

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

***SCREENING* DE UMA BIBLIOTECA DE EXPRESSÃO DE cDNA
DE CEREBELO DE RATO USANDO-SE COMO SONDA O
ANTICORPO ANTI-KM⁺
E
EXPRESSÃO DE DREBRINAS EM DISPLASIA CORTICAL
FOCAL IIB ASSOCIADA COM EPILEPSIA DE DIFÍCIL
CONTROLE MEDICAMENTOSO**

ROBERTA DE ASSIS MAIA

RIBEIRÃO PRETO

2007

ROBERTA DE ASSIS MAIA

***SCREENING* DE UMA BIBLIOTECA DE EXPRESSÃO DE cDNA
DE CEREBELO DE RATO USANDO-SE COMO SONDA O
ANTICORPO ANTI-KM⁺
E
EXPRESSÃO DE DREBRINAS EM DISPLASIA CORTICAL
FOCAL IIB ASSOCIADA COM EPILEPSIA DE DIFÍCIL
CONTROLE MEDICAMENTOSO**

Tese de doutorado apresentada ao Departamento
de Neurologia, Psiquiatria e Psicologia Médica
da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Roberto Martins

**RIBEIRÃO PRETO
2007**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo
de Ribeirão Preto / USP

Maia, Roberta de Assis

Screening de Uma Biblioteca de Expressão de cDNA de Cerebelo de Rato Usando-se Como Sonda o Anticorpo anti-KM⁺ E Expressão de Drebrinas em Displasia Cortical Focal IIB Associada com Epilepsia de Difícil Controle Medicamentoso

Ribeirão Preto, 2007.

144 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Neurociências.

Orientador: Martins, Antonio Roberto.

1. Proteína p83. 2. Drebrinas. 3. *Screening* de Bibliotecas de Expressão. 4. Sistema Nervoso Central. 5. Displasias Corticais Focais – DCF IIB

*“...De água, de sonho, de verdade nua,
de pedra e sombra
somos ou seremos...”*

Pablo Neruda –

Fim de Festa

*Aos meus pais, Cláudio e Eda, em gratidão ao esforço imensurável que
sempre fizeram para que eu pudesse ter acesso
a uma educação de qualidade.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Antonio Roberto Martins, pela oportunidade e apoio oferecidos.

Ao Departamento de Neurologia, Psiquiatria e Psicologia Médica da FMRP/USP, Área de Neurociências, pelo suporte acadêmico.

Ao Departamento de Farmacologia da FMRP/USP, onde fica o laboratório do Prof. Dr. Antonio Roberto Martins, pela utilização da infraestrutura.

À FAPESP, pela bolsa de doutorado direto concedida sob o processo número 01/13512-2 e pelo Auxílio Regular à Pesquisa concedido ao laboratório do Prof. Dr. Antonio Roberto Martins.

Ao CNPq, CAPES e FAEPA pelo apoio financeiro concedido ao laboratório do Prof. Dr. Antonio Roberto Martins.

Aos Professores Dr. Jesus Aparecido Ferro e Dra. Sônia M. Zingaretti de Mauro, do Departamento de Tecnologia da FCAV UNESP, Jaboticabal, no BCC Center, pelo auxílio fornecido durante a elaboração e a fase inicial de desenvolvimento do projeto. A todos os funcionários e colegas do grupo, pela acolhida no laboratório, pela troca de experiência e amizade.

Ao Professor Dr. Paulo Lee Ho, do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan, São Paulo, pelo apoio profissional e pessoal fornecidos durante a fase final do projeto. A todos os funcionários e colegas do grupo, pela acolhida no laboratório, por compartilharem sua experiência e pela amizade estabelecida. À pós-doutoranda Ana Paula Areas, aos doutorandos Pricila Hauk e Henrique Ramos e aos técnicos Débora Andrade Silva e Felipe Macedo Santos pelo valioso auxílio prestado com os experimentos de produção e purificação da proteína recombinante. A Leonardo Kobashi, pelo apoio técnico com o sequenciamento de nucleotídeos.

Aos colegas do laboratório do Prof. Martins: Adriana, Alina, Ana Luisa, Bete, Carol, César, Fabíola, Liliane, Thais, Sandy, e às técnicas Ana e Diva, pela convivência ao longo desses anos. Todos vocês contribuíram de algum modo com a minha formação.

Aos queridos amigos Juca, Luana e Val, pela amizade sólida, sincera e abnegada que representa um suporte imenso a todos os aspectos de minha vida.

A toda minha família, que me ama, incentiva, apóia e respeita.

