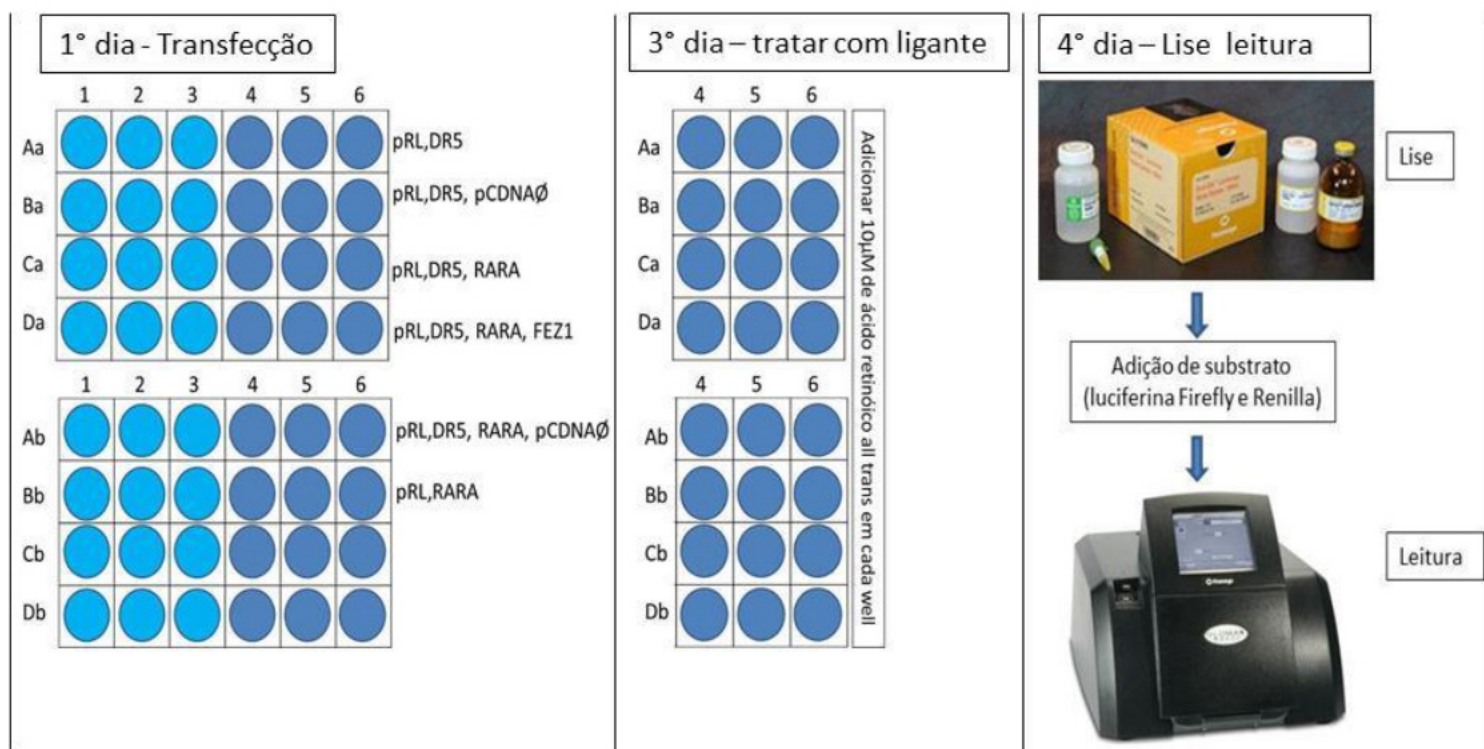


Figura 10. Esquema representativo para ilustrar as etapas do experimento de transativação da Luciferase. Como mostra o esquema, no primeiro dia realizou-se a transfecção das células em placa de 24 poços, os plasmídeos utilizados estão descritos no primeiro quadrante. Após 24 horas adicionou-se 0,1µM ácido retinóico *all tras* (segundo quadrante), após 24 horas as células foram lisadas e a intensidade de luminescência foi medida (terceiro quadrante).

As células foram transfectadas como descrito no item 3.6.1 e após 24 horas, retirou-se o meio das células e ao meio novo (DMEM), adicionou-se o ligante (0,1 µM ácido retinóico ATRA (Sigma), sendo que a diluição foi feita em Dimetil Sulfoxida (DMSO). Para os poços que não receberam o tratamento com o ligante adicionou-se somente DMSO (1%).

3.7.1 Lise, adição do substrato de luciferase (luciferina) e leitura da luminescência

Depois de 24 horas da adição do ligante, procedeu-se com a lise e leitura de luminescência das células com o Kit Dual-Luciferase® Reporter Assay (Promega). Para o procedimento de lise celular, primeiramente lavou-se as células com PBS, adicionou-se 100 μ l de tampão de lise durante 40 minutos, 37°C, 200rpm. Esse Kit possui um tampão de lise e dois substratos de luciferase (luciferina) provenientes de animais diferentes, um deles é a luciferina de *Photinus pyralis* (LARII), o qual é primeiramente adicionado ao lisado de células e corresponde ao substrato da luciferase transcrita pela transativação do RARA. Enquanto a luciferina de Renilla (SG) é substrato da luciferase presente no plasmídeo pRL usada nesse experimento como controle de transfecção, uma vez que a transcrição dessa enzima é independente de transativação. Portanto, adiciona-se primeiramente LARII ao lisado, é feita a leitura e, posteriormente, adiciona-se o substrato SG ressuspendido em tampão capaz de inativar o efeito da primeira reação e a leitura é feita novamente. O aparelho usado para medir a luminescência foi o leitor de placa de 96 poços luminômetro Glomax (Promega).

3.8 Anisotropia de fluorescência

A anisotropia de fluorescência mede indiretamente a movimentação e o tamanho das moléculas, complexos maiores possuirão maiores valores de anisotropia por se deslocarem mais lentamente. Essa técnica foi usada para medir a força de interação proteína-proteína (6xHisFEZ1 e RARA DL) bem como a interação entre DR5 e RARA na ausência e presença de FEZ1. Com esses dados, foi possível calcular o valor da constante de dissociação das interações testadas. Todos os ensaios de anisotropia apresentados aqui foram uma média de 3 experimentos independentes. Esses estudos foram realizados também em colaboração com a Doutora Ana Carolina Migliorini Figueira (LEC-LNBio). Recebemos o clone de RARA DL em pET28a e fizemos expressão e purificação conforme foi descrito no item 3.1.2

3.8.1 Marcação de RARA DL com sonda fluoresceína FITC

A sonda FITC (isotiocianato de fluoresceína) tem a propriedade de se ligar em grupos amina e sulfidril de proteínas por possuir um grupo isotiocianato, o que permite detectar o padrão de fluorescência proteica de acordo com a mudança de tamanho da

molécula. As frações puras de RARA DL pós cromatografia por exclusão molecular, foram concentradas para 5,42 mg/ml (142 μ M) em concentrador Amicon Ultra-2 mL Centrifugal Filters e incubadas com sonda FITC (0,5mM), protegido de luz, durante 16 horas a 4°C. Após esse período a proteína marcada foi inserida em coluna Hitrap desalting 1ml (GE Healthcare) e lavada com 11 volumes de tampão (300mM de NaCl, 50mM de Hepes, 5mM de Imidazol, 5% de glicerol, pH8,0) para retirar o excesso de sonda livre, a proteína foi eluída logo no início da lavagem, na fração 3, uma vez que na coluna de desalting a proteína não entra na matriz, somente a sonda, a proteína sai no volume morto da coluna. Todas as frações foram coletadas em tubo de fundo cônico (1,5ml) protegidos de luz para medida de concentração em dois comprimentos de onda : [280nm] (detecção da concentração de proteína) e [495nm] (detecção de sonda FITC). A fração 3 de eluição foi escolhida para ensaio uma vez que apresentou os maiores valores em ambas medidas de excitação; [280nm]= 0,06mg/ml (494nM) e [495nm]=0,02. Nesse procedimento ocorreu uma grande diluição da proteína, considerando que antes desse processo, a concentração de RARA DL era de 142 μ M e depois da marcação recuperou-se 494 nM em 1 ml, entretanto essa concentração foi suficiente para o experimento uma vez que foi necessário somente 50 nM de RARA FITC para ensaio de anisotropia.

3.8.2 Ensaio de titulação da interação de FEZ1 e RARA DL e leitura de fluorescência.

As proteínas foram incubadas por 16 h, 4°C, em placas de 384 poços com de 50 μ l de volume. Sendo assim incubou-se 50nM de RARADL FITC com um gradiente de concentração de FEZ1 de 0 a 25000 nM. Todas as medidas foram feitas em triplicatas, assim como as leituras de cada poço. As placas foram lidas em *fluorescence microplate reader* (ENVISION), utilizando filtros de polarização de excitação e emissão para fluoresceína, segundo informações do fabricante e a análise dos dados feitas no programa Sigmaplot com ajuste da dados aplicando-se a equação de Hill.

3.8.3 Ensaio de titulação da interação de DR5, RARA DL e FEZ1 e leitura de fluorescência.

Ensaio de ligação do DNA isotermal DR5 e RARA foram avaliados usando um espectrofotômetro ISS-PC1 (ISS, Champaign, IL), em geometria de um \perp . A excitação foi iniciada com 480 nm e a emissão captada a 420 nm através de uma onda curta laranja (filtro OG515). Os valores de anisotropia foram calculados como descrito em estudos prévios (Figueira, A C *et al* 2010).

3.9 Emprego do sistema de duplo-híbrido para identificação de proteínas que interagem com SCOC

3.9.1 Pré-screening: Transformação de leveduras L40

Antes de iniciar o experimento, acertou-se o banho-maria em 45°C, desnaturou-se o SSDNA, as alças de Drigalski foram descontaminadas com hipoclorito de sódio. Primeiramente, inoculou-se e ressuspendeu-se 1 colônia grande e isolada da *Saccharomyces cerevisiae* L40 (plaqueada em meio YPD sólido) em 50 μ L de água Milli-Q¹ em vórtex (~20s). Esse conteúdo foi adicionado em 50mL de YPD líquido (YPD; 0,5% extrato de levedura, 1% peptona, 2% glucose) e incubado à 30°C / 200rpm / ~24h (até a fase estacionária). Posteriormente, 1mL do inóculo foi utilizado para cada transformação. As transformações foram feitas de acordo com os itens da tabela 5:

Tabela 5. Plasmídeos usados para transformação das leveduras

pBTM116. SCOC	Grupo 1
pBTM116 <i>fez1</i> full lenght (controle positivo)	
pBTM116 <i>fez1</i> 221-392 (controle negativo)	
pBTM116 SCOC + pACT vazio	Grupo 2
pBTM116 <i>fez1</i> full lenght + pACT vazio	
pBTM116 <i>fez1</i> 221-392 + pACT vazio	

As alíquotas de 1 ml foram separadas em tubos de fundo cônico de 1,5 ml e centrifugadas 3min / 5000rpm / TA, retirou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuspenso em 200 μ L do tampão de transformação (1340 μ L PEG 50% 3.350, 200 μ L

acetato de lítio (2M), 200 μ L TE 10, 200 μ L DTT 1M), as amostras foram vortexadas. Acrescentou-se 5 μ L de SSDNA 10mg/mL desnaturado 95°C / 10min e 3min em gelo para evitar renaturação e as construções dos grupos 1 ou 2. FEZ1 *full lenght* foi usada como controle positivo pois a região N-terminal dessa proteína acarreta em autoativação e a região C-terminal, ao contrário, foi usada como controle negativo pois não autoativa. As amostras foram incubadas 40min / 45°C, e eventualmente foram agitadas. Esse conteúdo foi centrifugado 3min / 5000rpm / TA e 100 μ L do sobrenadante descartado.

As construções do grupo 1 foram plaqueadas em meio seletivo SD -W (meio diferencial serratia, *sem triptofano*) e as amostras com as construções do grupo 2 foram plaqueadas em meio seletivo SD-WL (meio diferencial serratia, *sem triptofano e sem leucina*). As colônias que cresceram no meio SD-W foram ressuspensas em 50 μ L de água milli-Q estéril e transferidas para duas placas de meio SD-W, uma para fazer teste de ativação do gene repórter da β -galactosidase e a outra para usar o screening posteriormente. Além disso, as colônias também foram repicadas para 6 placas de SD-WH (meio diferencial serratia, *sem triptofano e sem histidina*), uma delas sem 3-aminotriazole e as outras 5 com concentrações variadas de 3-aminotriazole (5,10,20,30 e 50mM), para verificar a ativação do gene repórter da *HIS3*. Todas as placas foram divididas em 3 partes e para cada construção foram feitos 3 pingos de 4 μ L separadamente.

3.9.1.1 Teste de autoativação dos genes repórteres β -galactosidase (teste do azul)

Com um papel filtro aderiu-se as colônias que cresceram em SD-W, o papel foi transferido para o nitrogênio líquido por 3 minutos e, posteriormente, embebido de tampão Z (para 50 ml: 0,80g Na₂HPO₄.7H₂O (0.06M) ; 0,28g NaH₂PO₄.H₂O (0.04M) ; 0,5 mL 1M KCl (0.01M) ; 0,05 mL 1M MgSO₄ (0.001M); 0,135 mL β -mercaptoethanol (BME) (0.05M) . pH 7,0), X-gal (20 mg/ml). Colocou-se o filtro na estufa a 37°C durante 4 horas e depois em capela para secar até o dia seguinte.

3.9.2 Screening de SCOC como isca.

3.9.2.1 Amplificação de biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano (clontec) para duplo híbrido.

Foram preparadas 40 placas (150mm²) de meio sólido Luria-Bertani (LB) com antibiótico ampicilina, cujo plasmídeo pACT possui resistência. Colocou-se 32,5 L das bactérias com os cDNAs de cérebro fetal humano (BNN-132 Clontec) em 16 ml de meio LB, esse conteúdo foi plaqueado em meio LB sólido preparado anteriormente (400 L em cada placa).

As placas foram armazenadas na estufa a 37° C durante 18 horas. No dia seguinte, adicionou-se em cada placa 5 ml de meio LB com 20 % de glicerol e raspou-se as colônias das placas para um becker estéril. O conteúdo do bécker foi transferido para tubos falcon de 50 ml e estocados a - 80°C. Foram feitas maxipreparações dessa biblioteca.

3.9.2.2 Inóculo e plaqueamento das leveduras L40

Inoculou-se uma colônia de PBTMK116.SCOC (2-82) em 150 ml de SD -W e deixou crescer por 48 horas 30°C/200rpm, após esse período mediu-se a absorbância do meio a 600 nm (OD₆₀₀) e estava próxima de 1,5, esse é o ponto ideal de crescimento. Centrifugou-se o conteúdo em tubo estéril 3.500rpm / 21°C / 5min e inoculou-se em 1L de meio YPD líquido, depois de 1:30 h mediu-se a OD₆₀₀ que estava em 0,4. O conteúdo foi centrifugado 3000rpm / 21°C / 10min em frascos de 1L .Desnaturou-se o SSDNA (20mg/mL) de esperma de salmão 15min / 95°C durante 10min no gelo. Lavou-se o pellet com 400mL TE 1X, centrifugou-se novamente a 3000rpm / 21°C / 10min.

Foram preparados 10mL de tampão 1XTE LiAc (1mL TE 10X pH 7,5, 1mL Acetato de Lítio 1M, 8mL água esterilizada) e 100mL PEG/LiAc (80mL PEG 50% 10mL TE 10X, 100mM Acetato de Lítio) para o procedimento de transformação com as bibliotecas de cDNA: cérebro fetal humana e medula óssea (Clontech).

Ressuspendeu-se o pellet em 8mL (total) de 1XTE/LiAc e separou-se 2 alíquotas de 200L para controles negativos (água e pACT vazio); dividiu-se , igualmente, em dois tubos falcon estéreis de 50mL; acrescentou-se, à cada falcon, 50L de SSDNA desnaturado e 75L da maxiprep específica (biblioteca cérebro fetal humano e medula óssea); a cada falcon foi acrescentado 30mL de PEG/LiAc; nas alíquotas controle acrescentou-se 5L de SSDNA desnaturado e 10L de água esterilizada ou 3L de pACT vazio e 0,6mL de PEG LiAc; Vortexou-se; incubou-se 30°C / 30min / 200rpm

(shaker); deu-se choque térmico: 15-20min / 42°C misturando esporadicamente; 3min em gelo; centrifugou-se 3000rpm / 5min / 21°C; ressuspendeu-se com 5mL TE 1X, para cada falcon.

Esse conteúdo foi dividido em 20 placas de petri 90x15mm , 250 μ L por placa SD -WLH (meio diferencial serratia, *sem triptofano*, leucina e histidina) + 10mM 3AT). Acondicionou as placas em estufa 30°C. Titulou-se os inóculos: 1:10 / 1:100 / 1:1000 do duplo-híbrido e plaqueou-se em placa SD - WL para avaliar a eficiência da transformação. Controles: a água foi plaqueada em -WH e o pACT em SD-WL

As placas permaneceram na estufa a 30°C durante 11 dias, a partir do quarto dia surgiram colônias. O aparecimento das colônias foi monitorado e contabilizado diariamente.

3.9.3 Teste de crescimento das leveduras pós-screening

Todas as colônias que cresceram no screening foram plaqueadas novamente em meio SD-WLH com concentrações variadas de 3-AT (0, 10, 50 e 100 mM) para avaliar a eficiência das interações e em duplicata SD-WL para teste de ativação do gene repórter da β -galactosidase e para extração do DNA.

3.9.4 Extração de DNA das leveduras

Em uma placa *Deep Well* inoculou-se em 1 mL de meio SD-L, independentemente, colônias identificadas no Y2H. Incubou-se a placa a 30°C, 300 rpm por 46 h. Após incubação, centrifugou-se a 2.700 rpm, 22 °C por 8 min e descartou-se o sobrenadante.

Ressuspendeu-se as células em 1 mL de rescue buffer¹, seguido de centrifugação. Após descarte do sobrenadante, elas foram ressuspendidas em 25 μ L de solução de lise² e incubadas a 37 °C, 150 rpm por 1 h. Depois, adicionados 25 μ L de solução SDS 10% e homogeneização, incubou-se a temperatura ambiente por 5 min e posteriormente foram congeladas a -80 °C por 15 min. Após descongelamento,

¹ **Rescue Buffer (400ml):** 8,0 mL de EDTA 0,5 M, 20,0 mL tris-HCl 1,0 M e 1,2 mL β -mercaptoetanol.

² **Solução de lise:** zimoliase 2,0 mg mL⁻¹ e RNase 0,2 mg mL⁻¹ solubilizados em rescue buffer.

adicionou-se 100 μL de acetato de potássio 3M, seguido de homogeneização e centrifugação a 4.000 rpm, 4 °C por 15 min.

Recolheu-se 120 μL do sobrenadante de cada extração em placa *Microamp*, sendo adicionados 84 μL de isopropanol e incubação a -80 °C por 20 min. Centrifugou-se a placa a 4.000 rpm, 4 °C por 30 min e descartou-se o sobrenadante. Lavou-se o *pellet* com 100 μL de etanol 80 % gelado. Centrifugou-se por 10 min a 4 °C, sendo descartado o sobrenadante. Ressuspendeu-se o *pellet* em 10 μL de água miliQ.

3.9.5 Transformação das bactérias *E. Coli* DH5 α com os DNAs extraídos das leveduras

Após a extração de DNA das leveduras, usou-se todo o produto obtido ao final do item anterior para transformar 100 μL de células DH5 α termo-competente, que foram então plaqueadas em meio LB com ampicilina (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e incubadas a 37 °C *overnight*. Verificado o aparecimento de colônias, usaram-se estas para extração de DNA plasmidial segundo protocolo em QIAprep® Spin Miniprep Kit (250). A partir deste, prepararam-se amostras para sequenciamento de DNA usando-se o *primer* do vetor pACT2 (5' AATTCGCGGCCGCGTCGAC3') e procedimento em 3130 *xl* Genetic Analyzer da Applied Biosystems Hitachi. Após o sequenciamento, analisou-se o resultado com o *software* Chromas® e a ferramenta *on line* BLASTX.

3.9.6 Confirmação do duplo-híbrido em levedura

Após a identificação das presas na varredura do Y2H, o próximo passo correspondeu à validação dos resultados. A co-transformação de leveduras com isca e presa, embora seja uma técnica não tão acurada e determinística, permite-nos ter uma idéia sobre quais interações, dentre as identificadas, possuem maior chance de serem *falso-positivas*. Para tanto, usou-se 2 μL de DNA plasmidial das presas (obtido no *Item* 3.9.4) para a co-transformação (conforme protocolo já descrito no *Item* 3.9.1) de linhagens de L40 já transformadas com o plasmídeo pBTM116k+SCOC. Após transformação, as leveduras foram plaqueadas em meio restritivo SD-WL e SD-WLH + 3AT (0, 10, 50 e 100 mM) e incubadas a temperatura ambiente. Vale ressaltar que, uma vez que no *screening* algumas presas foram identificadas repetidamente, escolheu-se apenas um DNA plasmidial destas repetições para proceder a validação. As colônias

contidas em meio SD-WL foram analisadas em teste *de ativação* já descrito decorridos 3 dias da co-transformação. Já as colônias plaqueadas em meio SD-WLH + 3AT foram deixadas crescer durante 10 dias, após o qual se comparou o crescimento das colônias.