Ao meu esposo Otto, pelo apoio inestimável que me forneceu nos momentos mais críticos durante a finalização deste trabalho; pela compreensão e bom humor, incansáveis; pela dedicação e carinho inesgotáveis e pelo amor incondicional que me oferece.

INDICE

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
 PARTE I - SCREENING DE UMA BIBLIOTECA DE EXPRESSÃO DE cDNA DE CEREBELO DE RATO USANDO-SE COMO SONDA O ANTICORPO ANTI-KM⁺	
1. INTRODUÇÃO	01
1.1 Aspectos moleculares do sistema nervoso central em desenvolvimento	02
1.2 O cerebelo como modelo de ontogênese neural	03
1.3 A proteína p83 e os ligantes cerebelares da lectina KM ⁺	05
2. OBJETIVOS	10
3. MÉTODOS E TÉCNICAS EMPREGADOS	12
3.1 <i>Screening</i> da biblioteca de expressão de cDNA de cerebelo de rato (<i>Lambda zapII[®] rat cerebellum premade library, Stratagene</i>), em alto título de plaqueamento de fagos e com recuperação antigênica por cloridrato de guanidina 6M, usando-se como sonda o anticorpo anti-KM ⁺ pré-adsorvido contra proteínas de <i>E. coli</i> XL1-Blue MRF'	14
3.1.1 Pré-adsorção do anticorpo anti-KM ⁺ contra proteínas de <i>E. coli</i> XL1-Blue MRF'	14
3.1.1.1 Definição de melhor condição de estringência para uso do anticorpo anti-KM ⁺ como sonda no <i>screening</i> da biblioteca de expressão de cDNA de cerebelo de rato	14
3.1.1.2 Pré-adsorção do anticorpo anti-KM ⁺ contra proteínas de <i>E. coli</i> XL1-Blue MRF' imobilizadas em membrana de nitrocelulose (modificado a partir de Sambrook & Russell, 2001)	16
3.1.1.2.1 Verificação do sucesso da pré-adsorção do anti-KM ⁺ contra proteínas de <i>E. coli</i> XL1-Blue MRF' imobilizadas em membrana de nitrocelulose e de sua capacidade de detecção de p83	17
3.1.2 Titulação da biblioteca de expressão de cDNA de cerebelo de rato (<i>Lambda zapII[®] rat cerebellum premade library, Stratagene</i>)	18
3.1.3 Procedimento de <i>Screening</i>	18
3.1.4 Análise do clone λZAPII anti-KM ⁺ imunorreativo após excisão <i>in vivo</i> do fagomídeo pBluescript do vetor λZAPII e subclonagem em <i>E. coli</i> XL1-Blue MRF'	20
3.1.4.1 Excisão <i>in vivo</i> do fagomídeo pBluescript do vetor Lambda zapII	20

3.1.4.2 Extração de DNA plasmidial com o kit <i>Wizard Plus Minipreps DNA purification System</i> (Promega) – preparação a partir dos clones de <i>E. coli</i> XL1-Blue MRF' transformada com pBluescript excisado do clone λ ZAPII anti-KM ⁺ imunorreativo	21
3.1.4.3 Digestão com EcoRI do DNA plasmidial extraído dos clones pBluescript/ λ ZAPII anti-KM ⁺ imunorreativo – para verificação da presença do inserto	22
3.1.4.3.1 Eletroforese das digestões EcoRI em gel de agarose	23
3.1.4.4 Seqüenciamento dos clones pBluescript/ λ ZAPII anti-KM ⁺ imunorreativos.....	23
3.1.4.5 Análise das seqüências por bioinformática para identificação dos cDNAs isolados a partir do <i>screening</i> da biblioteca de expressão de cDNA de cerebelo de rato (<i>Lambda zapII[®] rat cerebellum premade library, Stratagene</i>) com o anticorpo anti-KM ⁺	24
3.2 <i>Screening</i> da biblioteca de expressão de cDNA de cerebelo de rato (<i>Lambda zapII[®] rat cerebellum premade library, Stratagene</i>) em baixo título (halos isolados) e sem recuperação antigênica, com o anticorpo anti-GFAP (Dako) pré-adsorvido contra proteínas de <i>E. coli</i> XL1-Blue MRF'	24
3.3 Verificação da correspondência entre p83 e drebrina	25
3.3.1 Análise da capacidade de detecção do anticorpo anti-drebrina contra p83 e da capacidade de detecção do anticorpo anti-KM ⁺ contra drebrina	25
3.3.2 Produção da proteína recombinante correspondente à seqüência de cDNA do clone anti-KM ⁺ imunorreativo, isolado no <i>screening</i>	25
3.3.2.1 Amplificação e subclonagem da seqüência do clone 9B para produção da proteína recombinante correspondente	26
3.3.2.2. Clonagem do fragmento amplificado a partir da seqüência do clone 9B no vetor de expressão pAE	28
3.3.2.3. Expressão da proteína recombinante (fragmento amplificado a partir da seqüência do clone 9B) em diferentes linhagens de <i>E. coli</i>	29
3.3.2.4 Purificação da proteína recombinante	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1 Limite de detecção de p83 e proteínas de <i>E. coli</i> - condição de estringência adequada para maior intensidade de marcação de p83 e menor de proteínas de <i>E. coli</i> XL1-Blue MRF', em imunodeteção cromogênica (fosfatase alcalina / NBT-BCIP) com o anticorpo anti-KM ⁺	35
4.2 Anticorpo anti-KM ⁺ pré-adsorvido contra proteínas de <i>E. coli</i> XL1-Blue MRF'....	40
4.3 Clones λ ZAPII anti-KM ⁺ imunorreativos resultantes de <i>screening</i> da biblioteca de expressão de cDNA de cerebelo de rato (<i>Lambda zapII[®] rat cerebellum premade library, Stratagene</i>)	41
4.3.1 Caracterização de clones resultantes do <i>rescreening</i> do clone λ ZAPII anti-KM ⁺ imunorreativo por excisão <i>in vivo</i> do pBluescript, transformação em XL1-Blue MRF', extração do DNA plasmidial, digestão por Eco RI e seqüenciamento	46

4.4 Capacidade de detecção do anticorpo anti-KM ⁺ contra drebrina e capacidade de detecção do anticorpo anti-drebrina (StressGen) contra p83	53
4.4.1 Imunorreatividade entre o anticorpo anti-drba e frações do processo de purificação de p83	53
4.5 Produção da proteína recombinante a partir da seqüência do clone anti-KM ⁺ imunorreativo identificado no <i>screening</i> da biblioteca de expressão de cDNA de cerebelo de rato	56
4.5.1 Fragmento amplificado a partir da seqüência do clone 9B e subclonagens realizadas	56
4.5.2 Expressão e purificação da proteína recombinante	59
5. CONCLUSÕES	63
6. ANEXOS	65
6.1 ANEXO I: Verificação da funcionalidade da biblioteca e do título de plaqueamento adequado, para <i>screening</i> usando-se anticorpos como sonda	66
6.1.1 Métodos e técnicas empregados	66
6.1.1.1 <i>Screening</i> da biblioteca de expressão de cDNA de cerebelo de rato (<i>Lambda zapII</i> [®] <i>rat cerebellum premade library</i> , Stratagene) em baixo título (halos isolados) e sem recuperação antigênica, com o anticorpo anti-GFAP (Dako) pré-adsorvido contra proteínas de <i>E. coli</i> XL1-Blue MRF'	66
6.1.1.1.1 Preparo de GFAP a partir de cerebelo de rato <i>wistar</i> , como controle positivo para o <i>screening</i> com anti-GFAP (adaptado a partir de Fukuyama, 1991)	67
6.1.1.1.2 Titulação do anticorpo anti-GFAP para detecção de GFAP a partir de preparação de proteínas do citoesqueleto de cerebelo, imobilizada em membrana de nitrocelulose Hybond C-Extra (Amersham)	67
6.1.1.1.3 Pré-adsorção do anticorpo anti-GFAP contra proteínas de <i>E. coli</i> XL1-Blue MRF' imobilizadas em membrana de nitrocelulose (modificado a partir de Sambrook & Russell, 2001)	68
6.1.1.1.3.1 Verificação do sucesso da pré-adsorção do anti-GFAP contra proteínas de <i>E. coli</i> XL1-Blue MRF' imobilizadas em membrana de nitrocelulose e de sua capacidade de detecção de GFAP	69
6.1.1.1.4 Procedimento de <i>Screening</i>	69
6.1.1.1.5 <i>Rescreening</i> de clone λ ZAPII anti-GFAP imunorreativo	69
6.1.1.1.6 Análise do clone λ ZAPII anti-GFAP imunorreativo	70
6.1.1.1.6.1 Excisão <i>in vivo</i> do fagomídeo pBluescript do vetor λ ZAPII, do clone anti-GFAP imunorreativo escolhido para análise	70
6.1.1.1.6.2 Extração de DNA plasmidial por lise alcalina com SDS em pequena escala (modificado a partir de Sambrook & Russell, 2001) – preparação a partir dos clones de <i>E. coli</i> XL1-Blue MRF' transformada com pBluescript excisado do clone λ ZAPII anti-GFAP imunorreativo	70
6.1.1.1.6.3 <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR) do cDNA dos clones pBluescript/ λ ZAPII anti-GFAP imunorreativos – para verificação da presença do	72