4. Resultados e Discussão

4.1 A interação de FEZ1 e RARA

4.1.1 O padrão de polarização de RARA é alterado com titulação de FEZ1

Sabendo-se que RARA foi identificado como parceiro de interação de FEZ1 (Assmann *et al.* 2006), realizou-se experimentos para obter mais informações sobre essa interação. Através de fluorescência por anisotropia, titulou-se a proteína FEZ1 para uma concentração constante de 50 nM de RARA marcada com sonda FITC. Nesse estudo, pudemos observar o padrão diferenciado de polarização conforme aumentou-se a concentração de FEZ1. Com esses dados, calculou-se a constante de dissociação (Kd) da interação das proteínas e verificou-se a cooperatividade da interação através do cálculo da constante de Hill (n) (tabelas 7 e 8). Interessantemente, observamos que o aumento da concentração de FEZ1 provocou uma diminuição no padrão de polarização o que caracteriza a diminuição do tamanho da molécula de RARA marcada com FITC (figura 11).

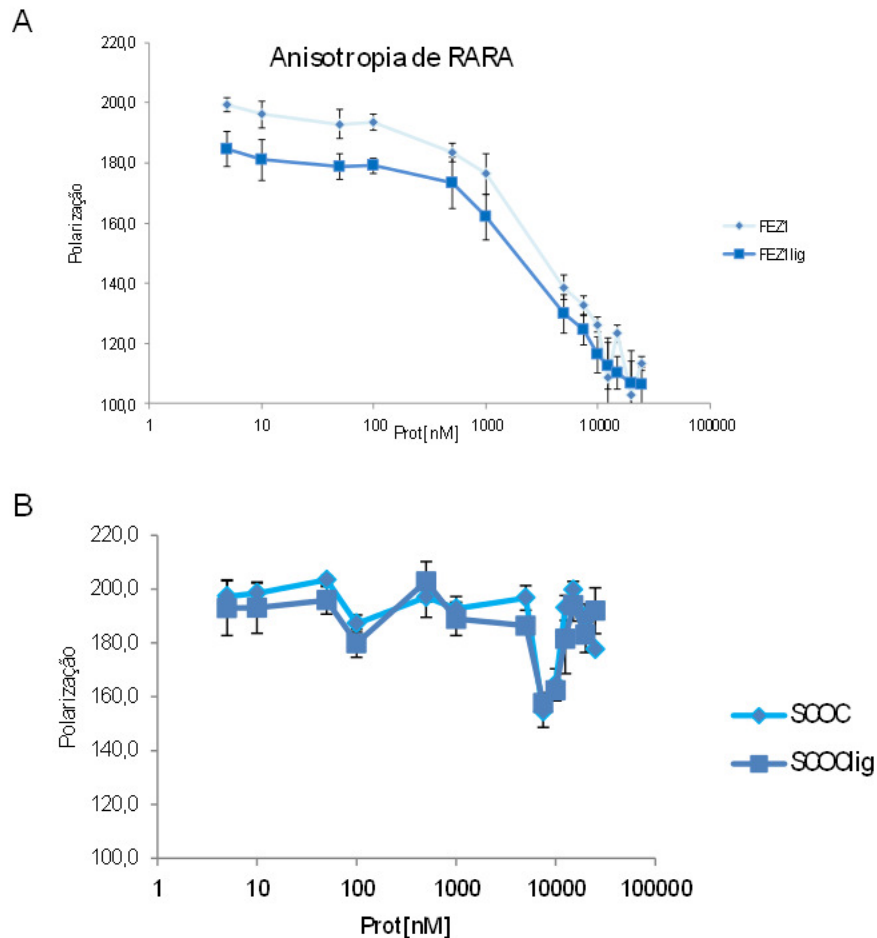


Figura 11. FEZ1 provoca dissociação do estado oligomérico de RARA. A Curva de fluorescência por anisotropia devido associação de FEZ1 com RARA DL marcado com sonda fluorescente (FITC). Nessa curva usou-se 50 nM de RARAFITC e uma concentração crescente de FEZ1 (0 a 25000 nM) na presença e na ausência de ATRA(dados não tratados). B. Controle, curva de fluorescência por anisotropia devido associação de SCOC com RARA DL marcado com sonda fluorescente (FITC)

Antes de iniciar a titulação de FEZ1, RARA apresentou-se com movimento lento, por ser um oligômero de alto peso molecular (um provável dímero ou tetrâmero), com o aumento da concentração de FEZ1, provavelmente, ocorreu dissociação do oligômero, a polarização diminuiu devido à monomerização de RARA, agora em complexo com FEZ1. Até o momento, não existem relatos na literatura para comprovar que RARA forma oligômeros. Sabe-se que RXR pode formar dímero e tetrâmeros em solução em concentração 7 vezes menor que a concentração fisiológica e a dissociação do tetrâmero pode modular a viabilidade do receptor e, assim, contribuir na regulação da

transcrição (Kersten *et al.* 1995). Sabe-se ainda, que receptores nucleares da superfamília dos receptores de hormônios esteróides/tireóide, da qual RARA é membro, dimerizam pelo domínio de ligação ao ligante (LBD) (Zhang *et al.* 1994), mesma região onde possivelmente ocorre interação de FEZ1 com RARA. Todas as isoformas de RAR possuem em seu LBD 9 repetições de 7 aminoácidos HPPHCPC, onde H pode ser qualquer aminoácido hidrofóbico, P aminoácidos polares e C aminoácidos carregados, essa sequência forma uma superfície hidrofóbica em *coiled coil*, denominado zíper de leucina que pode agir como interface de dimerização do receptor (Forman e Samuels 1990).

Vimos ainda que a interação das proteínas ocorre em uma constante de dissociação aproximada de 4 μ M (tabela 7). Interações entre receptores nucleares que geralmente ocorrem em constante de dissociação na ordem de nM (Kawai *et al.* 2004), mas Kd's na ordem de μ M, como identificado aqui, são frequentes para a maioria das interações proteína-proteína em células (Nooren e Thorston 2003). É também constatado que interações fracas (na ordem de mM) podem ocorrer em processos celulares reversíveis e dinâmicos, como por exemplo, na regulação da transcrição (Vaynberg *et al.* 2005). Por outro lado, ao analisar comparativamente as constantes de dissociação (Kd) de FEZ1 e RARA na presença e na ausência do ligante, não foi observado diferença estatística considerável (tabelas 6 e 7), uma vez que o Kd não sofreu alteração significativa e a diferença entre ambas constantes de dissociação de FEZ1 e RARA na presença e na ausência do ligante variaram entre 4,13 μ M e 3,5 μ M, respectivamente, essa diferença estava dentro do limite de erro calculado pelo programa Sigma Plot. Além disso, com o cálculo da constante de Hill (n) (\sim 1), pudemos inferir que a interação entre FEZ1 e RARA não é cooperativa, ou seja, a ligação entre uma molécula de FEZ1 e uma molécula de RARA não facilita a ligação das moléculas seguintes.

Tabela 6. Valores de interação de FEZ1 e RARA sem ligante (ATRA) obtidos no ensaio de fluorescência por anisotropia

FEZ1 sem ligante	
modelo	Hill
Constante dis. (K)	4,13 μ M
n	0,97
Erro padrão	1,5 μ M
equação	$f = a_i + (a_f - a_i) * ((x^n) / (k^n)) / (1 + (x^n) / (k^n))$

Tabela 7. Valores de interação de FEZ1 e RARA com ligante (ATRA) obtidos no ensaio de fluorescência por anisotropia

FEZ1 com ligante	
modelo	Hill
Constante dis. (K)	3,5 μ M
n	1,09
Erro padrão	0,5 μ M
equação	$f = a_i + (a_f - a_i) * ((x^n) / (k^n)) / (1 + (x^n) / (k^n))$

Os dados obtidos do ensaio de fluorescência por anisotropia (figura 11) foram tratados para facilitar a análise de interação de FEZ1 com RARA. Na figura 12, os dados de polarização foram convertidos entre 0 e 1 (Bound Fraction) e subtraiu-se o menor valor de polarização do maior valor para inverter a curva, segundo a equação:

$$[X_{nm} \text{ FEZ1}] = (1 + (\text{polarização maior valor} - x) / (\text{polarização menor valor} - \text{polarização maior valor}))$$

Assim pudemos notar que a fração de FEZ1 ligada em RARA aumentou com o aumento da concentração de FEZ1.

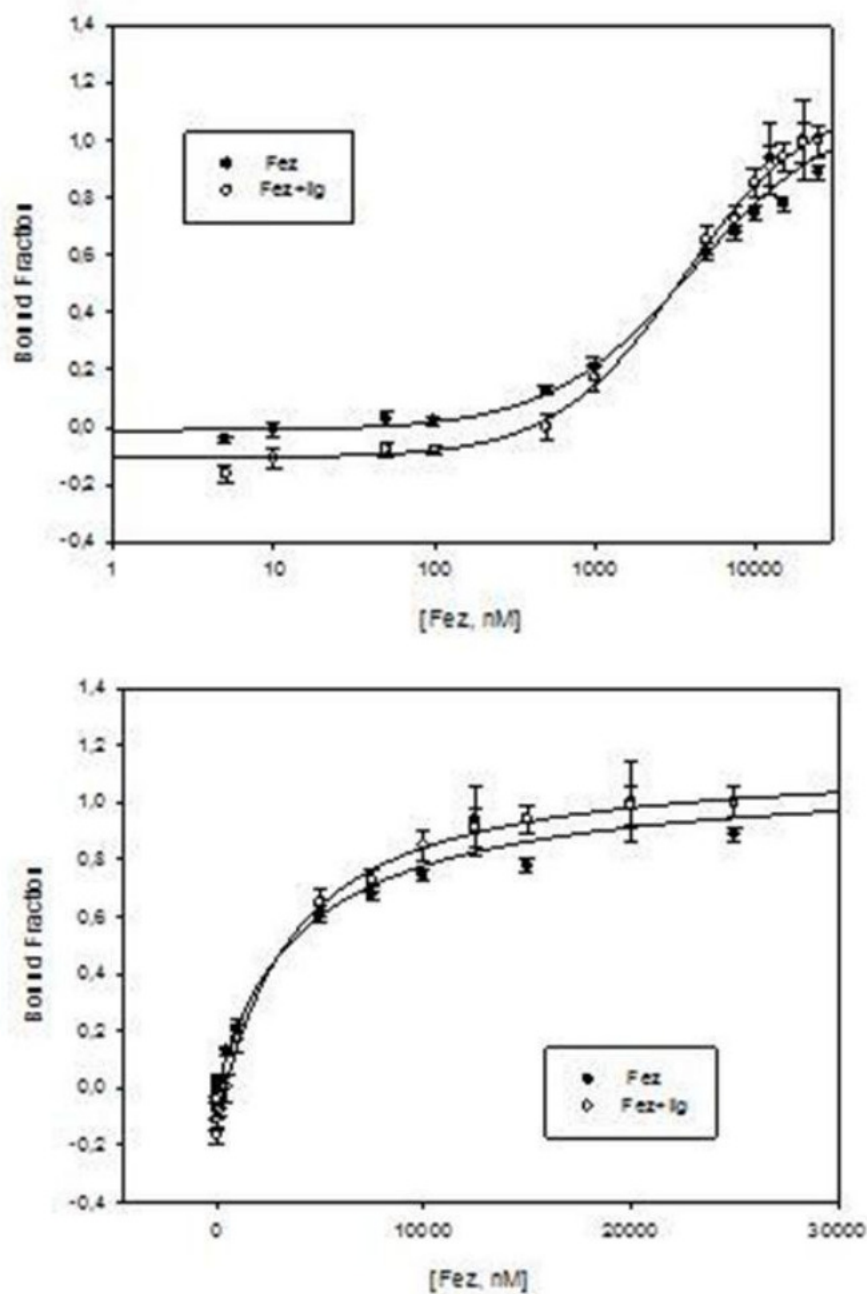


Figura 12. RARA DL (domínio de ligação ao ligante) liga-se à proteína FEZ1. Curva de fluorescência por anisotropia devido associação de FEZ1 com RARA DL marcado com sonda fluorescente (FITC). Nessa curva usou-se 50 nM de RARAFITC e uma concentração crescente de FEZ1 (0 a 25000 nM) na presença e na ausência de ATRA(dados tratados).

4.1.2 Análise da proporção estequiométrica de interação entre FEZ1 e RARA

Em gel nativo foi analisada o padrão de migração de FEZ1 e RARA separadamente, bem como, a proporção em que FEZ1 e RARA formam um complexo. O perfil de migração de RARA é similar ao de proteínas que formam oligômeros, como o RXR (Kersten *et al.* 1995) e FEZ1 (Lanza *et al.* 2009, Alborghetti *et al.* 2010) (figura 13), fato condizente com o resultado de anisotropia, onde também observamos uma possível oligomerização do receptor. O perfil do cromatograma da Gel filtração de RARA também revela uma possível formação de oligômeros, uma vez que é observado mais de um pico de absorvância no momento em que a proteína é eluída (dados não apresentados).

Para analisar o complexo formado entre FEZ1 e RARA, titulou-se FEZ1 (de 0,5 a 40 μM) contra uma concentração constante de RARA (20 μM) e foi observado um padrão diferenciado de bandas com o aumento gradativo da concentração de FEZ1. Esses resultados são evidências de que ambas proteínas estão interagindo e, a partir de 24 μM de FEZ1 houve um deslocamento maior no padrão de bandas, enquanto com 40 μM de FEZ1 foi possível notar que havia FEZ1 livre, pois o padrão de bandas foi similar ao encontrado no poço onde aplicou-se somente FEZ1, isso significa que a interação ocorreu numa proporção aproximada de 1 para 1 (FEZ1/RAR) (figura 13). O mesmo experimento foi realizado com adição do ATRA e não houve diferença no padrão de bandas (dados não apresentados).

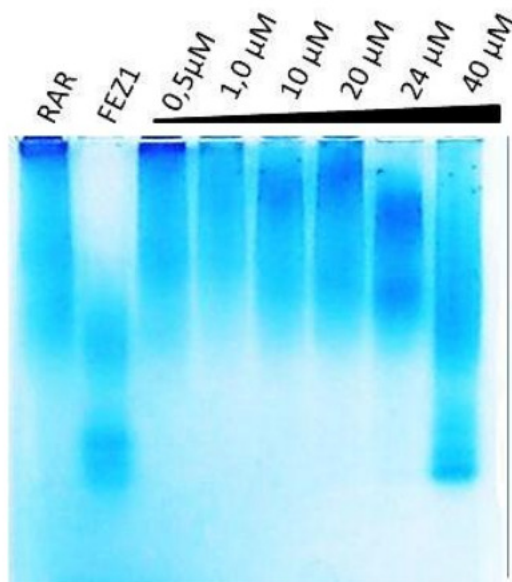


Figura 13. Titulação de FEZ1 em RARA para identificar proporção estequiométrica de interação. Gel nativo 1,5% agarose (Tampão Native PAGE invitrogen). As concentrações crescentes de FEZ1 foram incubadas com 20 μ M de RARA.

Também realizou-se cross linking entre FEZ1 e RARA para mapear a interface de interação e confirmar a proporção estequiométrica observada em gel nativo. FEZ1 possui 49 KDa porém migra em gel de acrilamida com 70 KDa, RAR(DL) possui 39 KDa e migra nesse tamanho, o complexo formado migrou com mais de 170 KDa como mostra figura 14. Os peptídeos que serão obtidos após análise do cross linking, fornecerão informações importantes sobre a região de interação das proteínas e essa informação pode ser aplicada para entender o modo de atuação de FEZ1 e RARA durante a transcrição (dados que serão apresentados a seguir).

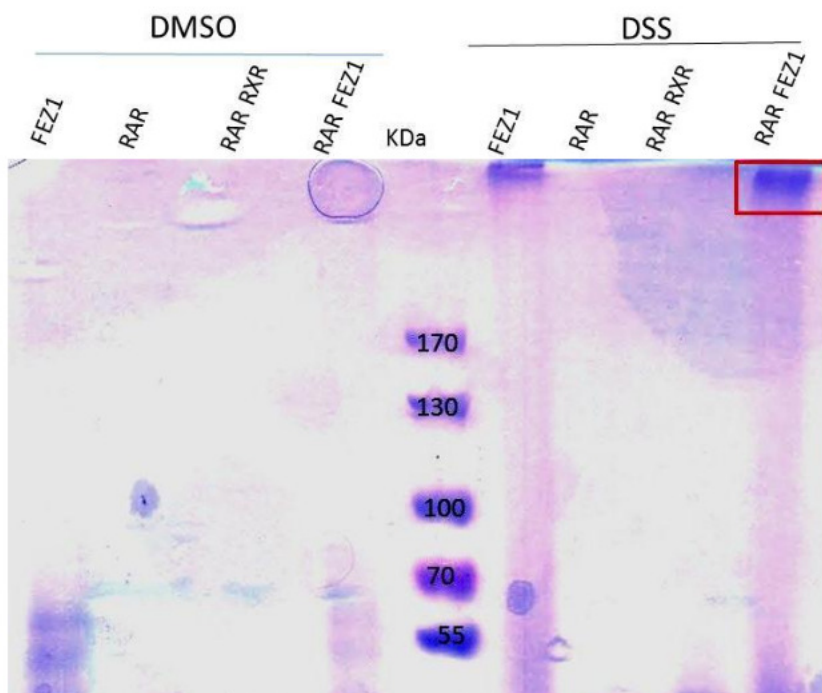


Figura 14. Mapeamento da interface de interação entre FEZ1 e RAR por cross linking. Para identificação de ligações covalentes com DSS (Suberic acid bis (N-hydroxysuccinimide ester) diluído em solvente orgânico DMSO, 7 mM de cada proteína foi incubado durante 2 horas/Temp ambiente com DSS 1,8mM . Corrida durante 5h e 30min, 40V. Para controle as proteínas foram também incubadas somente com DMSO (esquerda do gel) que não aparecem porque saíram do gel devido ao longo período de migração. O retângulo vermelho destaca a banda cortada para identificação por espectrometria de massas.

As bandas destacadas da figura 14 foram digeridas com tripsina e serão lidas em espectrômetro de massas (NanoAcquity Ultra Performance LC coupled with

nano electrospray source on Q-TOF Ultima mass spectrometer, Waters), porém os resultados ainda não foram analisados.

4.2 FEZ1 e RARA colocalizam na região perinuclear

Bloom e Horvitz (1997) observaram que FEZ1 não possui domínio transmembrana, nem sequência sinal característica de proteínas de matriz extracelular, caracterizando-a como proteína intracelular. Mas tarde, verificou-se que FEZ1 pode ser translocada da membrana plasmática para o citoplasma após fosforilação por PKC zeta (Kuroda *et al.* 1999). Através de fracionamento celular de HEK 293 foi possível observar FEZ1 tanto no núcleo como no citoplasma e além disso, foi predito um motivo sinal de localização nuclear (NLS) no C-terminal de FEZ1 (Lanza *et al.* 2008). Esses dados, juntamente com o fato de que FEZ1 interage com vários fatores de transcrição, sendo RARA um deles, sugerem uma função nuclear para a proteína.

Em colaboração com o mestre Deivid Migueleti foram realizados ensaios de imunocitoquímica para identificar a localização intracelular de FEZ1 e RARA, bem como, colocalização de ambas. Para isso transfectou-se GFP-FEZ1 e usou-se anticorpo para a identificação de RARA endógeno em células HEK 293, os preparados foram observados em microscópio confocal. Vimos uma colocalização parcial das proteínas na região citoplasmática próxima ao núcleo (figura 15). Sabendo-se que o deslocamento de RARA do citoplasma para o núcleo é dependente de mudanças pós-traducionais como fosforilação por PCK e sumoilação (Kim *et al.* 2005, Zhu *et al.* 2009), esses resultados mostram que FEZ1 e RARA podem apresentar uma função dinâmica na célula ou ainda, que a cauda GFP pode influenciar na localização intracelular de FEZ1, impedindo, por exemplo, sua migração para o núcleo.

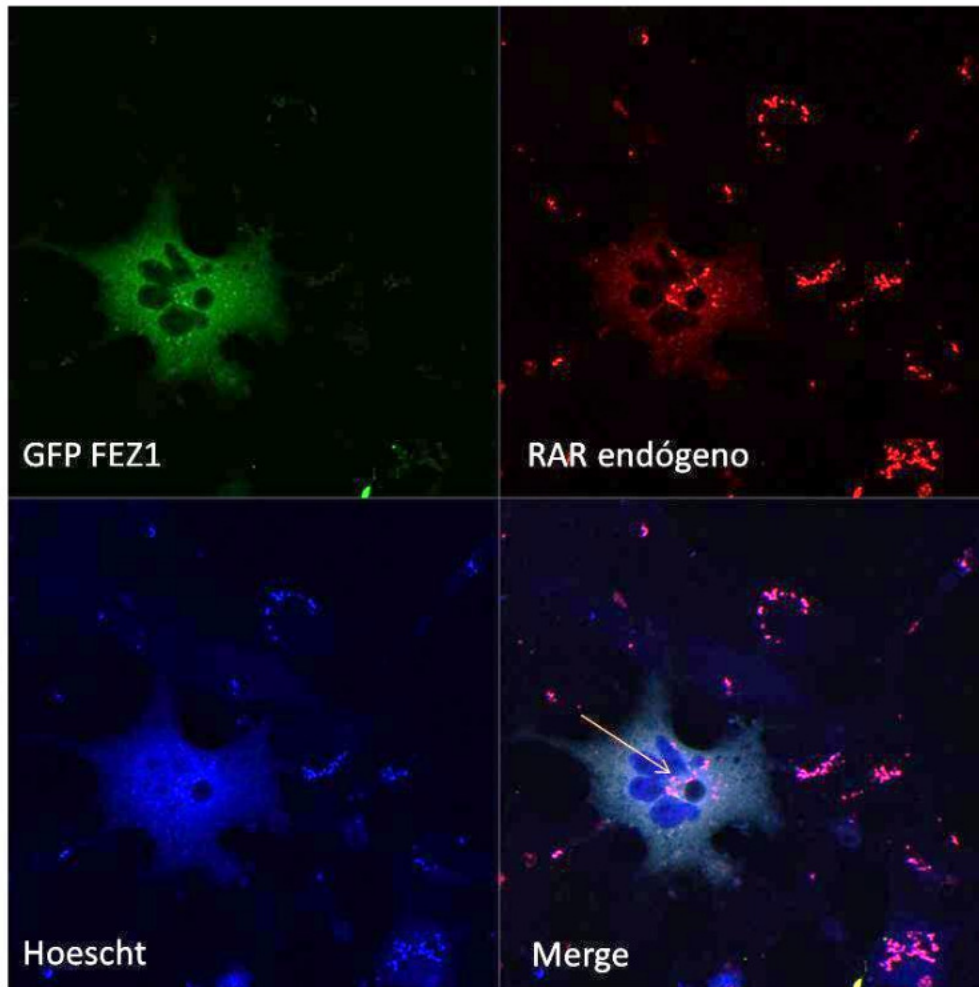


Figura 15. FEZ1 e RARA colocalizam próximos ao núcleo. Imunocitoquímica em HEK 293 mostrando colocalização de GFP FEZ1 (verde) e RARA endógeno (vermelho) próximo ao núcleo. A seta laranja destaca os pontos de colocalização parcial próximos ao núcleo.