inserto	
6.1.1.1.6.4 Eletroforese dos produtos PCR em gel de agarose	73
6.1.1.1.6.5 Seqüenciamento dos clones pBluescript portadores de insertos	73
6.1.1.1.7 Análise das seqüências por bioinformática para identificação dos cDNAs isolados a partir do <i>screening</i> da biblioteca de expressão de cDNA de cerebelo de rato (<i>Lambda zapII[®] rat cerebellum premade library, Stratagene</i>) com o anticorpo anti-GFAP	74
6.1.2 Resultados e Discussão	74
6.1.2.1 <i>Screening</i> da biblioteca de expressão de cDNA de cerebelo de rato (<i>Lambda zapII[®] rat cerebellum premade library, Stratagene</i>) em baixo título (halos isolados) e sem recuperação antigênica, com o anticorpo anti-GFAP (Dako) pré-adsorvido contra proteínas de <i>E. coli</i> XL1-Blue MRF'	74
6.1.2.1.1 Capacidade de detecção de GFAP a partir de uma preparação de citoesqueleto com o anticorpo anti-GFAP - definição de controle positivo e título de anticorpo anti-GFAP adequado para o <i>screening</i>	75
6.1.2.2 Anticorpo anti-GFAP pré-adsorvido contra proteínas de <i>E. coli</i> XL1-Blue MRF' adequado para detecção de GFAP (fração do citoesqueleto)	77
6.1.2.3 Clones λ ZAPII anti-GFAP imunorreativos	80
6.1.2.3.1 Caracterização de clones resultantes do <i>rescreening</i> do clone λ ZAPII anti-GFAP imunorreativo por excisão <i>in vivo</i> do pBluescript, transformação em XL1-Blue MRF', extração do DNA plasmidial, PCR e seqüenciamento	84

PARTE II - EXPRESSÃO DE DREBRINAS EM DISPLASIAS CORTICAIS FOCAIS ASSOCIADAS COM EPILEPSIA DE DIFÍCIL CONTROLE MEDICAMENTOSO

1. INTRODUÇÃO	86
1.1 Drebrinas: Estrutura e Função no Sistema Nervoso Central	87
1.1.1 Descrição e identificação das principais propriedades bioquímicas	87
1.1.2 A expressão da drebrina é desenvolvimento-regulada	88
1.1.3 Atividade de ligação à actina e interação com outras proteínas ligadoras de actina	89
1.1.4 Compartimentalização subcelular da drebrina e relações funcionais	90
1.1.5 Correlação da expressão de drebrina com plasticidade sináptica	91
1.1.6 Drebrina em patologias	92
1.1.6.1 Drebrina em doença de Alzheimer	92
1.1.7 Como drebrina participa da regulação da morfogênese neuronal	93
1.1.8 Perspectivas	93
1.2 Displasias Corticais Focais	94

1.3 Drebrinas e Displasias Corticais Focais	97
2. OBJETIVOS	98
3. MÉTODOS E TÉCNICAS EMPREGADOS	100
3.1 Casuística	101
3.1.1 Tabelas	103
3.2 Recuperação Antigênica	105
3.3 Imunohistoquímica	105
3.4 Documentação das imagens	106
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	107
4.1 Caracterização histopatológica dos tecidos DCF IIB	108
4.2 Expressão de drebrina em DCF IIB	109
4.3 Figuras	115
5. CONCLUSÕES	128

PARTE I - SCREENING DE UMA BIBLIOTECA DE EXPRESSÃO DE cDNA DE CEREBELO DE RATO USANDO-SE COMO SONDA O ANTICORPO ANTI-KM⁺

E

PARTE II - EXPRESSÃO DE DREBRINAS EM DISPLASIAS CORTICAIS FOCAIS ASSOCIADAS COM EPILEPSIA DE DIFÍCIL CONTROLE MEDICAMENTOSO

7. REFERÊNCIAS	130
-----------------------------	------------

RESUMO

p83 é uma proteína com massa molecular aparente de 83 kDa, supostamente ainda não descrita, específica de sistema nervoso, e desenvolvimento regulada. p83 interage fortemente com laminina, Tau, tubulina e *heat shock protein* 90 β . p83 foi inicialmente detectada por imunohistoquímica e *western blot* usando-se um anticorpo anti-lectina KM⁺ purificado por afinidade. Sua purificação a partir de cérebro de rato está em progresso.

Identificar o envolvimento de p83 em processos do Sistema Nervoso Central humano é um passo necessário em direção à compreensão de sua função biológica. Uma biblioteca de expressão de cDNA de cerebelo de rato (Lambda ZAP II, Stratagene) foi submetida ao *screening*, usando-se um anticorpo específico para isolar o cDNA de p83. O anticorpo anti-KM⁺ foi pré-adsorvido contra proteínas de *E. coli* XL1 Blue MRF', antes de ser usado no *screening*. As membranas foram reveladas por imunodeteção cromogênica (fosfatase alcalina e NBT/BCIP). A análise de todos os clones Lambda ZAP II foi feita por excisão *in vivo* do fagomídeo pBluescript, subclonagem em *E. coli* XL1 Blue MRF', purificação do DNA plasmidial e digestão com Eco RI. A sequência correspondente ao clone isolado foi analisada usando-se ferramentas e bancos de dados do NCBI.

A sequência nucleotídica mostrou identidade com as isoformas A e E de drebrina. As isoformas A e E de drebrina foram detectadas em adulto e embrião, respectivamente. Drebrina A é uma proteína sistema nervoso-específica, desenvolvimento regulada e associa-se com F-actina. Embora drebrina e p83 compartilhem propriedades em comum, nossos dados de *western blot* indicaram que parecem não se tratar da mesma proteína.

Nós investigamos a expressão de drebrina em Displasia Cortical Focal tipo IIB, comparando com córtex normal. As secções de tecido foram coradas com hematoxilina-eosina e prata (Bielchowsky). Secções foram processadas por imunohistoquímica usando-se os anticorpos anti-drebrina M2F6 e o DAS2, e recuperação antigênica. A detecção foi feita

usando-se um anticorpo biotinizado, e DAB como cromógeno. Os tecidos displásicos (13 casos) foram obtidos cirurgicamente de tecidos exibindo epilepsia droga-resistente. Os controles foram obtidos de necrópsia de 15 pacientes sem história prévia de doenças neurológicas ou alterações patológicas.

Nossos resultados sugerem uma associação entre drebrina e DCF IIB, um distúrbio do desenvolvimento cortical.

ABSTRACT

p83 is 83 kDa protein supposedly not yet described, nervous system specific, and developmentally regulated. p83 strongly interacts with laminin, Tau, tubulin and heat shock protein 90. It was initially detected by immunohistochemistry and western blot using an affinity-purified anti-lectin KM⁺ antibody. Its purification from rat brain is in progress.

Identifying the involvement of p83 in human Central Nervous System processes is a required step towards understanding its biological roles. A premade cDNA rat cerebellum expression library (Lambda ZAP II, Stratagene) has been screened, using a specific antibody to isolate p83 cDNA. Anti-KM⁺ antibody was pre-adsorbed against *E. coli* XL1 Blue MRF' proteins, before using in screening. Membranes were revealed by chromogenic immunodetection (alkaline phosphatase and NBT/BCIP). The analysis of all positive Lambda ZAP II clones was carried out by *in vivo* excision of pBluescript, subcloning in *E. coli* XL1 Blue MRF', plasmidial DNA purification and Eco RI digestion. The sequence corresponding to the clone isolated was analyzed using the NCBI tools and database.

The nucleotide sequence showed identity with drebrin A and E isoforms. Drebrin A and E isoforms were detected in adults and embryos. Drebrin A is a neuron-specific, development-regulated F-actin-binding protein. It participates in growth cone extension and dendritic spine formation. Although have same drebrin and p83 properties in common, they not seem to be the same protein.

We have investigated the expression of drebrin in Focal Cortical Dysplasia type IIB (FCD IIB) as compared to normal cortex. Tissue sections were stained with hematoxylin-eosin and silver (Bielchowsky). Sections were processed for immunohistochemistry using anti-drebrin antibodies M2F6 and DAS2, and an antigen retrieval technique. Detection was carried out using a biotinylated antibody, using DAB as chromogen. Dysplastic tissues (13

cases) were obtained at surgery for drug-resistant epilepsy. Controls were obtained at autopsy from 15 patients without history of neurological disorder and gross pathological changes.

A specific drebrin labeling in dysplastic tissue was more intense than in controls. Indeed, most control cases exhibited at most a slightly higher staining than the background. Balloon, clear and undetermined cells, and giant, dysmorphic neurons, showed a conspicuous labeling by anti-drebrin. These cells showed a thin rim labeling of the nuclear membrane, and a finely punctate nuclear labeling. In contrast, a coarse nuclear, but a faint cytoplasm labeling was observed in autopsy cases.

Our data suggest an association between Drebrin expression and the FCD IIB, a disturbance of cortical development.