4.3 A importância da interação RARA e FEZ1 na transcrição gênica

Com o objetivo de observar a influência de FEZ1 no núcleo e o seu envolvimento com a maquinaria de transcrição de RARA, realizou-se um ensaio de transativação de Luciferase com o Receptor de Ácido Retinóico (RARA) e o elemento responsivo (RARE) DR5 (2 repetição randômica 5'-AGGTCA-3 com 5 nucleotídeos entre elas) em colaboração com a Doutora Ana Carolina Migliorini Figueira (LEC-LNBio). O receptor de ácido retinóico RARA foi encontrado em uma triagem das proteínas da família FEZ (FEZ1 e FEZ2) (Alborghetti *et al.* 2011). Sabe-se que RARA atua como fator de transcrição (Chambon 1996, Maden 2001) juntamente com o seu parceiro RXR (receptor de retinóides) (Plum *et al.* 2001) formando um heterodímero e a ação deles ocorre na presença ou na ausência de seus ligantes, ácido retinóico *all trans* e *9 cis*,

respectivamente. É proposto que todas as isoformas de RAR estão constitutivamente ligadas em seus sítios alvos (elementos responsivos), sendo que, na ausência do ligante elas recrutam corepressores e inibem a transcrição e na presença do ligante recrutam os coativadores e promovem a transcrição (Niederreither e Dolle 2008). Foi possível observar essas afirmações em nosso experimento de transativação por teste do modelo básico padrão (figura 16).

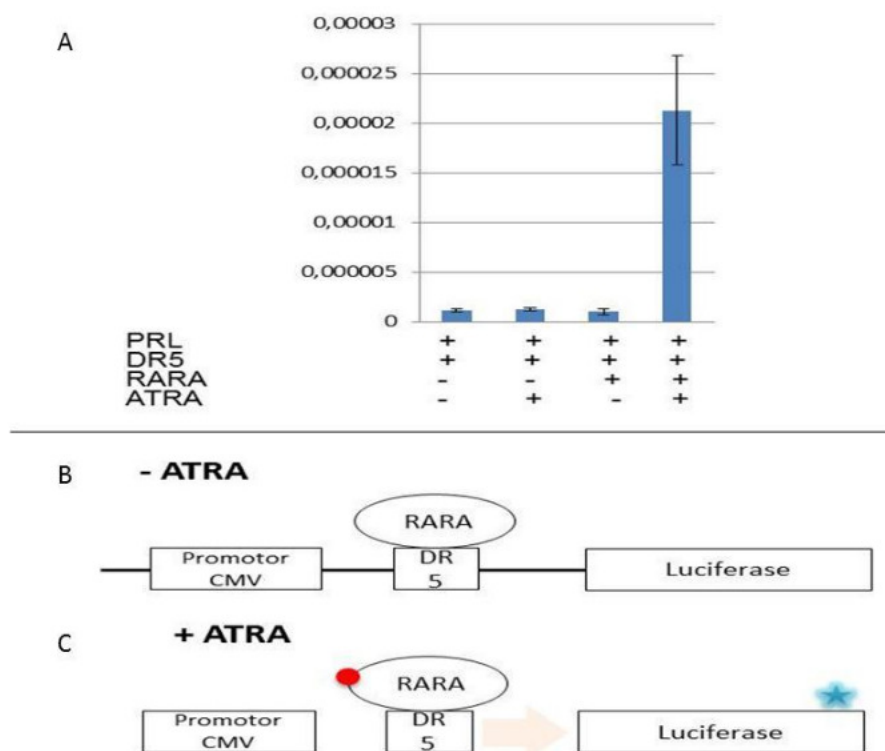


Figura 16. Transativação de luciferase com RARA e ácido retinóico ATRA. A Gráfico mostrando resultados de transativação com o sistema básico, ou seja, RARA, elemento responsivo DR5 e o ligante ácido retinóico ATRA, sendo que o eixo y apresenta a variação de luminescência e o eixo x apresenta as condições de transfecção. pRL é um plasmídeo usado como controle de transfecção que expressa luciferase (Renilla) sob controle do promotor, porém, independentemente de transativação. B Esquema representativo mostrando que não há expressão de Luciferase após a transfecção dos plasmídeos do item A na ausência do ligante ATRA. C Esquema representativo mostrando que há expressão de Luciferase após a transfecção dos plasmídeos do item A na presença do ligante ATRA.

Na figura 16A é possível observar que somente na presença do ligante ATRA ocorreu transativação de luciferase (última coluna do gráfico), pois, como mostra os esquemas (16B e C) a ativação da transcrição é dependente de ATRA pelo mecanismo já descrito no item 1.6 da introdução. Os diferentes elementos responsivos (RARES), regiões de sequência específica e repetitiva do DNA, onde os domínios de ligação ao DNA (DBD) dos receptores nucleares reconhecem e se ligam para iniciar transcrição

possuem afinidade de interação que varia entre os receptores nucleares. Desse modo, enquanto o elemento DR5 é descrito na literatura por ligar-se predominantemente ao heterodímero RAR RXR *in vitro* (Yu *et al.* 1991, Leid *et al.* 1992, Kliwer *et al.* 2002), o elemento DR1 (sequência de 2 repetições randômicas 5'-AGGTCA-3 espaçados por um nucleotídeo) tem afinidade tanto pelo complexo (RAR RXR) como pelo homodímero de RXR RXR (Zhang *et al.* 1992, Zhang *et al.* 1994, Nakshatri e Chambon 1994). Optamos pelo DR5 em nosso experimento uma vez que o nosso interesse foi analisar o papel de RARA e uma possível interferência/contribuição de FEZ1 nesse sistema. A presença endógena do receptor RXR de HEK 293 possibilitou a formação do heterodímero RARA RXR e, conseqüentemente, o funcionamento do sistema, uma vez que RARA sozinho não tem ação nessa via.

Ao inserir a proteína FEZ1 nesse sistema (figura 17), verificamos que, surpreendentemente, deixou de ocorrer repressão da transcrição de luciferase na ausência do ligante como ocorreu no modelo básico (figura 16). A presença simultânea de FEZ1 e RARA promoveu uma transativação surpreendente de 200 vezes comparando-se com a ativação na ausência da proteína FEZ1, sugerindo que RARA, na ausência do ligante *ATRA*, deixa de interagir com reguladores negativos da transcrição e interage com FEZ1 que, por sua vez, pode recrutar coativadores da transcrição. Um indício para suportar essa hipótese é que FEZ1 possui um motivo LXXLL que é comum entre coativadores de receptores nucleares (assunto descrito no item 1.6) (figura 9).

Entretanto, na presença do ligante *ATRA*, a transativação diminuiu cerca de 3 vezes em relação a ativação com FEZ1 sem ligante (figura 17). Sabe-se que RARA sofre mudança conformacional na estrutura terciária na presença de *ATRA* provocando a exposição do motivo AF2 presente na α -hélice 12 que é uma região hidrofóbica e responsável por interagir com o motivo LXXLL, esse é o processo comum para que ocorra a transcrição mediada pelos receptores RAR RXR (figura 8) (Darimont *et al.* 1998).

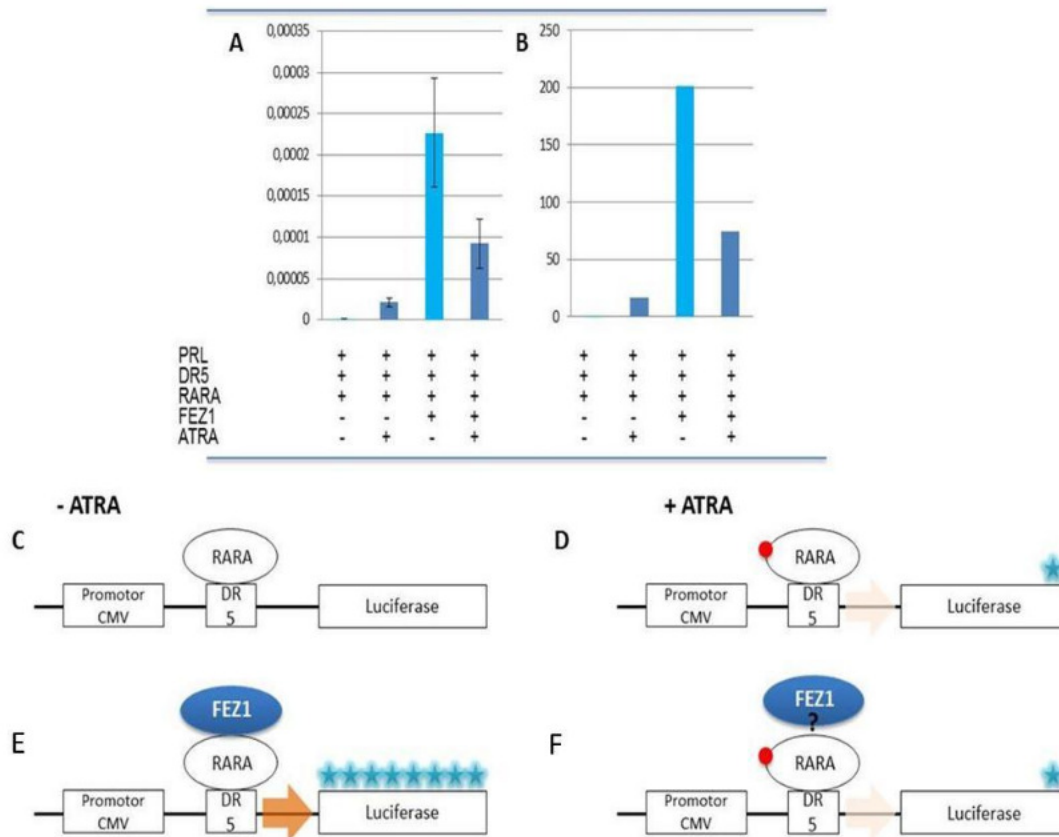


Figura 17. Transativação de luciferase com RARA, ATRA e FEZ1. A Gráfico com resultados não normalizados mostrando resultados de transativação com inserção de FEZ1 no sistema básico, sendo que a luminescência aumenta somente na ausência do ligante, fato contrário ao observado na figura anterior. pRL é um plasmídeo usado como controle de transfeção que expressa luciferase (Renilla sob controle do promotor), porém, independentemente de transativação. B Contem os mesmos dados de A normalizado. C a F Esquema representativo mostrando resultados obtidos no gráfico. C e D não há superexpressão de FEZ1. E e F com superexpressão de FEZ1 (ensaio completo com todos os controles usados estão em anexo).

Um fato importante é que coativadores do heterodímero RAR/RXR possuem dois motivos LXXLL em sua estrutura primária que se ligam simultaneamente nas duas α -hélice12 formadas pelo heterodímero, sendo uma delas pertencente ao RAR e a outra ao RXR (Aranda e Pascual 2001). FEZ1 possui apenas um motivo LXXLL, entretanto, já foi observado (*in vivo* e *in vitro*) que a proteína pode formar dímero, através de ponte dissulfeto no N-terminal expondo os C-terminais onde estão localizados os motivos LXXLL (Assman *et al.* 2006, Lanza *et al.* 2009, Alborghetti *et al.* 2010) (figura 5). Sabendo-se que FEZ1 é intrinsecamente desordenada e, portanto, flexível, pode-se sugerir, assim, que para sua atuação como coativadora, ela esteja dimérica e, mesmo na ausência de ATRA quando a α -hélice 12 de RARA não está disponível, a flexibilidade

de FEZ1 permite sua interação com o motivo AF2 não exposto do receptor, o que explicaria a transcrição mediada por RARA na ausência do ligante (figura 18).

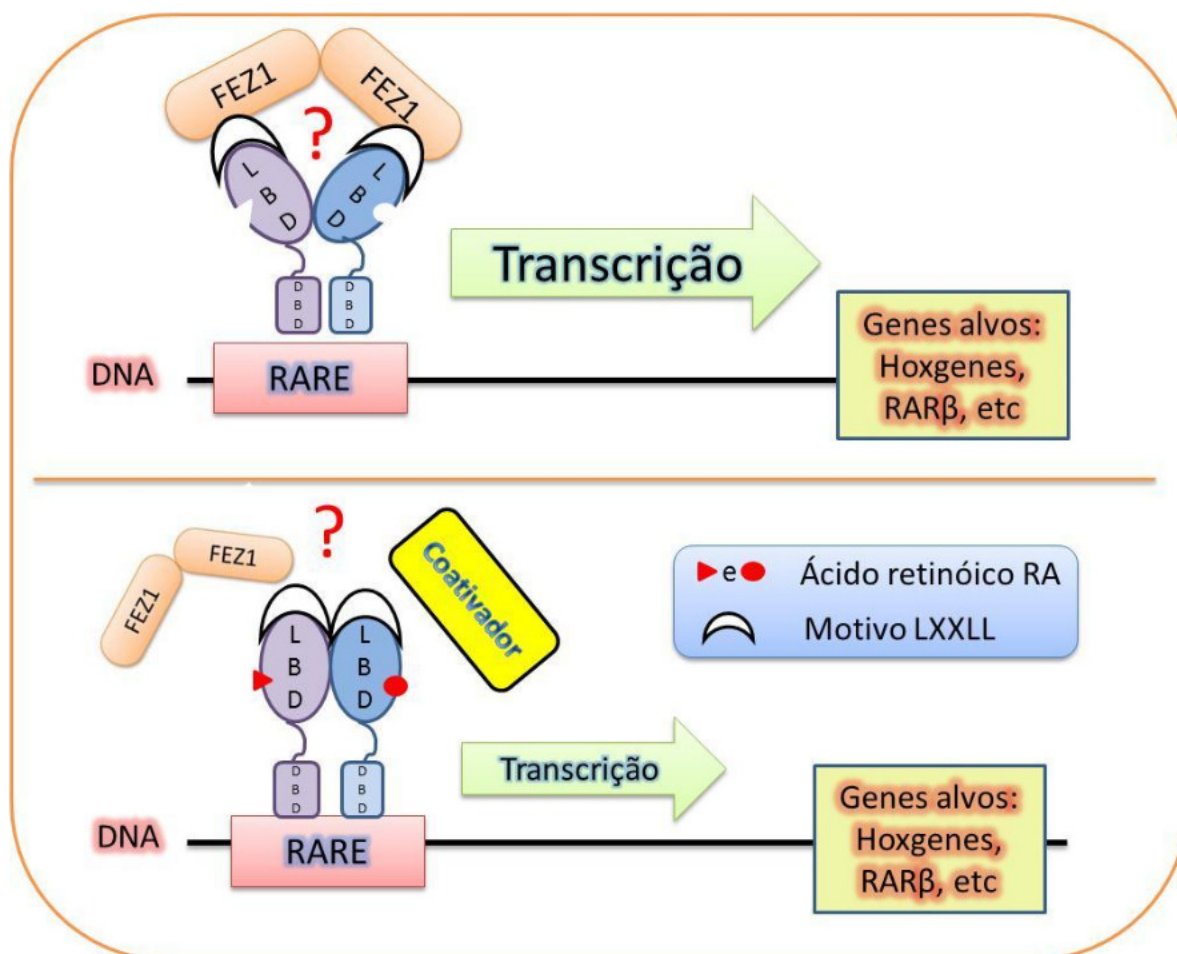


Figura 18. Esquema representativo para ilustrar o papel de FEZ1 na transcrição mediada pelo heterodímero RAR-RXR. Os receptores nucleares RXR e RAR representados em lilás e azul respectivamente, formam um complexo e estão constitutivamente ligados ao DNA através de seus domínios DBD com a sequência RARE do DNA localizada antes do promotor. Na ausência do ligante (esquema superior) os domínios LBD dos receptores estão dispostos de forma que as hélices 12 de ambos estão escondidas e o dímero de FEZ1 tem o papel de coativador. Na presença do ligante ácido retinóico, outros coativadores competem com FEZ1 pela transcrição, promovendo uma transcrição menor dos genes alvos.

Com a mudança de conformação provocada pela ligação do ATRA, a interação com FEZ1 pode diminuir e isso também justifica a queda na transativação após o tratamento com o ligante. Apesar dessa diminuição, a transativação permanece cerca de 3 vezes maior em relação aos resultados obtidos na ausência de FEZ1 (17), indicando

que FEZ1 promove uma coativação que sofre interferência de *ATRA* mas não é inibida por este. Um ensaio de fluorescência com sonda de DR5, onde primeiramente incubamos o RARA com *ATRA* e depois titulamos contra a sonda de DR5, observamos uma afinidade 2 vezes menor em relação ao ensaio onde incubamos RARA, *ATRA* e FEZ1 e depois titulamos no DR5. Isso mostra que a presença de FEZ1 provocou um aumento na afinidade entre DR5 e RARA (figura 10)

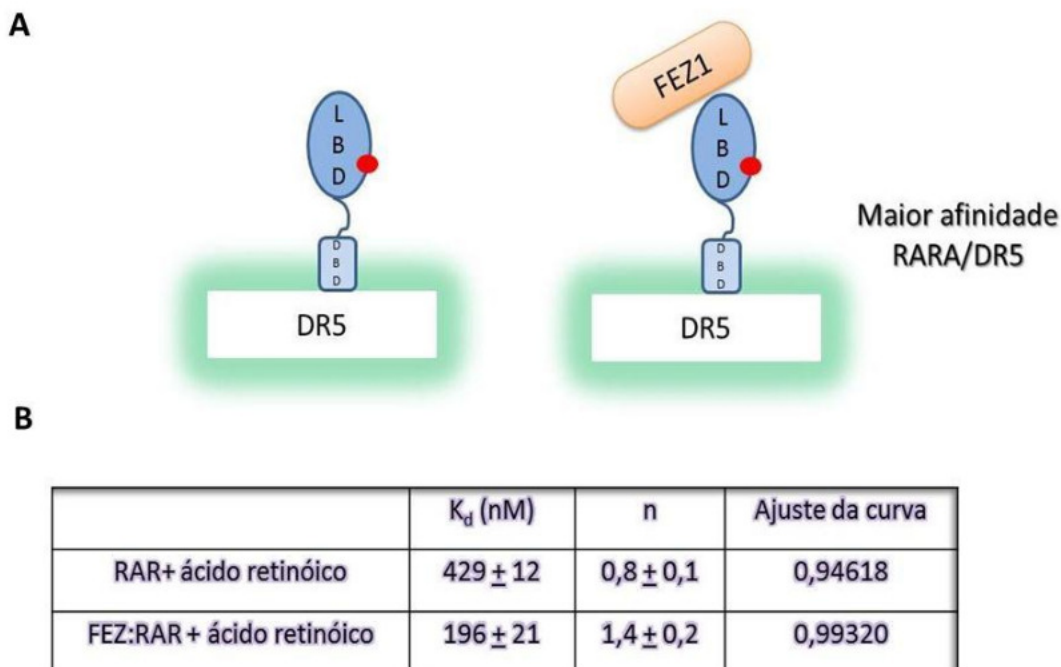


Figura 19. Ensaio de fluorescência com sonda de DNA revelou que FEZ1 provoca aumento da afinidade de RARA pelo DNA (DR5). A Esquema representativo para ilustrar aumento da afinidade de RARA e DNA (DR5) na presença de FEZ1. B Tabela com os valores de K_d na ausência e na presença de FEZ1.

Esses dados são condizentes com os resultados obtidos no ensaio de transativação, onde a presença de FEZ1 promoveu um aumento na transcrição tanto na presença como na ausência do ligante. O ensaio de cross linking entre FEZ1 e RARA (figura 14) permitirá um mapeamento dessa interação e nos trará detalhes da interface de interação, assim, saberemos se de fato, a interação ocorre entre o motivo LXXLL de FEZ1 e o motivo AF2 de RARA, permitindo-nos confirmar que FEZ1 age como um coativador de receptores nucleares.

4.3.1 Imunoprecipitação de FEZ1

Também foi feita imunoprecipitação de FLAGFEZ1 (figura 20) com o objetivo de padronização de transfecção e imunoprecipitação da proteína para proceder, posteriormente, com a coimunoprecipitação de FEZ1 e RARA na presença e na ausência de *ATRA* e identificar por espectrometria de massas o interactoma envolvido com esse complexo proteico nas duas situações citadas. Obteve-se um bom rendimento de proteína após a imunoprecipitação, o que indica que o protocolo utilizado pode ser repetido para os ensaios posteriores de coimunoprecipitação.