***PARTE I - SCREENING DE UMA BIBLIOTECA DE EXPRESSÃO DE cDNA DE
CEREBELO DE RATO USANDO-SE COMO SONDA O ANTICORPO ANTI-KM⁺***

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos moleculares do sistema nervoso central em desenvolvimento

O desenvolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC) envolve a coordenação de numerosos processos primários de desenvolvimento que são governados por interações celulares complexas: proliferação celular, diferenciação, adesão, migração e morte. As interações intercelulares podem levar à alterações na expressão gênica (Kuchler *et al.*, 1989; Hatten *et al.*, 1999), e na forma, movimento e função celulares (Rakic, 1990; Komuro *et al.*, 2001). As evidências disponíveis indicam que os sinais para estes processos são transduzidos no núcleo, citoesqueleto e na membrana celular por proteínas específicas da membrana ou associadas à superfície celular, envolvidas em processos de comunicação e adesão (Rakic *et al.*, 1994).

A interação proteína-proteína entre membranas celulares ou entre membrana-matriz celular é o modelo mais usado para explicar o reconhecimento e a subsequente resposta celular (Edelman, 1986). Várias proteínas participam em processos de interação celular, como por exemplo: moléculas de adesão celular (CAMs), integrinas, e outras proteínas pertencentes à superfamília das imunoglobulinas (Hynes, 1987; Rutishauser *et al.*, 1988). No SNC, em particular, existem proteínas específicas a tipos celulares distintos que desempenham papéis associados ao reconhecimento celular, como por exemplo, a astrotactina (Edmonson *et al.*, 1988; Zheng *et al.*, 1996; Fink *et al.*, 1997), necessária para a migração de neurônios granulares sobre a glia radial durante o desenvolvimento de várias estruturas encefálicas, como o cerebelo, córtex cerebral e hipocampo, entre outras (Rakic, 1971; Hatten, 1999). A interação integrina-laminina é um modelo representativo de associação entre proteínas de membrana e da matriz, envolvidas em fenômenos de adesão que são necessários para a migração celular. Recentemente, mostrou-se que a associação *in vivo* de laminina com o fator ativador do plasminogênio tissular é evento necessário para a proteólise limitada das cadeias da laminina, e este processamento proteolítico é necessário para a adesão ao substrato

(Goldfinger *et al.*, 1998). Este conjunto de proteínas se associa à integrina e a outras proteínas associadas à integrina, resultando num complexo funcional para a adesão dinâmica ao substrato. Complexos similares, incluindo proteínas do citoesqueleto (Lettorneau *et al.*, 1989) têm sido postulados nos cones de crescimento durante a neuritogênese (Vogt *et al.*, 1996; Powell *et al.*, 1998). A laminina também se liga *in vivo* com alta afinidade à proteína priônica celular (PrP^c) (Graner *et al.*, 2000), à proteína β -amilóide (Narindrasorasak *et al.*, 1992; Kibbey *et al.*, 1993) e à anfoterina (Parkinen & Rauvala, 1991; Wang *et al.*, 1999). PrP^c, proteína β -amilóide e anfoterina estão envolvidas em processos de diferenciação e formação de neuritos (Koo *et al.*, 1993; Graner *et al.*, 2000; Merenmies *et al.*, 1991). Mais recentemente, mostrou-se que outras proteínas se associam a PrP^c e formam possíveis complexos ternários com laminina (Martins *et al.*, 1997; Rieger *et al.*, 1997), cuja função ainda não está esclarecida. Alterações das proteínas PrP^c e β -amilóide estão associadas a doenças degenerativas do SNC, como a doença de Creutzfeldt-Jacob e de Alzheimer, respectivamente.

A análise de complexos macromoleculares envolvidos tanto em processos neurais normais (neuritogênese e migração neuronal, por exemplo) como em alterados (neobrotamente / neosinaptogênese, por exemplo) é uma abordagem importante para a elucidação de bases moleculares de eventos centrais para o desenvolvimento neural. Estes complexos poderiam ser o elemento comum, subjacente a processos plásticos semelhantes, que ocorrendo em etapas distintas da vida do indivíduo, apresentariam conseqüências funcionais diversas.

1.2 O cerebelo como modelo de ontogênese neural

O cerebelo em desenvolvimento é um sistema apropriado para o estudo do desenvolvimento neural (*cf.* revisões por: Altman, 1982; Rakic, 1990; Hatten, 1990; Altman & Bayer, 1997; Hatten *et al.*, 1997), devido a várias razões das quais destacamos:

- 1) seu desenvolvimento se estende por dois períodos relativamente longos, um pré- (Altman, 1978; Altman & Bayer, 1978) e outro pós-natal (Altman, 1972 a, b, c);
- 2) os tempos de origem ("*birth dates*") de populações neuronais específicas são conhecidos (Miale & Sidman, 1961; Altman, 1982), permitindo a "dissecção embriônica" de subpopulações neuronais;
- 3) a camada germinativa externa (EGL) se forma entre E17 e E21 no embrião de rato, por migração dos progenitores da célula granular em direção caudo-rostral na superfície do cerebelo (Altman, 1982);
- 4) um período de neurogênese pós-natal prolongado ocorre na camada germinativa externa, o produto da qual é, predominante (Altman, 1972a) ou totalmente (Hallonet *et al.*, 1990), a célula granular;
- 5) a migração radial do neurônio granular pós-mitótico da EGL para a camada granular (GL) é bem conhecida (Miale & Sidman, 1961; Rakic, 1971; Hatten & Liem, 1981), incluindo sua relação com a fibra de Bergmann durante a migração (Hatten, 1990);
- 6) há migração pós-natal tangencial do neurônio granular pós-mitótico localizado na zona pré-migratória da EGL (Ryder & Cepko, 1994; Komuro *et al.*, 2001);
- 7) a região de origem e o tempo de chegada ao córtex cerebelar de aferências extra-cerebelares, que incluem as fibras trepadeiras (*climbing fibers*) e musgosas (*mossy fibers*), são bem conhecidos (Altman, 1978; Mason *et al.*, 1990), permitindo a análise de seu possível papel como sinais de parada de migração, bem como a análise da diferenciação das células de Purkinje e granulares em presença e em ausência de interações sinápticas (McDonald *et al.*, 1982; Baird *et al.*, 1992);

- 8) em camundongo, há numerosas mutações de um único gene (*cf.* Caviness Jr. & Rakic, 1978; Rakic & Caviness Jr, 1995) que levam à corticogênese defeituosa;
- 9) o cerebelo é um sistema bastante apropriado para o estudo da migração celular devido ao pequeno número de tipos neuronais cerebelares, seu arranjo estereotipado e ao grande número de neurônios granulares. O uso de sistemas experimentais *in vivo* e *in vitro* permitiu identificar várias moléculas importantes na migração de células granulares ao longo de fibras gliais de Bergmann, na proliferação de progenitores neuronais e gliais e fenômenos de reconhecimento / adesão no sistema nervoso central (Hatten & Liem, 1981; Moonen *et al.*, 1982; Lindner *et al.*, 1983; Gao & Hatten, 1993; Cameron & Rakic, 1994; Fink *et al.*, 1997).

1.3 A proteína p83 e os ligantes cerebelares da lectina KM⁺

A glicoproteína KM⁺ é uma lectina vegetal com afinidade por resíduos de D(+)-manose, purificada até a homogeneidade a partir de sementes de *Artocarpus integrifolia* (*Moraceae*) (Santos-de-Oliveira *et al.*, 1994). Esta lectina atrai leucócitos por haptotaxia (Santos-de-Oliveira *et al.*, 1994; Ganiko *et al.*, 1998, 2005). A seqüência de aminoácidos desta proteína é conhecida. Ela apresenta baixa ou nenhuma identidade estrutural primária ou tridimensional com proteínas animais conhecidas, exceto por uma proteína da membrana vitelina externa de embrião de aves (Rosa *et al.*, 1999).

Estudos em nosso laboratório usando biotilil-KM⁺ como sonda, mostraram uma marcação cerebelar específica e deslocável por D(+)-manose, peroxidase de rábano e por manotriose, indicando a existência de ligantes endógenos específicos para esta lectina, no cerebelo de rato em desenvolvimento (Martins *et al.*, 1998; Teixeira *et al.*, 2004). Estes ligantes de KM⁺ foram imunolocalizados em corpo celular e dendritos primários de células de Purkinje, citoplasma de células granulares, substância branca e interneurônios da camada

molecular (Teixeira *et al.*, 2004). A análise das frações solúvel e particulada do tecido nervoso, durante a ontogênese cerebelar do rato, mostrou a presença de um conjunto discreto de glicoconjugados que ligam KM^+ , os mais conspícuos com pesos moleculares 49, 83 e 140 kDa. Extratos de cerebelo de rato em desenvolvimento contém ligantes de KM^+ que comigram com cadeias leve e pesada de laminina EHS de camundongo (Teixeira *et al.*, 2004). No córtex cerebral e hipocampo de pacientes com doença de Alzheimer, detectou-se ligantes de KM^+ em todas as estruturas caracteristicamente afetadas por esta doença, tais como placas amorfas e neuríticas, neuritos distróficos, emaranhados neurofibrilares e depósitos de amilóides perivasculares, o que os levou a sugerir o uso desta lectina para o diagnóstico neuropatológico da doença de Alzheimer (A.O. Oliveira; S. Rosemberg; L. Chimelli, L. Neder, L. Grimberg & A.R. Martins, comunicação pessoal).