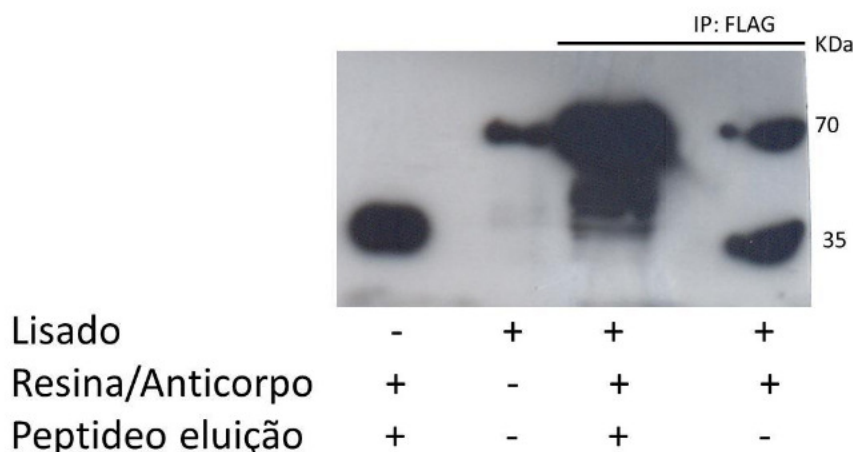


Figura 20. Imunoprecipitação de FEZ1FLAG. Western Blotting anti-Flag para detecção de FEZ1FLAG transfectado em células HEK 293T. O lisado total foi incubado com resina conjugada a FLAG, sendo que a banda de 35 Kda corresponde à cadeia leve do anticorpo e a banda na altura de 70 Kda corresponde à proteína FEZ1, presente no lisado total e na imunoprecipitação e grande quantidade. As duas bandas presentes à direita da figura correspondem à resina (após eluição) usada para imunoprecipitação, mostrando que mesmo depois da eluição ainda restou proteína FEZ1 conjugada à resina.

4.4 Padrão de expressão de FEZ1 durante o desenvolvimento inicial e neurulação em embrião de galinha

Nossos experimentos de hibridização *in situ* (ISH) foram realizados com embriões de galinha de HH7 a HH14, estágios classificados por Hamburger and Hamilton (1951). Os estágios de HH5-8 ocorre neurulação iniciada pela formação do tubo neural e de HH6-14 ocorre somitogênese, sendo que em todas essas etapas é possível notar a expressão de FEZ1 (figura 21). Assim, vimos que o gene FEZ1 é

expresso estritamente em tecidos neurais desde o início da neurulação até o último estágio de desenvolvimento analisado, quando o processo de neurulação está no fim (formação dos somitos). Em HH7, FEZ1 é expressa nas pregas neurais, estruturas que marcam o início da neurulação e que ao fundir-se dorsalmente formam o tubo neural. Deste estágio de desenvolvimento até o último estágio analisado (HH14), FEZ1 é expressa em todo o tubo neural ao longo de sua formação, que ocorre antero-posteriormente, e em órgãos que se formam a partir do tecido neural, como vesículas óptica e auditiva (Figura 21 E).

Os resultados de hibridação *in situ* apresentados são inéditos, pois não há dados publicados sobre o padrão de expressão de FEZ1 ao longo do desenvolvimento de aves. O padrão de expressão deste gene em aves é condizente com o encontrado em rato e embriões de camundongo. Kuroda S. *et al* 1999 identificou o padrão de expressão de mRNA de FEZ1 em tecido de rato adulto por Northern blot, onde destacou a predominância e abundância de FEZ1 no tecido cerebral de rato adulto. Além disso Fujita T. e colaboradores (2003), acompanharam o padrão de expressão de cDNA de FEZ1 em camundongos, onde verificou-se expressão de mRNA de FEZ1 exclusivamente durante neurogênese. A expressão de FEZ1 no cérebro de rato adulto foi confirmada por Honda A. *et al.* (2004), em um trabalho onde comparou-se o padrão de expressão do mRNA de FEZ1 (339–686) com o mRNA de DISC1 (450–1174), uma proteína relacionada com esquizofrenia, em cérebros de rato adulto e também em cérebros de embriões de camundongo nos dias embrionários (E) E16, E18 e E20. Neste trabalho viu-se que ambas proteínas estavam presentes nas mesmas regiões cerebrais, sendo que nos estágios E16 e E18, observou-se a presença dos mRNA's difusos no hipocampo enquanto no estágio E20 a expressão foi observada nas células piramidais e células granulares do giro dentado. Esse experimento foi feito em colaboração com a assistente de pesquisa Doutora Hozana Andrade Castilho e o pesquisador Doutor José Xavier Neto do laboratório de modificação do genoma (LNBio)

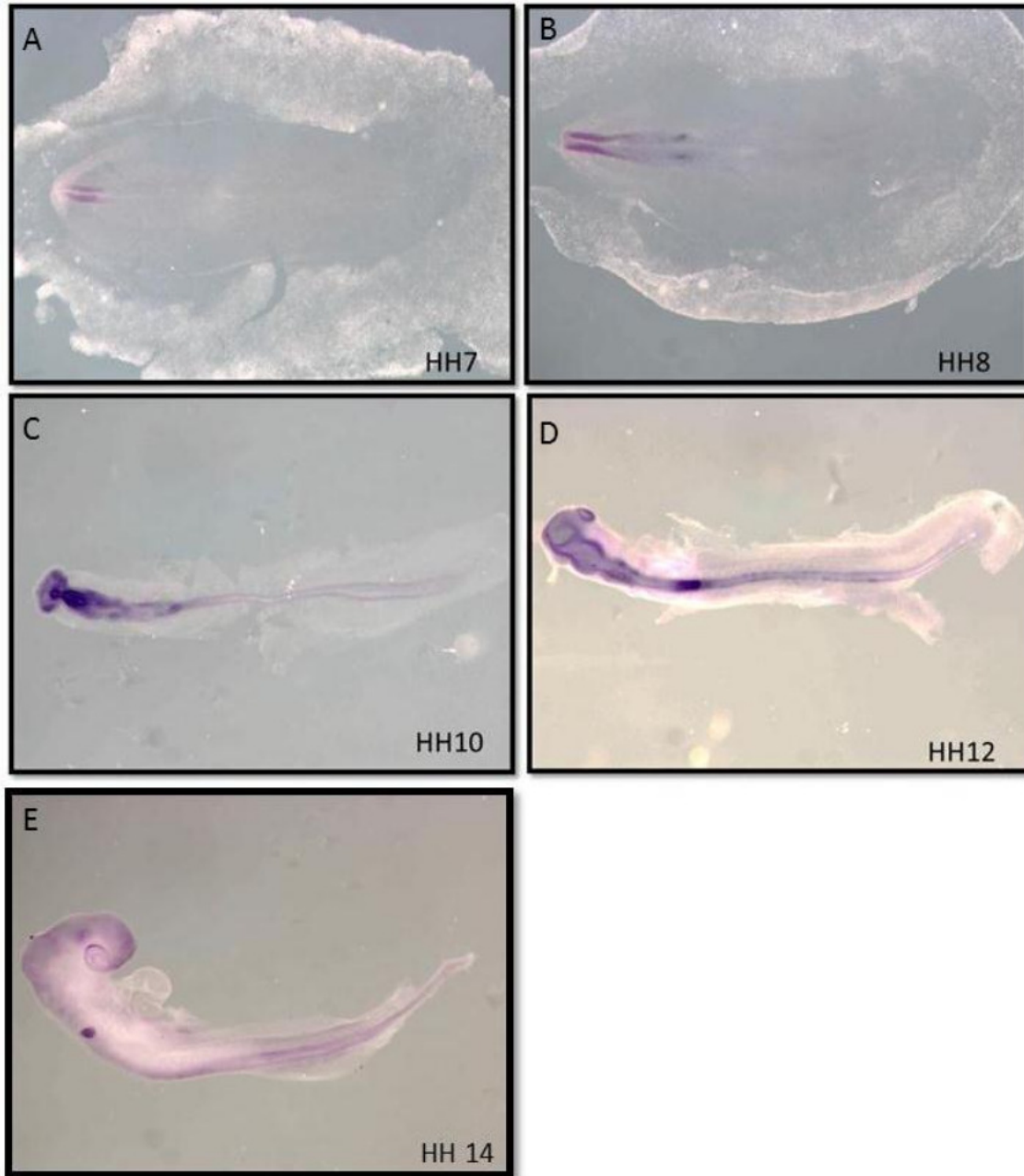


Figura 21. Hibridização *in situ* de FEZ1 em embrião de galinhas no estágio de neurulação e somitogênese HH7 a HH14. A-E estágios embrionários mostrando a expressão de FEZ1 ao longo do desenvolvimento neural.

A síntese endógena dos retinóides é dependente de um conjunto de enzimas, a principal enzima responsável pela formação do ácido retinóico é a Desidrogenase Retinal tipo 2 (RALDH2). Essa enzima pode atuar como um marcador da presença do ácido retinóico durante embriogênese. Foi detectada a presença de RALDH2 e ácido retinóico desde o estágio de formação da linha primitiva até o desenvolvimento da placa

neural em embrião de camundongo (Ulven *et al.* 2000), isso sugere uma possível colocalização temporal entre RALDH2/ácido retinóico e FEZ1.

Embriões no estágio de desenvolvimento HH12 apresentam 16 somitos, região que dará origem às estruturas segmentadas (vértebras, costelas, intervértebras), sendo que no primeiro somito há expressão de RALDH2 (Swindell *et al.* 1999). Vimos que o padrão de expressão de FEZ1 na medula espinhal é concentrado nas regiões entre os somitos (figura 22)

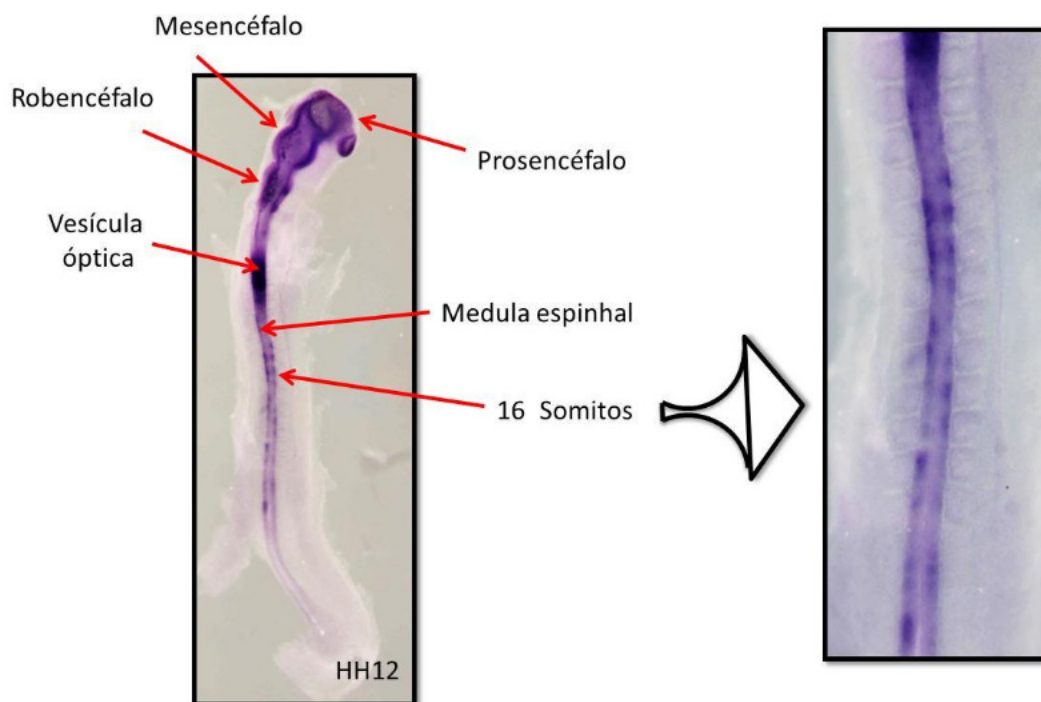


Figura 22. FEZ1 é expressa exclusivamente no Sistema Nervoso Central. Embrião de galinha no estágio HH12 apresenta expressão de FEZ1 em todo o Sistema nervoso Central desde a flexura cranial (prosencéfalo, mesencéfalo e robencéfalo) e segue por toda a medula espinhal. Nesse estágio de desenvolvimento, o embrião apresenta 16 somitos que estão dispostos próximos à medula espinhal (figura à esquerda) onde não há expressão de FEZ1, mas é possível observar, que há uma expressão maior de FEZ1 na região de medula espinhal entre os somitos.

Assim podemos sugerir que nesse estágio de desenvolvimento ocorre produção de ácido retinóico no somito que se difunde até a medula espinhal onde há expressão de FEZ1 e que, portanto, FEZ1 e RARA podem ter um papel importante nesse período de desenvolvimento nervoso.

4.5 Ensaios de interação de FEZ1 e SCOC

4.5.1 Duplo híbrido de SCOC identificou FEZ1 e FEZ2 como parceiros de interação

Identificaram-se no screening de SCOC 37 diferentes proteínas parceiras de interação a partir de bibliotecas de cDNA de medula óssea e cérebro fetal humano. Sendo elas proteínas envolvidas na transdução de sinal: ACAP3, STMN2 estathimina like 2, proteína de ligação ao nucleotídeo guanina GNG3; proteínas envolvidas na tradução: neuroguidina, proteína do ribossomo mitocondrial L21, proteína ribossomal S4; proteína de ligação a histona: cathepsina e um importante grupo de proteínas relacionadas à orientação de axônio e formação de vesícula sináptica: FEZ1, FEZ2, spectrina, sinaptogamina e ULK3, homóloga de UNC51 de *C.elegans* (figura 21).

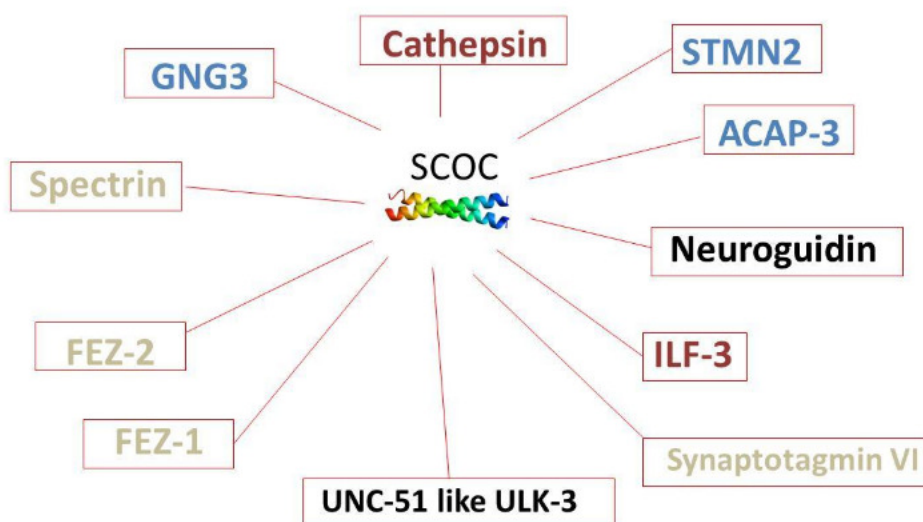


Figura 23. Principais proteínas parceiras de interação de SCOC. Duplo híbrido de SCOC identificou proteínas relacionadas com orientação de axônios e formação de vesículas sinápticas.

Algumas proteínas mereceram destaque por terem função conhecida e desempenharem papel importante nos processos celulares, como é o caso da estathimina 2 (STMN2) que, assim como FEZ1, esta envolvida com os microtúbulos no processo de desenvolvimento neuronal. Quando fosforilada por MAPK8, STMN2 estabiliza os microtúbulos e, conseqüentemente, controla o crescimento dos neuritos dos neurônios corticais. No desenvolvimento cerebral, regula negativamente a taxa de finalização do estágio multipolar e retarda a migração radial da zona ventricular (Anderson e Axel 1985). Outra parceira de SCOC envolvida com citoesqueleto é a espectrina (Spectrin), a proteína mais abundante do citoesqueleto dos eritrócitos. Está associado com banda 4.1 e actina para formar a superestrutura do citoesqueleto do eritrócito. Também identificaram-se duas proteínas G; GNG3 e ACAP3 envolvidas como

moduladores ou transdutores em vários sistema de sinalização transmembrana. Além disso, outras duas proteínas foram classificadas no processo de degradação de proteínas e autofagia, sendo que já foi descrito essa função para a proteína SCOC (McKnight *et al.* 2012), sendo elas; ULK3 (Proteína Serine/threonine Quinase) um regulador da sinalização do Sonic hedgehog (SHH) e autofagia, promove autofagia após senescência celular (Young *et al.* 2009) e cathepsina L (Cathepsin) importante para todas as degradações de proteína que ocorrem nos lisossomos (Kaasik *et al.* 2005).

Outra proteína identificada foi a synaptotagmina VI que, assim como SCOC, está envolvida na exocitose de vesículas secretórias (Castillo *et al.* 2010) Já foi descrito que a sinaptotagmina 1 (syt1) interagi com FEZ1 e promove o transporte de vesícula sináptica pelo axônio. Syt1 pode atuar como um sensor de Ca^{2+} no processo de tráfego de vesícula e exocitose (Toda *et al.* 2008). Já a proteína neuroguidina (Ngd), também destacada na figura 20 por interagir com SCOC, é amplamente expressa no sistema nervoso de mamíferos e detectada pontualmente em axônios, dentritos e cones de crescimento também é encontrada no sistema nervoso embrionário e na crista neural. *Knockdown* de Ngd provoca falha no fechamento do tubo neural e inibe a migração de células da crista neural, esses dados indicam que Ngd atua como uma importante proteína regulatória traducional durante o desenvolvimento do sistema nervoso de vertebrados (Jung *et al.* 2006).

As interações com as proteínas da família FEZ são congruentes com as informações da literatura, onde Su C. W. e colaboradores (2006) destacaram o papel neural da homóloga de SCOC (UNC69). Nesse trabalho, mutantes de *unc69* apresentam deficiência no crescimento, fasciculação e orientação dos axônios e, estudos funcionais revelaram que UNC-76 (homóloga de FEZ1) e UNC-69 colocalizam, agem na mesma via para controle e extensão dos axônios e regulam a organização pré-sináptica cooperativamente. Foram identificados 5 clones de FEZ1 no duplo híbrido de SCOC, todos provenientes da biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano, o que condiz com os dados literários uma vez que FEZ1 é expressa predominante e abundantemente no cérebro (Kuroda *et al.* 1999). Fujita T. e colaboradores (2004) identificaram, por análise computacional, 4 regiões de FEZ1 com potencial para formar hélices anfipáticas que constituem os coiled coils, mas somente uma dessas regiões preditas de FEZ1 (231-265) foi crucial para as interações com outras proteínas, uma vez que construções de FEZ1 sem essa região inibiu sua interação com a maioria das proteínas testadas

(Assmann *et al.* 2006). Os clones de FEZ1 identificados no duplo híbrido de SCOC apresentaram regiões variadas de interação, entretanto, o sequenciamento foi feito utilizando-se somente o oligonucleotídeo iniciador do vetor onde os cDNAs da biblioteca estava clonado. Com mostra na tabela 8, destacado em verde, 4 dos 6 clones apresentaram em sua região as duas Leucinas nas posições 254 e 260, vistas como essenciais para a interação de FEZ1 e SCOC (McKnight *et al.* 2012) (tabela 8)

Tabela 8. Lista de clones de FEZ1 identificados no duplo híbrido de SCOC

<i>Clone FEZ1</i>	<i>Aminoácidos</i>
1	24-256
2	123-392
3	23-312
4	199-392
5	1-237
6	199-309

Além disso, também foram identificados 3 clones de FEZ2, dois provenientes da biblioteca de medula óssea e um de biblioteca de cérebro fetal humano, por tratar-se de uma proteína ubiquamente expressa esses dados também são condizentes com o esperado (Fujita *et al.* 2004).

4.5.2 FEZ1 e SCOC colocalizam em células de mamíferos

As proteínas ortólogas de FEZ1 e SCOC, UNC-76 e UNC-69 respectivamente, cooperam para regular o tamanho e posição das vesículas sinápticas e colocalizam pontualmente nos axônios e corpos celulares (Su *et al.* 2006). Aqui, vimos que FEZ1 e SCOC colocalizam no citoplasma e também é possível identificar um marcação mais intensa de ambas proteínas próxima ao núcleo, essa região provavelmente é o complexo de Golgi pois já foi descrito na literatura que SCOC localiza nessa organela (Valkenburgh *et al.* 2001)(figura 22).

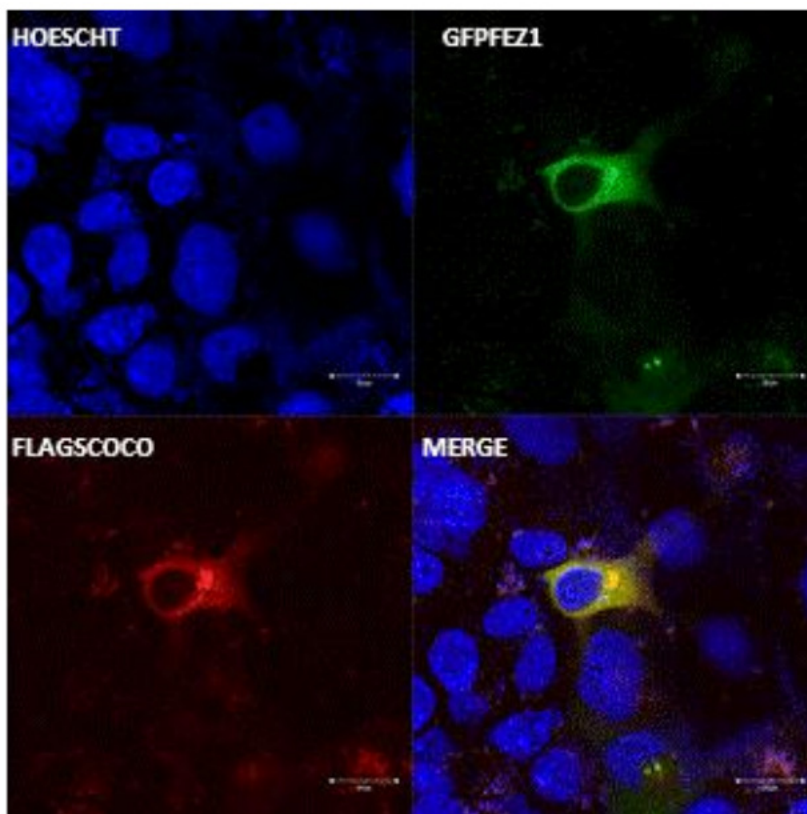


Figura 24. Imunocitoquímica em HEK 293 mostrando colocalização de GFP FEZ1 (verde) e FLAGSCOC, a região vermelha mais intensa corresponde, possivelmente, ao complexo de golgi.

4.5.3 Mapeamento da interação de FEZ1 e SCOC

Através de ensaio de co-purificação e SAXS de FEZ1 e SCOC durante período de iniciação científica em colaboração com o Dr. Marcos Rodrigo Alborghetti vimos a natureza heterotetramérica da proteína FEZ1 complexada com a proteína SCOC (figura 4). Para refinar o modelo, análises por RMN (Ressonância Magnética Nuclear) indicaram que a homodimerização de FEZ1, pelo N-terminal, ocorreu de forma antiparalela. Em conjunto, estes dados demonstram que proteínas da família FEZ poderiam atuar como adaptadoras bivalentes no processo de transporte, interagindo com 2 cargas simultaneamente (figura 6). Com esses dados, está em elaboração um manuscrito, intitulado *Structural studies by SAXS and NMR of the FEZ1 dimer and the tetramer FEZ1 / SCOC* (anexo).

Vimos aqui que a interação entre FEZ1 e SCOC é detectável em gel nativo. Após a incubação de 6xHisFEZ1 e 6xHisSCOC recombinantes e purificadas, pudemos constatar que as proteínas juntas possuem um padrão diferente de migração em relação

ao observado nos poços onde as proteínas foram aplicadas separadamente, isso sugere que ambas proteínas interagem (figura 23).

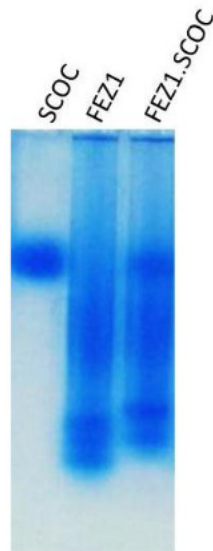


Figura 25. FEZ1 e SCOC interagem in vitro e a interação é detectável em gel nativo. O complexo FEZ1.SCOC foi expresso e purificado separadamente e, posteriormente, incubados durante 1h , 4°C antes de correr no gel nativo 1,5% agarose (Tampão Native PAGE invitrogen).

Para identificar os resíduos de aminoácidos envolvidas na interação entre as proteínas e, confirmar os resultados obtidos no SAXS, fizemos um ensaio de *cross linking*, onde as proteínas foram tratadas com DSS, reagente responsável pela formação de ligação covalente entre aminas primárias de lisinas (figura 24).

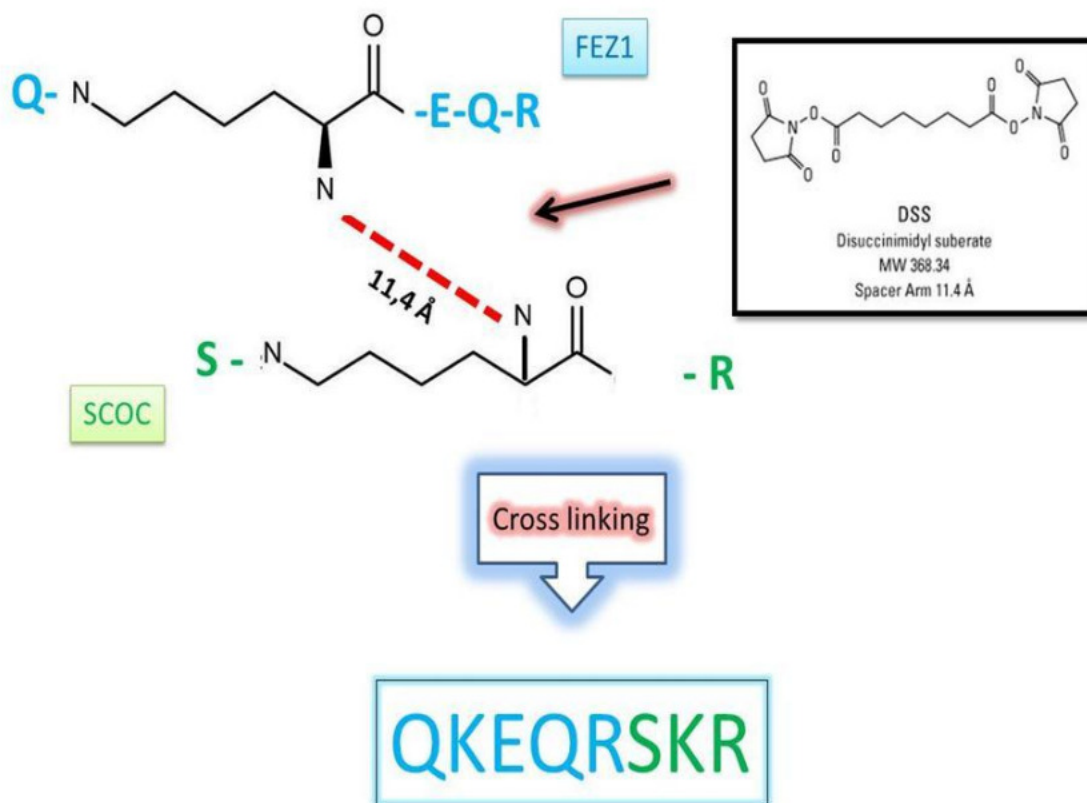


Figura 26. Esquema para ilustrar a formação de ligação covalente entre aminas primárias de lisinas induzida por DSS. Como mostra o esquema, as lisinas devem estar posicionadas em uma distância máxima de 11,4 Å e em ambiente hidrofóbico para que a ligação covalente seja induzida. Os resíduos próximos a essas lisinas podem ser identificados por espectrometria de massas, como no exemplo, onde os resíduos destacados em azul pertencem à proteína FEZ1 e os resíduos destacados em verde pertencem à proteína SCOC.

Após *cross linking*, fizemos gel de SDS PAGE onde verificou-se a formação de uma banda diferenciada somente no poço que estava presente o complexo FEZ1 SCOC, uma vez que as proteínas FEZ1 e SCOC separadamente, também foram submetidas à ligação covalente e aplicadas no gel para controle. A banda mais alta (>170Kda, número 1) da figura 25, assim como as duas seguintes 2 e 3 (~130 e 70 respectivamente) foram cortadas do gel, digerida e submetidas à análise por espectrometria de massas.

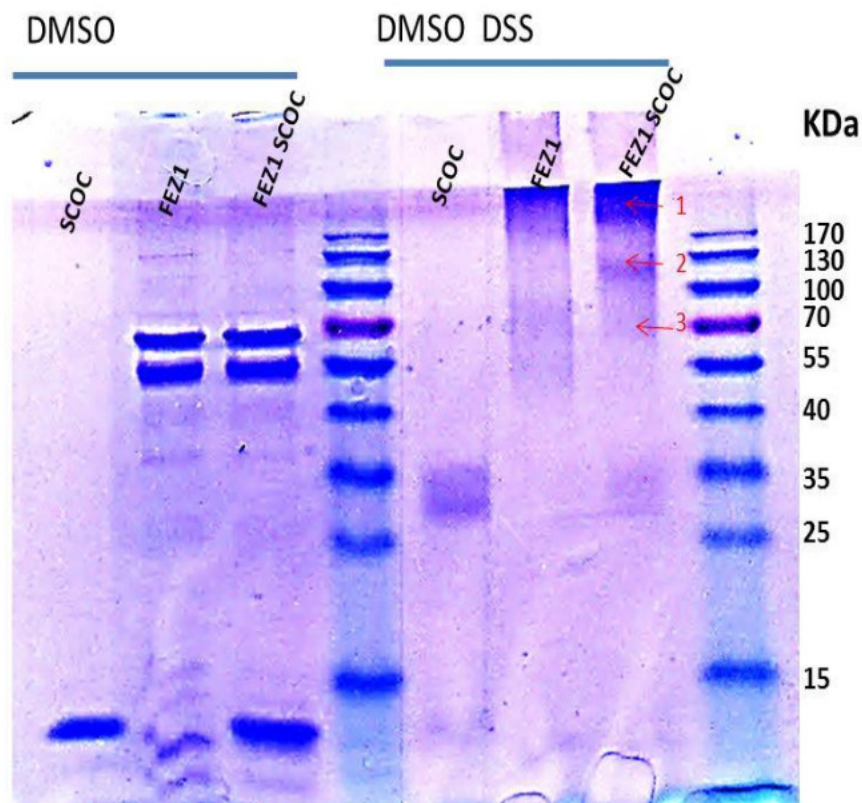


Figura 27. Mapeamento da interface de interação entre FEZ1 e SCOC por cross linking. Para identificação de ligações covalentes com DSS (Suberic acid bis (N-hydroxysuccinimide ester) diluído em solvente orgânico DMSO, 7 mM de cada proteína foi incubado durante 2 horas/Temp ambiente com DSS 1,8mM . Corrida durante 5h e 30min, 40V. Para controle as proteínas foram também incubadas somente com DMSO (esquerda do gel). As setas vermelhas destacam as bandas cortadas para identificação por espectrometria de massas, por serem bandas diferenciadas que apareceram somente no complexo FEZ1 SCOC com DSS.

As bandas destacadas da figura 27 foram digeridas com tripsina e lidas em espectômetro de massas (NanoAcquity Ultra Performance LC coupled with nanoelectrospray source on Q-TOF Ultima mass spectrometer, Waters). Os dados da literatura apontam que a maioria das interações de FEZ1 acontecem pela sua região de *Coiled Coil* 231-266 (figura 9) (Assmann *et al.* 2006) e, recentemente, verificou-se que dois resíduos Leucina nas posições 254 e 260 são necessários para sua interação com SCOC (McKnight *et al.* 2012). Os dados de cross linking revelaram um peptídeo de FEZ1 muito próximo a essa região (280-285) interagindo com o extremo C-terminal de SCOC (118-121) como mostra a figura 26.

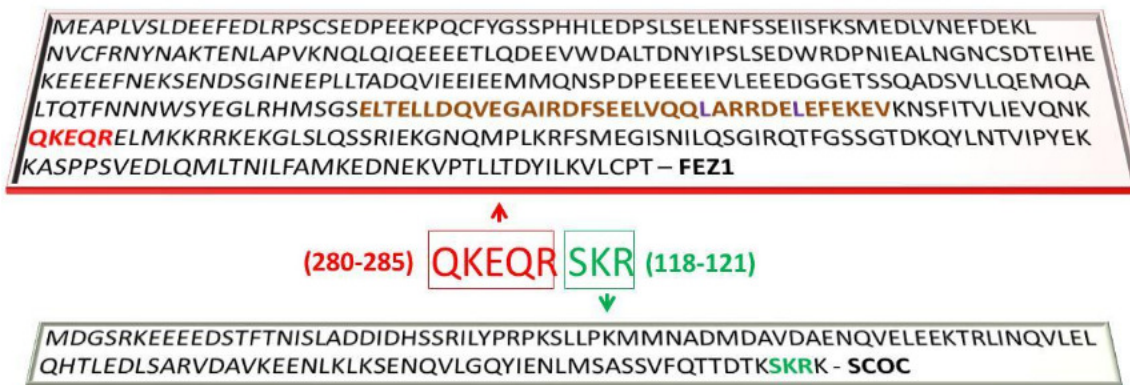


Figura 28. Cross linking identificado entre as proteínas FEZ1 e SCOC. O retângulo superior apresenta a sequência primária de FEZ1, sendo destacado em marrom a região de *Coiled Coil* (231-266), em lilás as Leucina 254 e Leucina 260 e em vermelho o peptídeo identificado no cross linking (280-285). O retângulo inferior apresenta a estrutura primária de SCOC, sendo destacado em verde o peptídeo identificado no cross linking (118-121).

4.6 Cristalização de SCOC

As proteínas da família FEZ, de uma forma geral, podem ser classificadas como intrinsecamente desestruturadas. Além de dados obtidos através de softwares de predição de organização estrutural, experimentos de SAXS com a proteína FEZ1 e dicroísmo circular, evidenciaram seu caráter intrinsecamente desestruturado (Lanza *et al.* 2009). Como a estrutura de FEZ1 não pode ser obtida por cristalografia, optou-se em explorar este aspecto em parceiros de interação para posteriores estudos estruturais destes, isoladamente e em complexo com FEZ1. Na tentativa de entender melhor a estrutura de SCOC e também conectar essas informações no contexto da interação com FEZ1, realizou-se expressão e purificação de 6xHisSCOC (42-122), obtivemos alto rendimento de proteína pura (figura 27) e submetemos para ensaio de padrões de cristalização.

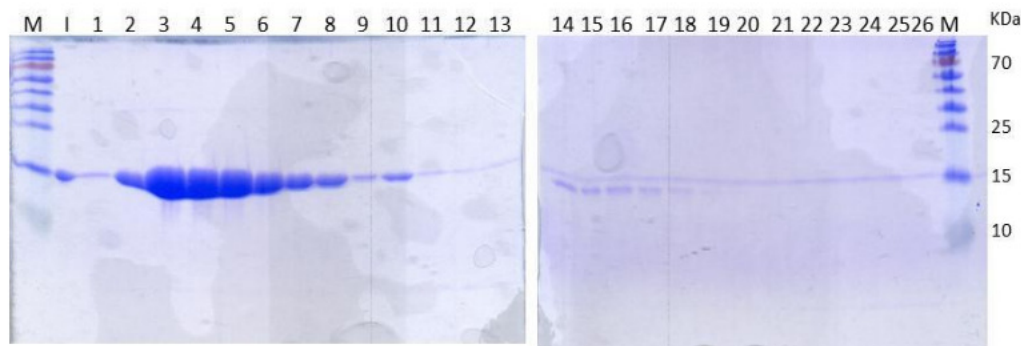


Figura 29. Rendimento de 6xHisSCOC após purificação (cromatografia de exclusão molecular). 6xHisSCOC pós-afinidade com coluna Superdex 16/60 200 (GE Healthcare). A.1 Frações de 5 a 14 pós-afinidade dialisadas e concentradas; 1-26 Frações de eluição. M Page Ruler protein

As amostras da figura 29 foram concentradas e duas concentrações diferentes, sendo que as frações de 2 a 6 foram concentradas para 7,0 mg/ml e as frações 7 e 8 foram concentradas para 1,8mg/ml. Após concentração, correu-se gel SDS-PAGE para saber se a proteína sofreu degradação (figura 30) e ainda fizemos ensaio de DLS para nos certificar de que a proteína estava pura e monodispersa (dados não apresentados). Essas amostras foram enviadas para ROBOlab.

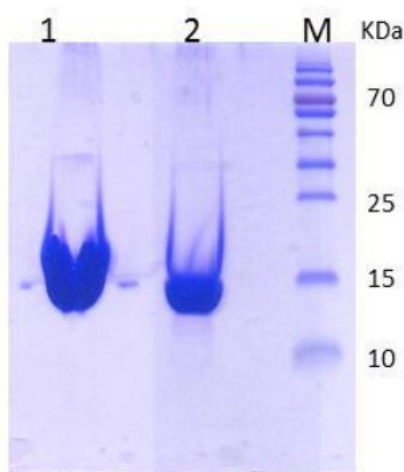


Figura 30. Amostras de 6xHisSCOC enviadas para ensaio de padrões de cristalização. 1 As frações de 2 a 6 da Gel filtração foram concentradas [7,0 mg/ml]. 2 As frações 7 e 8 foram concentradas [1,8mg/ml]

Obtivemos cristais em algumas condições testadas, sendo que o maior deles foi com a amostra de 1,8mg/ml, após 24 horas a 4°C (figura 31), porém na imagem de UV não é possível notar absorvância, uma vez que a proteína SCOC não possui os aminoácidos tirosina e triptofano responsáveis pela absorvância no comprimento de 280nm.

Image: Extended Focus
Capture: Imager Defaults
— 84.8 μm
18.12.12



Image Defaults



Uv Low exposure fast

Figura 31. Após 24 horas ocorre formação de cristal de SCOC. Imagem tirada após 56 dias de exposição da proteína em placa de 96 poços com o Kit JCSG+Suite. Sendo que o poço G3 foi exposto às seguintes condições: Sulfato de Zinco 0,01 M; Tampão MES 0,1 M; 25%v/v Polietileno glicol monometil éter 550, pH 6,5 4°C 56 dias.

5. Conclusões

FEZ1 está envolvida na regulação da transcrição gênica mediada por RARA agindo como coativador;

O trabalho apresenta resultados pioneiros com evidências de que FEZ1 tem um papel na regulação transcricional juntamente com RARA. Considerando que a proteína FEZ1 tem outros 9 parceiros reguladores de transcrição (DRAP1, GTFIRD2, MCM7, MED7, MLF1IP, SAP30, SAP30L, SFRS8, SLTM), esses dados podem também corroborar para o entendimento do modo de atuação de FEZ1 nas outras vias regulatórias. Vimos aqui que RARA pode atuar na ativação da transcrição quando há superexpressão de FEZ1 mesmo na ausência do ligante *ATRA*, sendo que até o momento achava-se que RARA regulava positivamente a transcrição somente na presença de *ATRA*. Uma suposta explicação para esse resultado é que em condição de superexpressão de RARA e FEZ1 em células de mamíferos, o RARA interage com FEZ1 e essa, por sua vez, age como coativador e/ou recruta coativadores para promover a transcrição. Por outro lado, na presença do ligante *ATRA*, RARA sofre modificação conformacional e a interação com FEZ1 diminui o que é refletido em uma menor transcrição em relação ao caso anterior e também foi visto por fluorescência que a interação de RARA com DNA é maior na presença de FEZ1. Além disso, foram realizados outros experimentos para comprovar a interação de FEZ1 com RARA *in vitro* (fluorescência por anisotropia, gel nativo, colocalização em célula) e conseqüentemente, validar nossas hipóteses. Nesse ensaio constatamos que a presença de FEZ1 pode dissociar um possível oligômero de RARA, fato que também observamos em gel nativo, onde o padrão de migração de RARA foi similar ao padrão de migração de proteínas que formam oligômeros.

O perfil de expressão de FEZ1 durante desenvolvimento inicial da neurulação em embrião de galinha é similar ao padrão de expressão da enzima envolvida na formação de ácido retinóico RALDH2 (retinaldehyde dehydrogenase);

Os resultados de hibridação *in situ* de FEZ1 ao longo do desenvolvimento de aves apresentados aqui são inéditos e condizente com o encontrado em rato e embriões de camundongo. Esses dados podem oferecer pistas de como FEZ1 atua durante a formação e desenvolvimento embrionário e se sua expressão esta relacionada com o

padrão de distribuição de ácido retinóico também nesse período de desenvolvimento. Isso é possível através da comparação do padrão de expressão de uma das principais enzimas responsáveis pelo processo de formação do ácido retinóico RALDH2, a qual já está estabelecido o padrão de expressão em embrião de galinha. RALDH2 foi primeiramente detectada no estágio HH4 na mesoderme posterior do nódulo de Hensen (Swindell *et al.* 1999), a região destinada a formar os somitos intermediários próximo à medula espinhal, onde também é possível identificar expressão de FEZ1 em estágio mais avançado, HH12 (figura 21D), enquanto no estágio HH7 há expressão abundante de RALDH2 mesodermal no primeiro somito. Pode-se supor que o ácido retinóico formado por intermédio de RALDH2 difunde-se para sistema nervoso central, agindo juntamente com FEZ1 para desenvolvimento embrionário. Sendo assim, uma análise minuciosa da expressão cotemporal de RALDH2 e FEZ1 permitirá entender se existe correlação do ácido retinóico e de FEZ1 durante o desenvolvimento neural embrionário.

A proteína humana SCOC está envolvida no desenvolvimento neuronal e transporte de vesículas;

O screening do duplo híbrido de SCOC foi importante para entender a função da proteína nos processos celulares, bem como seu papel no sistema nervoso, uma vez que foram encontradas proteínas envolvidas em formação de vesícula sináptica e extensão e fasciculação de axônios sendo elas: FEZ1; FEZ2; ULK3 (UNC51 like Quinase 3); Sinaptotagmina; sthatimin; neuroguidin. Sendo que FEZ1, ULK3 e sinaptotagmina podem estar envolvidas no processo de formação e transporte de vesículas sinápticas em humanos, assim como ocorre com suas respectivas homólogas em drosófila. Desse modo, podemos inferir que, assim como UNC-69 (homóloga de SCOC), SCOC também está envolvida com FEZ1 no desenvolvimento neural. Como perspectiva de fechamento dessa vertente do trabalho, pretende-se fazer hibridação *in situ* de SCOC ao longo do desenvolvimento embrionário de aves para identificar se ambas proteínas são expressas no mesmo período embrionário.

Até o momento confirmamos que as proteínas FEZ1 e SCOC interagem por diversos métodos diferentes; duplo híbrido, gel nativo, imunocitoquímica e colocalização. E, por cross linking foram identificados os peptídeos que intermedeiam a interação desse complexo, com esse ensaio está em elaboração um modelo que mapeia a interface de interação dessas proteínas.

FEZ1 pode ter função nuclear durante desenvolvimento neuronal;

Todas essas informações sugerem que FEZ1 pode ter envolvimento na regulação gênica durante o desenvolvimento do sistema nervoso, uma vez que as 3 proteínas estudadas estão envolvidas nesse processo e formam complexos com FEZ1 *in vivo* e *in vitro*.

6. Perspectivas

- Análise do cross linking entre RARA e FEZ1 e mapeamento da interface de interação;
- Estudo do cristal de SCOC para modelagem estrutural;
- Estudos de titulação para determinar a afinidade de RARA DBD (domínio de ligação ao DNA) com o elemento responsivo DR5 na presença e na ausência de FEZ1, para confirmar resultados obtidos no ensaio de transativação de luciferase com RARA e FEZ1;
- Co-imunoprecipitação de FEZ1 e RARA na presença e na ausência do ligante *ATRA* e análise do interactoma por espectrometria de massas. Ensaio de transfecção e imunoprecipitação já foram padronizados para a realização desse experimento (figura 11);
- Microarray de células que superexpressam FEZ1 e RARA para identificar os genes alvos regulados nessa condição.
- Ensaio de fluorescência competitivo (RAR marcado com sonda e titulação de FEZ1 e RXR para saber se ambos competem por RAR
- Ensaio de fluorescência com domínios/mutantes de RAR (LBD,DBD e DBD sem hélice 12) e FEZ1 e domínios de FEZ1.
- Ensaio de co-localização de FEZ1 e RAR (proteínas inteiras e domínios) em células HEK (com e sem ligante *ATRA*).

7. Referências bibliográficas

Alborghetti M.R., Furlan A.S., Silva J.C., Paes Leme A.F., Torriani I.C., and Kobarg J. (2010) Human FEZ1 protein forms a disulfide bond mediated dimer: implications for cargo transport. *J. Proteome Res.*, 9, 4595-4603

Alborghetti MR, Furlan AS, Kobarg J (2011) FEZ2 has acquired additional protein interaction partners relative to FEZ1: functional and evolutionary implications. *PLoS One*;6:e17426

Ali-khan S, Hales B (2006) Retinoid receptor antagonists alter the pattern of apoptosis in organogenesis stage mouse limbs. *Toxicol Sci.*;90:208-20

Anderson DJ, Axel R (1985) . Molecular probes for the development and plasticity of neural crest derivatives. *Cell* 1985 ; 42 : 649- 62

Assmann EM, Alborghetti MR, Camargo MER, Kobarg J. (2006) FEZ1 Dimerization and Interaction with Transcription Regulatory Proteins Involves Its Coiled-coil Region. *J. Biol Chem.* 281, 9869-9881

Bartel e Fileds (1995). Analysing proteion-protein interaction using two-hybrid system. *Methods in Enzymology* 254:241-263

Bloom L, Horvitz HR (1997) The *Caenorhabditis elegans* gene *unc-76* and its human homologs define a new gene family involved in axonal outgrowth and fasciculation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 3414-3419

Brenner S (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77: 7 1-94

Castillo Bennett J, Roggero CM, Mancifesta FE, Mayorga LS (2010) .Calcineurin-mediated dephosphorylation of synaptotagmin VI is necessary for acrosomal exocytosis. *J Biol Chem.* 285(34):26269-78

Chambon, P (1994). The retinoid signaling pathway: molecular and genetic analyses. *Semin. Cell Biol.* 5, 115-125

Chambon P (1996) A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J* 10:940 –954

Chan EY, Longatti A, McKnight NC, Tooze SA (2009) Kinase inactivated ULK proteins inhibit autophagy via their conserved C-terminal domain using an Atg13-independent mechanism. *Mol Cell Biol* 29: 157–171

Chua JJ, Butkevich E, Worsack JM, Kittelmann M, Gränborg M, Behrmann E, et al.(2012) Phosphorylation-regulated axonal dependent transport of syntaxin 1 is mediated by a Kinesin-1 adapter. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 109: 5862

Clagett-Dame M, McNeill EM, Muley PD (2006) Role of all-trans retinoic acid in neurite outgrowth and axonal elongation. *J Neurobiol* 66: 739–756

Cockcroft S, Thomas GM, Fensome A, Geny B, Cunningham E, Gout I, Hiles I, Totty NF, Truong O, and Hsuan J J (1994) Phospholipase D: A Downstream Effector of ARF in Granulocytes. *Science* 263, 523–526

Corcoran J, So PL, Maden M (2002) Absence of retinoids can induce motoneuron disease in the adult rat and a retinoid defect is present in motoneuron disease patients. *J Cell Sci* 115:4735– 4741

Corral RDD, Storey KG (2004) Opposing FGF and retinoid pathways: a signaling switch that controls differentiation and patterning onset in the extending vertebrate body axis. BioEssays, 26:857-869

Darimont BD, Wagner RL, Apriletti JW, Stallcup MR, Kushner PJ, Baxter JD, Fletterick RJ & Yamamoto KR (1998). Structure and specificity of nuclear receptor–coactivator interactions. Genes and Development 12 3343–3356

Ding XF, Anderson CM, Ma H, Hong H, Uht RM, Kushner PJ e Stallcup MR (1998). Nuclear receptor-binding sites of coactivators glucocorticoid receptor interacting protein 1 (GRIP1) and steroid receptor coactivator 1 (SRC- 1): multiple motifs with different binding specificities. Mol Endocrinol 12: 302–313

Dolle, P, Ruberte, E, Leroy, P, Morriss-Kay, GM, Chambon, P (1990). Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. I. A systematic study of their differential pattern of transcription during mouse organogenesis. Development 110, 1133±1151

Ferreira A, Niclas J, Vale RD, Banker G, Kosik KS (1992). Suppression of kinesin expression in cultured hippocampal neurons using antisense oligonucleotides. J Cell Biol 117, 595–606

Figueira AC, Lima LM, Lima LH, Ranzani AT, Mule Gdos S, et al. (2010). Recognition by the thyroid hormone receptor of canonical DNA response elements. Biochemistry 49: 893–904.

Forehand CJ, Ezerman EB, Goldblatt JP, Skidmore DL, Glover JC (1998) Segment-specific pattern of sympathetic preganglionic projections in the chicken embryo spinal cord is altered by retinoids. Proc Natl Acad Sci USA 95:10878 10883

Forman, B M e Samuels, HH (1990). Minireview: interactions among a subfamily of nuclear hormone receptors: the regulatory zipper hypothesis. Mol. Encocrinol. 4:1293-1302

Fujita T, Ikuta J, Hamada J, Okajima T, Tatematsu K, Tanizawa K, Kuroda S (2004) Identification of a tissue-non-specific homologue of axonal fasciculation and elongation protein zeta-1," Biochem.Biophys.Res.Commun., 313, 738-744

Futerman AH, Banker GA (1996) The economics of neurite outgrowth—the addition of new membrane to growing axons. Trends Neurosci.; 19:144–149

Galli T, Garcia EP, Mundigl O, Chilcote TJ, DeCamilli P (1995) Vand t-SNAREs in neuronal exocytosis:Aneed for additional components to define sites of release. Neuropharmacology 34, 1351–1360

Gindhart J, Chen J, Faulkner M, et al. (2003) The Kinesin-associated Protein UNC-76 Is Required for Axonal Transport in the *Drosophila* Nervous System. Molecular Biology of the Cell. 14:3356-3365

Goodman AB, Pardee AB (2003) Evidence for defective retinoid transport and function in late onset Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci USA 100:2901–2905

Hamburger V, Hamilton HL (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. Dev Dyn.;195(4):231-72

Heery DM, Kalkhoven E, Hoare S, And Parker MG (1997). A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. Nature 387: 733–736

Hirokawa N, Takemura R (2005) Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. Nature Review Neurosciences;6:201-214

Honda A, Miyoshi K, Baba K, Taniguchi M, Koyama Y, Kuroda S, Katayama T, Tohyama M. (2004). Expression of fasciculation and elongation protein zeta-1 (FEZ1) in the developing rat brain. Brain Res Mol Brain Res.:122(1):89-92

Jung MY, Lorenz L, and Richter JD . (2006). Translational Control by Neuroguidin, a Eukaryotic Initiation Factor 4E and CPEB Binding Protein. Mol Cell Biol. 26(11): 4277–4287

Kaasik A, Rikk T, Piirsoo A, Zharkovsky T, Zharkovsky A (2005). Up-regulation of lysosomal cathepsin L and autophagy during neuronal death induced by reduced serum and potassium. Eur J Neurosci. 22(5):1023-31

Kawai K, Sasaki S, Morita H, Ito T, Suzuki S, Misawa H, Nakamura H (2004) Unliganded Thyroid Hormone Receptor $\alpha 1$ Represses Liver X Receptor α / β Oxysterol-Dependent Transactivation. Endocrinology. 145(12):5515–5524

Kersten S, Kelleher D, Chambon P, Gronemeyer H e Noy N (1995) Retinoid X receptor a forms tetramers in solution. Proc. Natl. Acad. Sci. 92, 8645-49

Kliwer SA, Umesono K, Mangelsdorf DJ, Evans RM (2002) Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D₃ signalling. Nature 355, 446–449

Kim YE, Kim DY, Lee JM, Kim ST, Han TH, Ahn JH (2005) Requirement of the coiled-coil domain of PML-RAR α oncoprotein for localization, sumoylation, and inhibition of monocyte differentiation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 330:746-754

Kuroda S, Nakagawa N, Tokunaga C, Tatematsu K, and Tanizawa K (1999) Mammalian Homologue of the *Caenorhabditis elegans* UNC-76 Protein Involved in Axonal Outgrowth is a Protein Kinase C α -interacting Protein. The Journal of Cell Biology. 144, 3, 403-411

Lanza DC, Trindade DM, Assmann EM, Kobarg J (2008) Over-expression of GFP-FEZ1 causes generation of multi-lobulated nuclei mediated by microtubules in HEK293 cells. Exp Cell Res 314(10): 2028–2039

Lanza, DC, Silva, JC . Assmann, EM, Quaresma, AJ, Bressan, GC, Torriani, IL and Kobarg, J(2009) "Human FEZ1 has characteristics of a natively unfolded protein and dimerizes in solution," Proteins. 74: 104-121

Leid M, Kastner P, Lyons R, Nakshatri H, Saunders M, Zacharewski T, Chen JY, Staub A, Garnier J M, Mader S, Chambon P(1992) Purification, cloning, and RXR identity of a HeLa cell factor with which RAR α or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently Cell 68, 377–395

Liu JP, Laufer E, Jessell TM (2001) Assigning the positional identity of spinal motor neurons: rostrocaudal patterning of Hox-c expression by FGFs, Gdf11, and retinoids. Neuron. 32:997-1012

Maden M (2001) Role and distribution of retinoic acid during CNS development. Int Rev Cytol 209:1–77

Maden M (2006) Retinoids and spinal cord development. J Neurobiol.66:726-38

Maden M (2007). Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. Nature reviews neuroscience 8: 755-765

Mahoney TR, Luo S, and Nonet ML (2006) Analysis of synaptic transmission in *Caenorhabditis elegans* using an aldicarb-sensitivity assay. Nature Protocols. 1,1772 – 1777

- Martinez-Arca S, Coco S, Mainguy G, Schenk U, Alberts P, et al** (2001) A common exocytotic mechanism mediates axonal and dendritic outgrowth. J. neurosci 21: 3830-3838
- Matsuura A, Tsukada M, Wada Y, Ohsumi Y** (1997) Apg1p, a novel protein Kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae*. Gene 192, 245-250
- McKnight NC, Jefferies HBJ, Alemu EA, Saunders RE, Hopoço M, et al.** (2012) Genome-wide siRNA screen reveals amino acid starvation-induced autophagy requires SCOC and WAC. The EMBO Journal: 1–16
- Mic, F A, Haselbeck, R J, Cuenca, A E, and Duester, G** (2002) Novel retinoic acid generating activities in the neural tube and heart identified by conditional rescue of *Raldh2* null mutant mice. Development 129, 2271–2282
- Morfini G, Quiroga S, Rosa AL, Kosik K, and Caceres A** (1997) Suppression of KIF-2 inhibits neurite outgrowth and alters the distribution of a non-synaptic membrane receptor. J Cell Biol , 138, 657-669
- Mulder GB, Manley N, Grant S, Schimidt K, Zeng W, Eckhoff C, Maggio-Price L** (2000) Effects of excess vitamin A on development of cranial neural crest-derived structures: a neonatal and embryologic study. Teratology.:62:214-26
- Nakshatri H, Chambon P** (1994) The directly repeated RG(G/T)TCA motifs of the rat and mouse cellular retinol-binding protein II genes are promiscuous binding sites for RAR, RXR, HNF-4, and ARP-1 homo- and heterodimers. J. Biol. Chem. 269, 890–902
- Niederreither, K, Subbarayan, V, Dolle, P, and Chambon, P** (1999) Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. Nat. Genet. 21, 444–448
- Niederreither K, Vermot J, Schuhbauer B, Chambon P, Dolle P** (2000) Retinoic acid synthesis and hindbrain patterning in the mouse embryo. Development, 127:75-85
- Niederreither K, Dolle P** (2008) Retinoic acid in development: towards an integrated view. Nat Rev Genet, 9:541-553
- Nooren, I M A e Thornton, J M** (2003) Diversity of protein-protein interactions. EMBO J. 22, 3486–3492
- Novitsch B, Wichterle H, Jessell T, Sockanathan S** (2003) A requirement for retinoic acid-mediated transcriptional activation in ventral neural patterning and motor neuron specification. Neuron, 40:81-95
- Ogura K, Wicky C, Magnenat L, Tobler H, Mori I, Müller F, e Ohshima Y** (1994) *Caenorhabditis elegans* *unc-51* gene required for axonal elongation encodes a novel serine/threonine Kinase. Gene Dev. 8,2389-2400
- Olefsky JM** (2001). "Nuclear receptor minireview series". J. Biol. Chem. 276 (40): 36863-4
- Papanayotou C, Mey A, Birot AM, Saka Y, Boast S, Smith J C, Samarut J, Stern C D** (2008) A mechanism regulating the onset of *Sox2* expression in the embryonic neural plate. PLoS Biol 6:1
- Pierani A, Brenner-Morton S, Chiang C, Jessell TM** (1999) A sonic hedgehog independent, retinoid-activated pathway of neurogenesis in the ventral spinal cord. Cell, 97:903-915
- Plum, LA, M Clagett-Dame** (1996) *All-trans* retinoic acid stimulates and maintains neurite outgrowth in nerve growth factor-supported developing chick embryonic sympathetic neurons. Devel. Dynamics 205:52-63

Plum LA, Parada LF, Tsoulfas P, Clagett-Dame M (2001) Retinoic acid combined with neurotrophin-3 enhances the survival and neurite outgrowth of embryonic sympathetic neurons. Exp Biol Med 226: 766–775

Privalsky ML (2004) The role of corepressors in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors. Annu Rev Physiol 66: 315–360

Ross SA, Mccaffery PJ, Dräger VC, DE Luca LM (2000) Retinoids in embryonal development. Physiol. Rev;80:1021-54

Ruberte, E, Friederich, V, Chambon, P, Morriss-Kay, G (1993). Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. III. Their differential transcript distribution during mouse nervous system development. Development 118, 267±282

Sann S, Wang Z, Brown H, Jin Y(2009) Roles of endosomal trafficking in neurite outgrowth and guidance. Trends Cell Biol. (7):317-24

Socketanathan S, Jessell TM (1998) Motor neuron-derived retinoid signaling specifies the subtype identity of spinal motor neurons. Cell, 94:503-514

Su CW, Tharin S, Jin Y, Wightman B, Spector M, Meili D, Tsung N, Rhiner C, Bourikas D, Stoeckli E, Garriga G, Horvitz H R, Hengartner M O (2006). The short coiled-coil domain-containing protein UNC-69 cooperates with UNC-76 to regulate axonal outgrowth and normal presynaptic organization in *Caenorhabditis elegans*. Journal of Biology 5: 9

Surpili MJ, Delben TM, e Kobarg, J(2003) Identification of Proteins That Interact with the Central Coiled-Coil Region of the Human Protein Kinase NEK1. Biochemistry 42, 15369–15376

Swindell EC, Thaller C, Socketanathan S, Petkovich M, Jessell T M, e Eichele G (1999). Complementary Domains of Retinoic Acid Production and Degradation in the Early Chick Embryo. Dev. Biol 216: 282-296

Tang BL (2001) Protein trafficking mechanisms associated with neurite outgrowth and polarized sorting in neurons. J Neurochem. 79:5 923-930

Toda H, Mochizuki H, Flores R, Josowitz R, Krasieva T B, LaMorte V J, Suzuki E, Gindhart J G, Furukubo-Tokunaga K, e Tomoda T (2008) UNC-51/ATG1 kinase regulates axonal transport by mediating motor-cargo assembly. Genes & Development. 22(23):3292-3307

Torchia J, Rose DW, Inostroza J, Kamei Y, Westin S, Glass CK, e Rosenfeld MG (1997). The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. Nature 387: 677–684

Ulven, S M, Gundersen, T E, Weedon, M S, Landaas, V O, Sakhi, A K, Fromm, S H, Geronimo, B A, Moskaug, J O e Blomhoff, R (2000). Identification of endogenous retinoids, enzymes, binding proteins, and receptors during early postimplantation development in mouse: important role of retinal dehydrogenase type 2 in synthesis of all-transretinoic acid. Dev. Biol. 220, 379-391

Valkenburgh H V, Shern J F, Sharer J D, Zhu X, e Kahn R A (2001) ADP-ribosylation factors (ARFs) and ARF-like 1 (ARL1) Have Both Specific and Shared Effectors. J. Biol. Chem. 276, 22826–22837

Vaynberg J, Fukuda T, Chen K, Vinogradova O, Velyvis A, Tu Y, Ng L, Wu C, Qin J (2005) Structure of an Ultraweak Protein-Protein Complex and Its Crucial Role in Regulation of Cell Morphology and Motility. Molecular Cell, 17, 513–523

Young AR, Narita M, Ferreira M, Kirschner K, Sadaie M, Darot JF, Tavaré S, Arakawa S, Shimizu S, Watt FM, Narita M (2009). Autophagy mediates the mitotic senescence transition. Genes Dev. 23(7):798-803

Yu V C, Delsert C, Andersen B, Holloway J M, Devary OV, Naar A M, Kim S Y, Boutin JM, Glass CK, Rosenfeld MG (1991) RXRB: a coregulator that enhances binding of retinoic acid, thyroid hormone, and vitamin D receptors to their cognate response elements. Cell 67, 1251-1266

Zhang X K, Hoffmann B, Tran P B, Graupner P, Pfahl M (1992) Retinoid X receptor is an auxiliary protein for thyroid hormone and retinoic acid receptor. Nature 355, 441-446

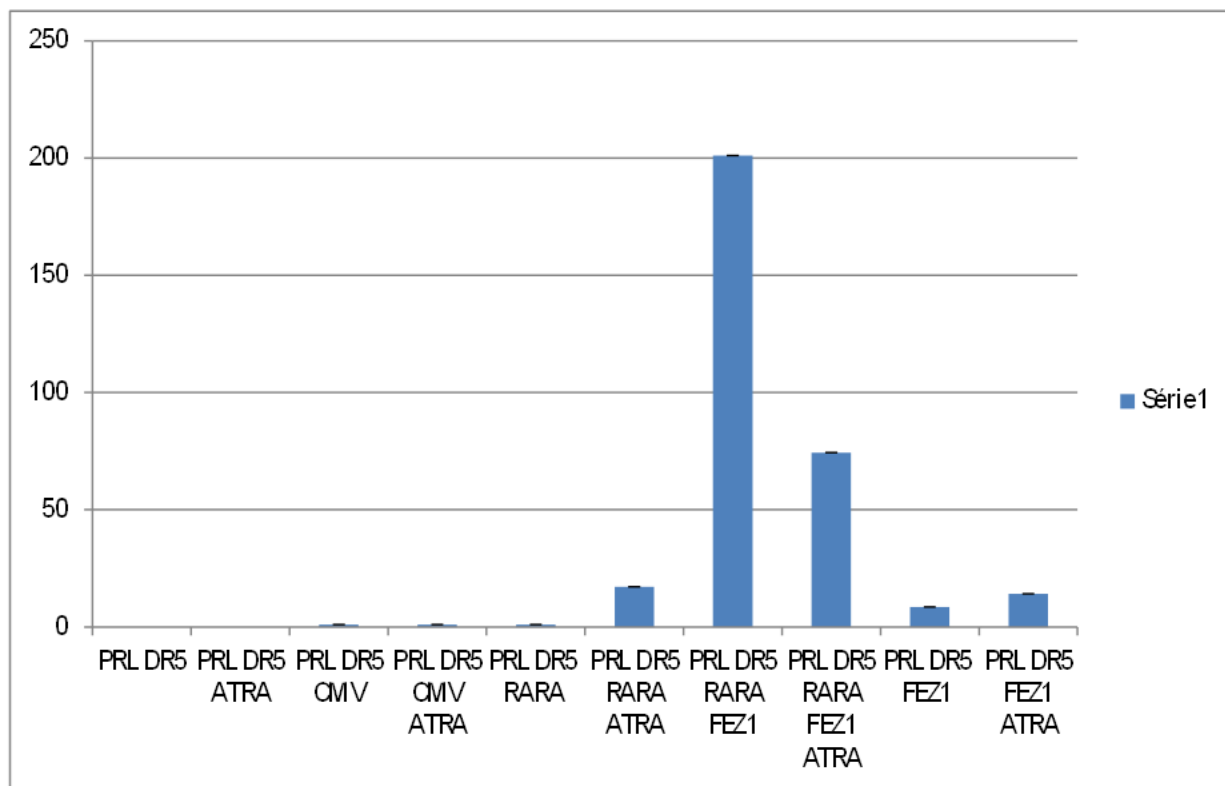
Zhang XK, Lehmann J, Hoffmann B, Dawson M I, Cameron J, Graupner G, Hermann T, Tran P, Pfahl M(1992) Homodimer formation of retinoid X receptor induced by 9 *cis* retinoic acid. Nature 358, 587-591

Zhang XK, Salbert G, Lee MO, Pfahl M (1994) Mutations that alter ligand induced switches and dimerization activities in the retinoid X receptor Mol. Cell. Biol. 14, 4311-4323

Zhu L, Santos NC, Kim KH (2009) Small ubiquitin-like modifier-2 modification of retinoic acid receptor-alpha regulates its subcellular localization and transcriptional activity. Endocrinology 150:5586-5595

Zile MH (1998) Vitamin A and embryonic development: an overview. J Nutr.;128:455-8

8. Anexos



Transativação de luciferase com RARA, ácido retinóico ATRA e FEZ1. Experimento completo de transativação de RARA mostrando todos os controles utilizados. A inserção de FEZ1 no sistema básico produz a maior luminescência mesmo na ausência do ligante, fato contrário ao observado sem a presença de FEZ1 no sistema básico. pRL é um plasmídeo usado como controle de transfecção que expressa luciferase (Renilla) sob controle do promotor, porém, independentemente de transativação. CMV é o plasmídeo vazio onde o RARA foi clonado para mostrar que o plasmídeo não influenciou na transativação.

Produção científica (artigos publicados) durante o período de Iniciação científica LNBio (Chua) com o projeto : Estudos estruturais e funcionais da homo e heterodimerização das proteínas FEZ1 e FEZ2 de *Homo sapiens* orientada pelo Dr. Jorg Kobarg (02/2009 – 12/2010) em conjunto com o Dr. Marcos Rodrigo Alborghetti;

- FEZ1 Protein Forms a Disulfide Bond Mediated Dimer: Implications for Cargo Transport. Alborghetti, MR; Furlan, AS; Silva, JC; Paes Leme, AF; Torriani, ICL; Kobarg, J. Human *Journal of Proteome Research*. v.9, p.4595 - 4603, 2010.

- FEZ2 has acquired additional protein interaction partners relative to FEZ1: functional and evolutionary implications. Alborghetti, MR; Furlan, AS; Kobarg, J. *PloS One*. 2011 Mar 8;6(Toda, Mochizuki et al.):e17426.

Manuscrito I (em fase final de elaboração)

Experimento em andamento para finalização do manuscrito: cross linking de FEZ1 e SCOC para mapeamento da interação.

Structural analysis of the interchains interactions in the kinesin adaptor complex FEZ1/SCOCO (Fasciculation and Elongation protein Zeta 1/ Short Coiled-Coil protein)

*Alborghetti MR, Furlan AS, Silva JC, Miguelletti DL, Sforça ML, Neves JL, Zeri AC,
Torriani ICL, Kobarg J*

Abstract

The *C. elegans* protein UNC-69 (orthologous to human SCOCO – short coiled-coil protein) interacts physically with UNC-76 (orthologous to human FEZ1 – fasciculation and elongation protein zeta 1) and both act in the same pathway to control axon extension. Exploiting the feature of FEZ1 protein as adapter of the transport mediated by kinesins and FEZ1 protein interaction with SCOCO, we investigated the structural aspects of this interaction by SAXS (Small Angle X-ray Scattering) studies. The data showed that a FEZ1 homodimer is able to interact with two molecules of SCOCO, according to the proposition that FEZ1 act as a transport bivalent adaptor molecule that can interact with both cytoskeletal elements by one of the monomers and with cargo elements with the other monomer. The topology of homodimerization was accessed through NMR (Nuclear Magnetic Resonance) studies of the region involved in this process, corresponding to FEZ1 (92-194). Through these studies involving the protein in its monomeric configuration (reduced) and dimeric, we conclude that homodimerization occurs with FEZ1 chains oriented in parallel topology. These data allowed concluding that FEZ1 can act as a bivalent adaptor of transport mediated by kinesins and, probable, in the transcription machinery.

Introduction

Neuronal differentiation *in vitro* and *in vivo* involves coordinated changes at various levels, including in the gene expression, cytoskeleton rearrangements and trafficking processes [1]. During the neuronal differentiation, the growth of neurite processes from the cell body involves a massive increase in cell surface area [2]. The membrane increment occurs in a very dynamic axon structure called growth cone. For growth cones to extend, vesicles derived from the Golgi apparatus fuse with the plasma membrane by a process of regulated exocytosis [3]. These vesicles are not only transported but are also differentially sorted into dendrites or axons [4,5]. Localization of dendritic, axonal and pre-synaptic proteins is dependent of kinesin mediated transport [6]. Knockdown of the kinesin motors using antisense oligonucleotides not only disrupts dendritic or axonal localization of these proteins, but also suppresses neurite outgrowth, presumably by blocking kinesin-dependent vesicle transport [7,8]. The vesicular transport during neuronal development has been extensively studied using the nematode model *Caenorhabditis elegans*. Through genetic screenings using this mutant worm, many genes related to axonal growth were also identified to cause defects in locomotion. These genes were termed as *unc* (uncoordinated). Through this approach some kinesins have been identified as UNC104/KIF1A, UNC-116/kinesin heavy

chain (KHC) and kinesin light chain KLC-2, and other proteins. In *unc-69* (the orthologue to human SCOCO – short coiled coil protein) mutants (like *e587* mutant) several outgrowth defects are observed, including premature termination of axonal processes, ectopic extension of branches, and de-fasciculation of axon bundles [9]. This spectrum of phenotypes resembles the disruption of UNC-76 (the orthologue to human FEZ1 – fasciculation and elongation protein zeta 1) in *C. elegans* (like *e11* mutants) [10,11] (figure 1), a protein that binds to the carboxyl terminus of the kinesin heavy chain (KHC) [12]. In 2006, SU et al., showed that UNC-69 interacts physically with UNC-76 and both act in the same pathway to control axon extension. Moreover, UNC-116/KHC is required for proper subcellular distribution of both UNC-76 and UNC-69. In *unc116* mutants, UNC-76 failed to co-localize with UNC-69, and the normal puncta distribution of both protein was changed to a more diffuse distribution.

UNC69 interacts with the protein Arl1 (ADP-ribosylation factor like protein). The overall function of Arl1 is, like other Arfs and Rabs, presumably to recruit specific effectors to a specific membrane in the cell, in this case the trans-Golgi [13]. Studies in mammalian cells have also indicated that Arl1 acts on the Golgi to facilitate the arrival of membrane traffic from the endosomal system. The protein is present on the membranes of the trans side of the Golgi, and it recruits by direct binding GRIP domain coiled-coil proteins, and possibly recruits or activates other effectors [13]. UNC-69 could act as an effector of Arl1 protein. In fact, mutations in UNC-69 preferentially disrupt membrane traffic within axons. It has been suggested a role of bivalent adapter transport mediated by kinesins for FEZ1 (which dimerizes via disulfide bridge), and probably for FEZ2 [14]. FEZ family proteins have the ability to interact with a wide spectrum of proteins (FEZ1 interacts with 80 proteins and FEZ2 proteins with these same 80 plus 19 more specific interactions). This high amount of protein-protein interaction classifies FEZ proteins as interaction hubs. The interaction partners identified could, among other functions, be cargoes to be transported by adaptor protein FEZ1 bound to transporter kinesins. Many identified proteins are membrane components of mitochondria and vesicles, and these organelles are likely to be

transported by the same system. It has been demonstrated that inhibition of FEZ1 protein expression by iRNA interference changes the location for these organelles in the cell [12]. Moreover, FEZ1 protein is able to interact with a plenty of nuclear proteins, including proteins involved in transcription regulation (DRAP1, GTFIRD2, MCM7, MED7, MLF1IP, RARA, SAP30, SAP30L, SFRS8, SLTM) that could be involved in the regulation of expression of *sox2* gene. Thereby the pattern of function of the proteins that interact with FEZ1 at large resembles that of proteins interacting with SCOCO. To date, the majority of proteins interacted with the C-terminal of the FEZ family proteins. This region has a strong prediction to form coiled-coil structures, which are responsible for protein-protein interaction. The UNC-69 protein, which also has a strong prediction for coiled-coil structures in almost its entire length, interacts through this region, and according to SU and colleagues, the integrity of the coiled coil in UNC-76 is required for interaction with UNC-69. There are no other structured regions in FEZ proteins [15], and these proteins are classified as intrinsically disordered protein. Intrinsically disordered proteins are now recognized as crucial in areas such as transcriptional regulation, translation and cellular signal transduction as a consequence of the use of new paradigms in biochemical methodology. Many eukaryotic proteins are modular — that is, they contain independently folded globular domains that are separated by flexible linker regions. The protein FEZ1, however, shows no globular domain, not showing the modular character mentioned above (figure 1). Here, we confirmed and characterized the interaction between humans 6xHis-FEZ1 (1-392) and GST-SCOCO (42-122) by SAXS (Small Angle X-ray Scattering) and performed NMR (Nuclear Magnetic Resonance) study about FEZ1 N-terminal homodimerization and model refinement of 6xHis-FEZ1/GST-SCOCO protein complex. We concluded that FEZ1 interacts itself in a dimeric topology and interacts with two molecules of SCOCO simultaneously. These data are in accordance with the model of FEZ1 protein acting as a bivalent adaptor of transport mediated by kinesin as so a bivalent function in transcription modulation. Moreover, this is the first low-resolution model, to our knowledge, of a complex with structured elements (such as GST fused to SCOCO), but

with a predominance of intrinsically unstructured regions modeled through a strategy that uses a mixed approach to

Results

FEZ1 dimer interacts with two molecules of SCOCO

To act as a bivalent adaptor, FEZ1 protein should be able to interact with two proteins simultaneously. To verify this condition we performed co-purification assays with 6xHis-FEZ1 (1-392) and GST-SCOCO (42-122) (figure 2A) followed by SAXS data acquisition and analyses (figure 2B). We chose to fuse the protein SCOCO with GST protein to get more distinction of SCOCO molecule in the complex, since its small size (9.2 kDa, according to ProtParam) would be a drawback for a SAXS analysis of this protein within a larger complex. Our results showed a homodimer of FEZ1 protein interacting with two molecules of SCOCO. According to ProtParam predictions the 6xHis-FEZ1 (1-392) protein has an expected size of 48.8 kDa and GST-SCOCO (42-122) an expected size of 36.8 kDa. The mass calculated from the SAXS data was approximately 172 kDa, which agrees with the state of the heterotetramer complex (predicted to be 171.2 kDa). The maximum diameter obtained for the complex was 320 Å and R_g 104 Å (± 2). The pattern of the $p(r)$ curve suggests an elongated region in the complex as globular regions, which corroborates with the fact of FEZ1 being an intrinsically unstructured protein (elongated) and with the fact of SCOCO being fused to GST (which is globular). *Complex model agrees with C-terminal interaction in FEZ1 by SCOCO.* As described before by Su and co-workers (2006) and Assmann and co-workers (2006), *C. elegans* UNC-69 interacts with the C-terminal region of *C. elegans* UNC-76 and human SCOCO interacts with the C-terminal region of FEZ1, respectively. The theoretical curve scattering from the low resolution model (figure 3) of 6xHis-FEZ1 interacting with GST-SCOCO generated by SAXS data and *ab initio* modeling was the best with SCOCO interacting in the C-terminal of FEZ1 (data not shown).

FEZ1 dimerization involves few amino acids
We verified the topology of homodimerization of FEZ1 by NMR spectroscopy. The possible assignments of amide resonances (1H and 15N) are represented in the 2D 15N-HSQC

development models of rigid bodies combined with *ab initio* modeling of unknown regions.

spectrum of the protein in Figure 4. Two FEZ1 (92-194) 2D 15N-HSQC spectra are shown in figure 4: the protein in monomeric conformation (black) and dimeric conformation (red). The monomeric and dimeric protein were completely disordered, but some distinct chemical shifts were observed among monomers and dimers. Relaxation data (figure 5) are consistent with the presence of residues maintaining contacts each other between the chains of the protein FEZ1. Through NOE analysis (data not shown) of the assigned residues that maintain these contacts, we can suggest that the homodimerization occurs in an antiparallel topology. However, due to the high proportion of identical residues both intra and inter-chains, the results are still preliminary and the parallel topology cannot be discarded (figure 6).

Discussion

Transport of vesicles and organelles often occurs over long distances. For example, membrane receptors destined for synapses in neuronal cells need to be transported from the cell body down axons that can reach a meter in length. Diffusion would be prohibitively slow and cells have therefore evolved molecular motors that transport vesicle cargoes along microtubule tracks. Kinesins are among these motors and use the energy of ATP to move towards the plus ends of microtubules [4–6]. A general picture is emerging whereby kinesin family members use adaptor/scaffolding proteins to link to their cargoes, although examples of direct interactions with transmembrane proteins exist. Importantly, FEZ1 (and FEZ2) is the first protein identified that binds to the inhibitory globular tail of KHC, and together with JIP1 (that binds to KLC), release the kinesin-1 from the auto-inhibitory site. These data indicate that FEZ1 is not likely to be strictly a cargo of kinesin-1. Recent findings propose that FEZ1 could act as a bivalent adaptor of transport mediated by kinesin. Through its function as adaptor protein, FEZ1 would be able to interact with two other protein molecules simultaneously. The dimeric conformation of FEZ1 by the N-terminal described by Lanza and colleagues (2008) [15] is in accordance with this requirement, since, once dimer, the protein

have two C-terminal regions (involved in protein-protein interaction). This paper support and bring more structural details to the hypothesis. SAXS experiments confirmed the composition of heterotetramer of two molecules of 6xHis-FEZ1 (1-392) and 2 molecules of GST-SCOCO (421-122), a partner of the interaction of FEZ1 identified in two-hybrid screenings in yeast, corroborating the hypothesis of bivalent adapter. NMR data of FEZ1 protein (92-194) further demonstrate that FEZ1 dimerizes in parallel topology. In 2010, we demonstrated by native gel, SAXS and mass spectrometry that FEZ1 dimerizes by disulfide through the cysteines 133 of each monomer [14]. *In vivo*, this dimeric state covalently bound may be important for transport of proteins mediated by kinesins along microtubules, providing stability to the dimer during the transport process. The protein SCOCO interacts with proteins involved in trans-Golgi network, as Arl1, present on the membranes of the trans side of the Golgi, probably involved to recruit specific effectors to a specific membrane in the cell. Our data suggest that FEZ1 act as a link, as an adapter, of the machinery transport mediated by kinesins and proteins from trans-Golgi network destined to vesicle transport, for instance. In fact, mutations in both FEZ1 and SCOCO cause similar phenotypes and lead to axonal growth deficiencies, mistakes of synaptic vesicles transport, among others. Has not been confirmed that the interaction between FEZ1 and SCOCO is interrupted in these phenotypes. Certainly in the mutant *e11* the interaction with FEZ1/UNC-76 and SCOCO/UNC-69 is disrupted. The mutation promotes the formation of a premature stop codon before the minimal interaction region of SCOCO in FEZ1. The mutant *e587* also has a mutation that causes a premature stop codon, but in SCOCO/UNC-69. However, the truncated region, apparently, does not lose a segment of its coiled-coil (structure involved in protein-protein interaction). The deleted region is predicted to be a coil (figure 1). Unfortunately, it is unclear whether FEZ1 interacts with this region. If interacts, then probably the interaction FEZ1-SCOCO is essential for normal neuritogenesis. Otherwise, besides the interaction is important, this segment of SCOCO probably

interacts with proteins essential for neuritogenesis, relating to both transport mechanisms and the mechanisms involved in regulating the expression of genes involved in the process.

The fact that FEZ1 is intrinsically unstructured, dimer and promiscuous in relation to its large number of interactions with its C-terminal regions and interacts with cytoskeletal elements (kinesin, tubulin, CLASP2) can be crucial to explain the formation of bridges between microtubules and constriction of the nucleus, resulting in turn in the flower-like phenotype when FEZ1 is over-expressed [18]. The covalent dimerization can also be important for stabilization during operation of traction to the constriction of the nucleus. In summary, our data show that FEZ family proteins can act as bivalent adaptor proteins, as in the transport as in the transcriptional machineries. We demonstrate that FEZ1 protein dimerizes through disulfide bond, parallel and can interact in their dimeric form, with two other proteins at the same time. As an intrinsically disordered protein, FEZ1 is essential to neuronal function, as SCOCO is.

Material and Methods

SAXS sample preparation

The nucleotide sequence of human SCOCO (42-122) in the library vector pACT2, which are inserted between restriction sites *Eco* RI and *Xho* I and code for the interacting protein identified in the yeast two-hybrid system screen [19], was subcloned into the bacterial expression vector pGEX-4T-2 (GE Healthcare, Waukesha, WI) to allow expression of recombinant GST fusion proteins in *Escherichia coli*

BL21 (DE3) cells. The cells were induced for 4 h to protein expression at 37 °C using 0.5 mM isopropyl1-thio- β -D-galactopyranoside. The protein 6xHis-FEZ1 (1-392) expression was performed as described in Assmann (2006). Cells from 2L of expression of 6xHis-FEZ1 (1-392) and 1L of GST-SCOCO (42-122) were harvested together by centrifugation at 4,500 X *g* for 10 min, and the cell pellet was resuspended

and incubated for 30 min with 10 volumes of lysis buffer (137mMNaCl, 2.7mMKCl, 10mMNa₂HPO₄, 1.8mM KH₂PO₄, pH 7.4, 1 mg/ml lysozyme, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 0.05 mg/ml DNase). After three cycles of sonication, soluble and insoluble fractions were separated by centrifugation at 28,500 X *g* for 30 min at 4°C. The cleared

supernatant was then loaded onto a HiTrap chelating column

(GE Healthcare) pre-equilibrated with lysis buffer (lacking lysozyme and DNase), followed by extensive wash of the column with the same buffer. Bound proteins were eluted in a gradient of 0–100% of elution buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 500 mM imidazole, pH 7.4). Aliquots of each eluted fraction obtained were analyzed by

SDS-PAGE, and peak fractions containing 6xHis-FEZ1 (1-392) and GST-SCOCO (42-122) followed by a new step of purification in a GST-Trap column (GE Healthcare). Again, aliquots of each eluted fraction obtained were analyzed by SDS-PAGE and 1 mL aliquot was dialyzed with buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄) and analyzed by DLS (Dynamic Light Scattering). The

aliquots that showed the most narrow, single peaks and predicted masses and percentage of polydispersity indicative of a monodisperse solution were selected to SAXS data acquisition.

SAXS experiments

The SAXS experiments were performed at the D02A-SAXS2 beamline of the Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS, Campinas, Brazil). Measurements were performed with a monochromatic X-ray beam with a wavelength of $\lambda = 1.488 \text{ \AA}$. The X-ray patterns were recorded using a two-dimensional position-sensitive MARCCD detector. The sample-to-detector distances were set at 1374.4 mm and 1788.8 mm, resulting in a scattering vector range of $0.009 \text{ \AA}^{-1} < q < 0.25 \text{ \AA}^{-1}$, where q is

$$\frac{I(q)}{I(0)} = \frac{2}{x^2} (x - 1 + e^{-x})$$

where $x = q^2 R_g^2$.

Moreover, R_g was also evaluated from the pair distance distribution function $p(r)$ which was calculated using the indirect transform package GNOM[25]. The $p(r)$ function represents the histogram of all distances within a molecule and provides the maximum dimension D_{max} of the molecule where its value reaches zero [15]. To analyze the natively unfolded conformation of 6xHis-

the magnitude of the q -vector defined by $q = (4\pi/\lambda)\sin(\theta/2)$ (θ is the scattering angle). For SAXS measurements protein samples were placed in a 1mm path length cell with mica windows, temperature controlled ($T = 20^\circ\text{C}$) via water circulation[15]. Three successive frames of 300s each were recorded for each sample. The buffer scattering data were recorded before and after the sample scattering data for 300 s each and thereafter averaged. The scattering curves were individually corrected for the detector response

and scaled by the incident beam intensity and the samples absorption. The average buffer scattering was subtracted from the corresponding sample scattering. The resulting curve was carefully inspected to check

for possible radiation-induced damage, but no such effects were observed. The scattering patterns were recorded at concentration of 1.16 mg/mL. The molecular mass of each 6xHis-FEZ1 complexed with GSTSCOCO (42-122) sample was inferred from the ratio of the extrapolated value of the intensity at the origin $I(0)$ [20].

SAXS data analysis The radius of gyration was first evaluated using the Guinier approximation [21,22,23]. It is worth noting that in the case of an unstructured protein, the Guinier approximation holds true on a very restricted q range corresponding to $q < 1/R_g$. Such a very narrow range contains a small number of experimental points, thereby limiting the accuracy of the R_g determination. In that case, a more accurate determination of the radius of gyration can be obtained by Debye's equation[15,24], which adequately describes the scattering in the domain $q < 1.4/R_g$ by:

FEZ1(1-392) chains, a particularly useful representation of the SAXS intensity was used: the so-called Kratky Plot ($q^2 I(q)$ vs. q). This plot is usually applied to study unstructured proteins because it provides information about the compactness of a molecule. For compact and structured proteins, the Kratky representation presents a bell-shaped plot with a q -defined

maximum, because the scattering function satisfies Porod's law for large q values (i.e. $I(q)$ is proportional to $1/q^4$). Conversely, the Kratky representation of an ideal Gaussian chain [15], (equivalent to a random coil in the case of an infinitely thin chain) presents a plateau at high q values because I (Lanza, Silva et al.) is proportional to $1/q^2$. Finally, in the case of a persistence length chain model, where short-range interactions between adjacent chain segments produce stiffness of the chain, the Kratky plot also displays a plateau over a specific q -range followed by a monotonic increase at still higher q -values [24,26].

Ab initio modeling A combined approach to modeling rigid body and flexible structure was used to generate the low-resolution model of 6xHis-FEZ1 (1-392) complexed with GST-SCOCO (42-122). Although the "shape" of naturally unfolded proteins is per se hard to define, we restored the low resolution average conformations of 6xHis-FEZ1(1-392) complexed with GST-SCOCO (42-122) from the experimental SAXS curves by the following ab initio approach. To obtain an overall view from the conformational space occupied by the proteins, the program DAMMIN [25], was used. In this approach, each protein was represented as an assembly of densely packed spherical beads (dummy atoms) of radius $r_0 \ll D_{max}$ inside a sphere of diameter D_{max} , which was directly determined from the scattering data using the GNOM routine. Using simulated annealing, the program DAMMIN starts from a random configuration of beads and searches for a configuration that fits the experimental scattering pattern. Ten calculations were performed. The normalized spatial discrepancies (NSD) were evaluated using the DAMAVER suite [27], and the most typical model (with lowest NSD value) were considered as close descriptions of the possible conformations of the molecule.

NMR sample preparation

The cloning of FEZ1 (92-194) is described in Alborghetti et al. (2010) [14]. pET-FEZ1 (92-194) plasmid was transformed into BL21(DE3) *Escherichia coli* expression cells

and grown at 37°C in M9 minimal medium supplemented with 30 μ g/mL kanamycin, 4 g/L [13 C]glucose and 1 g/L [15 N]ammonium chloride. Expression was induced at an OD₆₀₀ of 0.8-1.0 by the addition of 0.2 mM IPTG for 24 h. The cells were harvested by centrifugation at 5000 g for 10 min and the purification methodology is described Alborghetti et al. (2010) [14]. Fractions containing pure 6xHis-FEZ1 (92-194) were pooled and concentrated to 0.3 mM in buffer containing 20mM phosphate, 50mM NaCl, pH 6.2. The sample was divided in two aliquots and one was reduced with 4mM DTT and both were analyzed by NMR spectroscopy.

NMR Spectroscopy NMR experiments for structure determination were performed at 293 K using a Varian Inova 600 MHz spectrometer equipped with a cryogenic probe. The following experiments were recorded: 15NHSQC; 15N-edited NOESY (80 ms mixing time, chosen after a build up curve with other mixing time values); 15N-edited TOCSY; HNCA; HN(CO)CA; HNCACB; CBCA(CO)NH; HNCO; HN(CA)CO [28].

Relaxation Measurements

For the backbone amide relaxation measurements, 15N T₁, 15N T₂ and heteronuclear NOE experiments were recorded at a 15N frequency of 60.78 MHz on a Varian Inova 600 MHz spectrometer equipped with a cryogenic probe. T₁ relaxation delays were set to 10, 210, 410, 610, 810, 1010, 1210, 1410, 1710, 2010, and 2410ms. T₂ relaxation delays were set to 10, 30, 50, 70, 90, 110, 130, 150, 170, 90 and 210ms. In all the experiments a relaxation delay of 3s was used. For the heteronuclear NOE measurements, a pair of spectra was recorded with and without proton saturation. Spectra recorded with proton saturation utilized a 5s recycle delay followed by a 15s period of saturation, while spectra recorded in the absence of saturation employed a recycle delay of 15s. Peak volumes were fitted to a single exponential decay function using the program NMRView. The two-dimensional experiments were acquired with 1024 x 128 complex points [28].

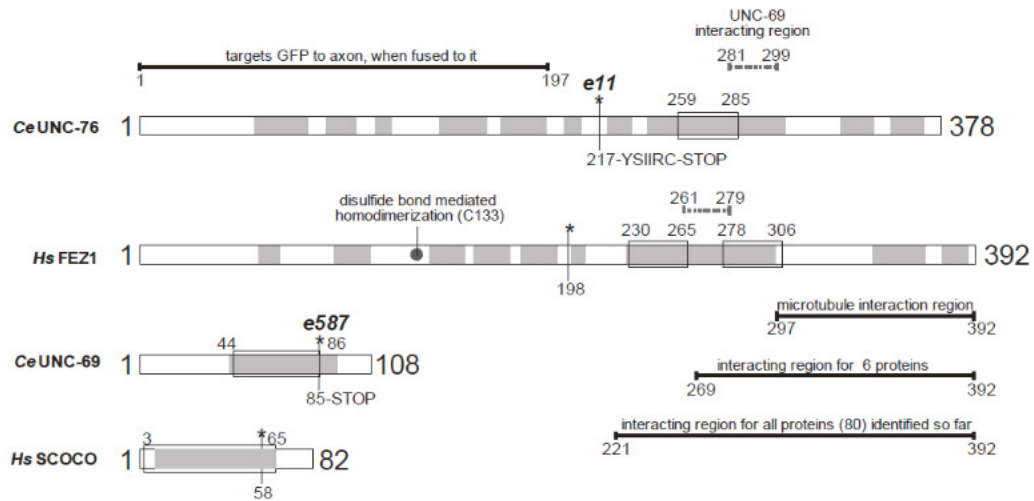


Figure 1 – General scheme of UNC-76/FEZ1 (*C. elegans*/*H. sapiens*) and UNC-69/SCOCO (*C. elegans*/*H. sapiens*) proteins. Mutations observed *in C. elegans*, and the corresponding region in the human protein, are indicated by asterisks. Coiled-coils:box, alpha-helix prediction: gray

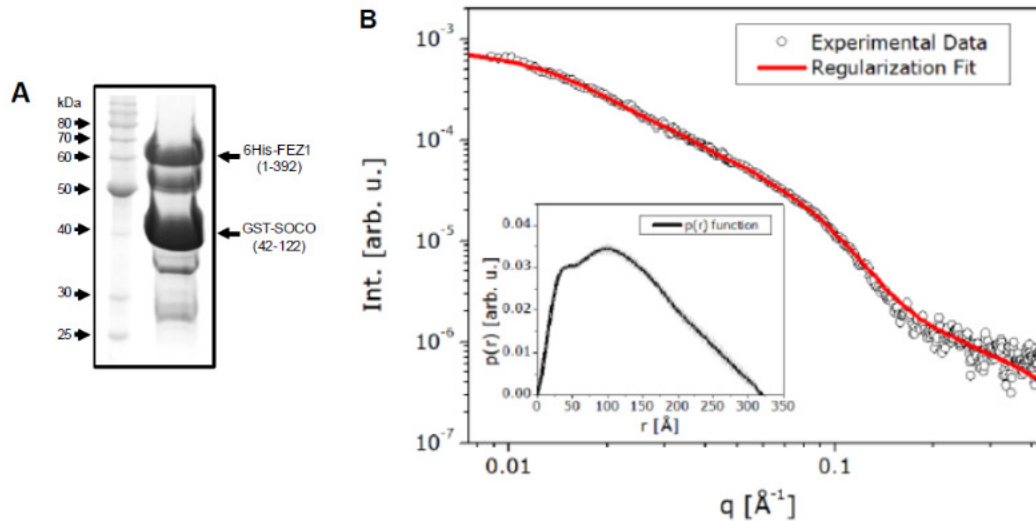


Figure 2. A) SDS-PAGE 10% of the 6xHis-FEZ1 (1-392) and GST-SCOCO (42-122) protein complex. The complex was analyzed by SAXS at 1.16 mg/mL in PBS buffer. The complex polydispersity was 28,0% according to DLS assay. B) SAXS (Small Angle X-ray Scattering) experiments of 6xHis-FEZ1 (1-392) interacting with GST-SCOCO (42-122). Scattering intensity curve of FEZ1 (1-392) Inset: Pair Distance Distribution Functions ($p(r)$ functions).

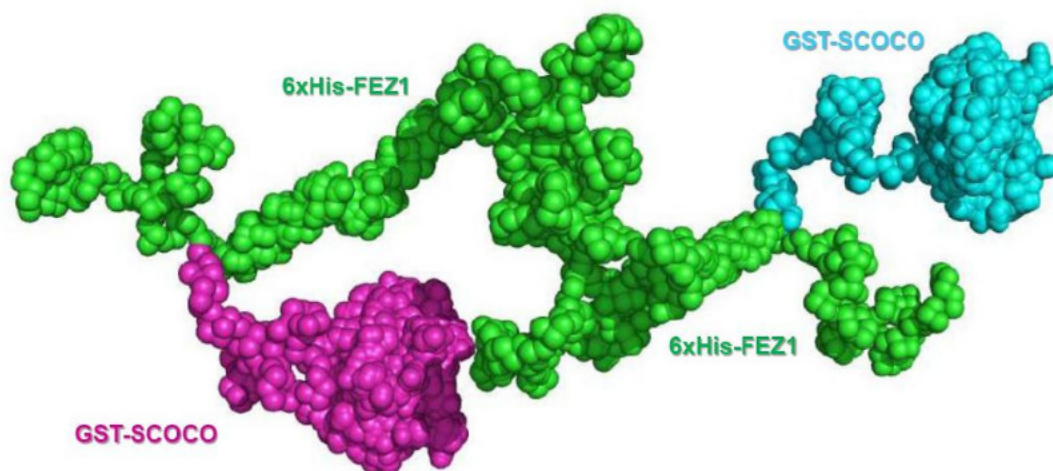


Figure 3. Low resolution *ab initio* model for 6xHis-FEZ1 (1-392) with GST-SCOCO (42-122) derived from SAXS data. Representative dummy-residue single model. A heterotetrameric state is observed, which consists of two GST-SCOCO molecules attached to two FEZ1 molecules.

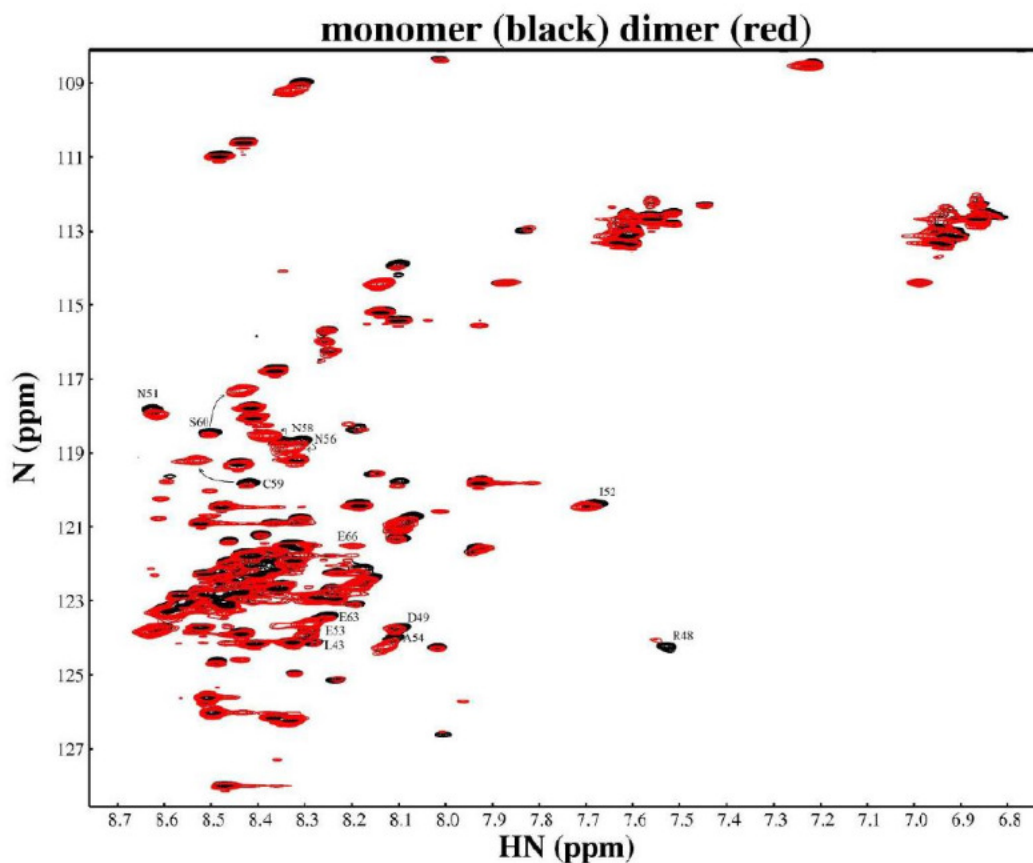


Figure 4. ^{15}N -HSQC FEZ1 (92-194) Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectra. HSQC shows chemical shifts in reduced monomeric protein (black) and non-reduced dimeric protein (red). The spectrum was obtained in spectrometer 600 MHz in NMR Laboratory of LNBio/CNPq. For the series of experiments, isotope ^{15}N was introduced in minimal medium for growth of bacteria and induction of protein expression.

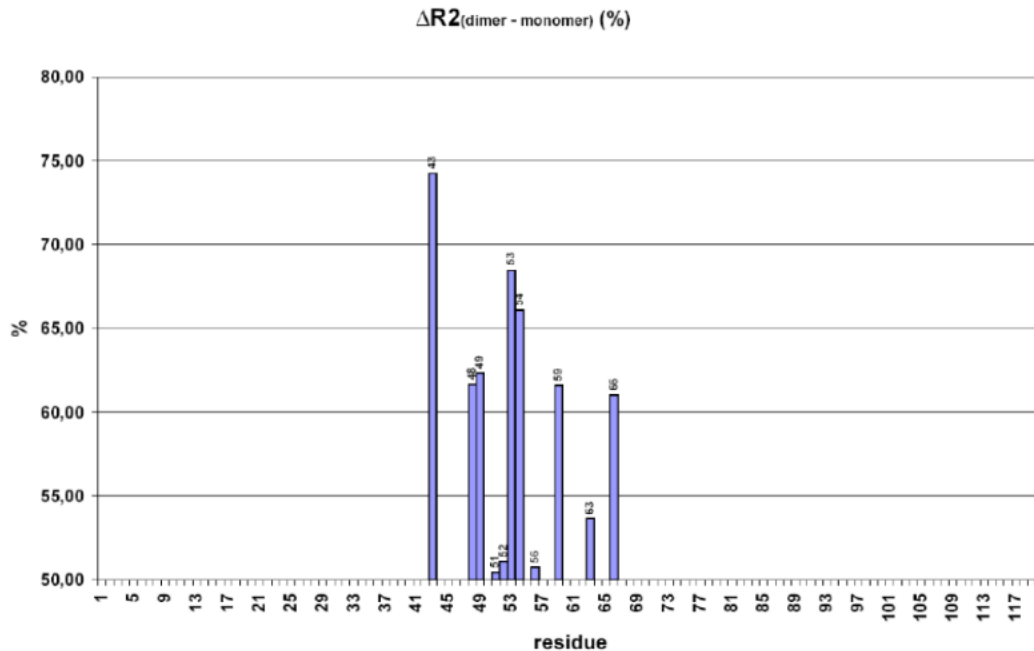


Figure 5. Relaxation assay by spin-spin interaction (T_2), where R_2 is the inverse of T_2 , the results refer to the ratio of dimer and monomer.



Figure 6. Amino acid sequence of 6xHis-FE21 (92-194) studied by nuclear magnetic resonance labeled with the isotope ^{13}C . Cysteine is marked in red and dotted lines indicate the possible contacts between monomers obtained from NOESY spectra.

References

1. Tang BL (2001) Protein trafficking mechanisms associated with neurite outgrowth and polarized sorting in neurons. *J Neurochem* 79: 923-930.
2. Futerman AH, Banker GA (1996) The economics of neurite outgrowth—the addition of new membrane to growing axons. *Trends Neurosci* 19: 144-149.
3. Martinez-Arca S, Coco S, Mainguy G, Schenk U, Alberts P, et al. (2001) A common exocytotic mechanism mediates axonal and dendritic outgrowth. *J Neurosci* 21: 3830-3838.
4. Burack MA, Silverman MA, Banker G (2000) The role of selective transport in neuronal protein sorting. *Neuron* 26: 465-472.
5. Horton AC, Ehlers MD (2003) Neuronal polarity and trafficking. *Neuron* 40: 277-295.
6. Luo S, Nonet ML (2006) Regulators of kinesin involved in polarized trafficking and axon outgrowth. *J Biol* 5: 8.
7. Ferreira A, Niclas J, Vale RD, Banker G, Kosik KS (1992) Suppression of kinesin expression in cultured hippocampal neurons using antisense oligonucleotides. *J Cell Biol* 117: 595-606.
8. Morfini G, Quiroga S, Rosa A, Kosik K, Caceres A (1997) Suppression of KIF2 in PC12 cells alters the distribution of a growth cone nonsynaptic membrane receptor and inhibits neurite extension. *J Cell Biol* 138: 657-669.

9. Su CW, Tharin S, Jin Y, Wightman B, Spector M, et al. (2006) The short coiled-coil domain-containing protein UNC-69 cooperates with UNC-76 to regulate axonal outgrowth and normal presynaptic organization in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol* 5: 9.
10. Hedgecock EM, Culotti JG, Thomson JN, Perkins LA (1985) Axonal guidance mutants of *Caenorhabditis elegans* identified by filling sensory neurons with fluorescein dyes. *Dev Biol* 111: 158-170.
11. Bloom L, Horvitz HR (1997) The *Caenorhabditis elegans* gene *unc-76* and its human homologs define a new gene family involved in axonal outgrowth and fasciculation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 3414-3419.
12. Gindhart JG, Chen J, Faulkner M, Gandhi R, Doerner K, et al. (2003) The kinesin-associated protein UNC-76 is required for axonal transport in the *Drosophila* nervous system. *Mol Biol Cell* 14: 3356-3365.
13. Munro S (2005) The Arf-like GTPase Arl1 and its role in membrane traffic. *Biochem Soc Trans* 33: 601-605.
14. Alborghetti MR, Furlan AS, Silva JC, Paes Leme AF, Torriani IC, et al. Human FEZ1 protein forms a disulfide bond mediated dimer: implications for cargo transport. *J Proteome Res* 9: 4595-4603.
15. Lanza DC, Silva JC, Assmann EM, Quaresma AJ, Bressan GC, et al. (2008) Human FEZ1 has characteristics of a natively unfolded protein and dimerizes in solution. *Proteins*.
16. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263: 802-805.
17. Setou M, Seog DH, Tanaka Y, Kanai Y, Takei Y, et al. (2002) Glutamate-receptor-interacting protein GRIP1 directly steers kinesin to dendrites. *Nature* 417: 83-87.
18. Lanza DC, Trindade DM, Assmann EM, Kobarg J (2008) Over-expression of GFP-FEZ1 causes generation of multilobulated nuclei mediated by microtubules in HEK293 cells. *Exp Cell Res* 314: 2028-2039.
19. Assmann EM, Alborghetti MR, Camargo ME, Kobarg J (2006) FEZ1 dimerization and interaction with transcription regulatory proteins involves its coiled-coil region. *J Biol Chem* 281: 9869-9881.
20. Orthaber D, Bergmann A, Glatter O (2000) SAXS experiments on absolute scale with Kratky systems using water as a secondary standard. *J Appl Crystallogr* 33: 218-255.
21. Guinier A, Fournet G (1955) *Small angle scattering of X-rays*: New York: Wiley. 5-78 p.
22. Feigin LA, Svergun DI (1987) *Structure analysis by small angle X-ray and neutron scattering*. : New York: Plenum Press. 59-104 p.
23. Glatter O, Kratky O (1982) *Small angle X-ray scattering*.: New York: Academic Press. 17-50 p.
24. Moncoq K, Broutin I, Craescu CT, Vachette P, Ducruix A, et al. (2004) SAXS study of the PIR domain from the Grb14 molecular adaptor: a natively unfolded protein with a transient structure primer? *Biophys J* 87: 4056-4064.
25. Svergun DI (1999) Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. *Biophys J* 76: 2879-2886.
26. Perez J, Vachette P, Russo D, Desmadril M, Durand D (2001) Heat-induced unfolding of neocarzinostatin, a small all-beta protein investigated by small-angle X-ray scattering. *J Mol Biol* 308: 721-743.
27. Volkov VV, Svergun DI (2003) Uniqueness of ab initio shape determination in small-angle scattering. *J Appl Crystallogr* 36: 860-864.
28. de Oliveira JF, Sforca ML, Blumenschein TM, Goldfeder MB, Guimaraes BG, et al. Structure, dynamics, and RNA interaction analysis of the human SBDS protein. *J Mol Biol* 396: 1053-1069.

Manuscrito II (em fase inicial de elaboração)

Experimento em andamento para finalização do manuscrito: titulação da afinidade de RARA DBD (domínio de ligação ao DNA) com o elemento responsivo DR5 na presença e na ausência de FEZ1, para confirmar resultados obtidos no ensaio de transativação de luciferase com RARA e FEZ1; cross linking de FEZ1 e RARA para mapeamento da interação;

FEZ1 interacts with Retinoic Acid Receptor α (RAR α) and both act together in the transcription machinery

Furlan AS, Alborghetti MR, Figueira ACM, Paes Leme A.F, Castilho, H.A. Neto, J.X, Kobarg