Por outro lado, usando anticorpo policlonal anti- KM^+ purificado em coluna de afinidade Sepharose- KM^+ , mostramos que o cerebelo de rato adulto e em desenvolvimento expressa epitopos “ KM^+ -símile”, a julgar pela marcação específica de secções de cerebelo de rato com anti- KM^+ . Esta expressão é desenvolvimento-dependente, apresentando um máximo a partir de P10-P15 (Martins *et al.*, 1998). Estes resultados sugeriram a ocorrência de uma possível lectina cerebelar endógena e desencadearam, em nosso laboratório, a busca por esta lectina.

Usando *western blot* e anticorpo anti- KM^+ purificado por afinidade, mostramos que a proteína cerebelar reconhecida pelo anti- KM^+ é uma proteína solúvel, com expressão desenvolvimento dependente, com massa molecular aparente de 83 kDa, daí o nome **proteína p83**. As propriedades de p83 sugerem que ela não é uma lectina da família da jacalina, que inclui a KM^+ , porque não é retida em colunas de afinidade Sepharose-D(+) manose e Sepharose-D(+) galactose.

p83 foi detectada, por *western blot*, predominantemente na fração solúvel cerebelar e nas frações solúvel e particulada do cérebro de rato. p83 não foi detectada em pulmão, rim, coração, baço, fígado, estômago e sangue de rato. p83 foi detectada nos córtices cerebelar e cerebral humanos. Estes dados indicam que p83 é uma proteína tecido nervoso-específica, que ocorre no rato e no homem.

A proteína p83 da fração solúvel de cerebelo (precipitada com sulfato de amônio e pH 5.0) eluiu desde o volume de exclusão (*pool* S1) da coluna de Sephacril S300 até o valor esperado para uma proteína nativa de 83 kDa. A recromatografia do *pool* S1 reproduziu o perfil obtido para a cromatografia da fração solúvel de cerebelo, sugerindo interação de p83 com outras proteínas (M.S. Viapiano & A.R. Martins, comunicação pessoal).

Em coluna de DEAE-Sepharose FF, p83 cerebelar foi detectada em parte no eluato não retido da coluna, e em parte durante o gradiente de NaCl (0 a 1,5 M). Esse último eluato foi separado em 3 *pools*. O segundo *pool* foi cromatografado em coluna de Phenyl-Sepharose FF e p83 eluiu com água Milli Q. Esse eluato foi submetido à cromatografia em coluna de Butyl-Sepharose FF, na qual p83 eluiu também durante a eluição da coluna com água Milli Q. O eluato de p83 foi reunido, concentrado e aplicado a uma coluna de Concanavalina A-Sepharose. Nesta coluna, grande parte da proteína p83 não ficou retida. Entretanto, observou-se uma fração anti-KM⁺ imunorreativa durante a eluição com tampão de equilíbrio, e peso molecular aparente de 53 kDa. Esta fração e as frações adjacentes (os tubos anterior e posterior ao tubo correspondente a essa fração) foram concentradas e aplicadas em SDS-PAGE preparativa (18 x 17 x 0,0015 cm). A banda correspondente foi excisada e os peptídeos obtidos por hidrólise trípica “in gel” foram submetidos ao seqüenciamento por espectrometria de massa pelo Dr. Haiteng Deng, no Proteomics Resource Center, Rockefeller University.

O seqüenciamento permitiu a obtenção de 4 peptídeos que foram usados para realizar busca em bancos de dados e apresentaram identidade com a proteína predita “similar a p53-associated parkin-like cytoplasmic protein” de *Ratus norvegicus* (gi|62654698), com cobertura de seqüência: 1.7%; score 42; $p < 0.05$ (dados obtidos usando o programa Mascot da Matrix Science utilizado pelo Dr. Deng). Em 22 de junho deste ano, o gi|62654698 foi substituído pelo gi|109485713, no site do NCBI, devido ao registro do mRNA correspondente diante de evidências derivadas de EST. Há pequenas diferenças entre as duas proteínas. A proteína gi|62654698 tem massa molecular 287.771 Da, pI teórico 5.35 e é composta por 2.538 resíduos de amino-ácidos. A proteína gi|109485713, tem 2.513 resíduos de amino-ácidos, massa molecular 280.436 Da, e o mesmo pI teórico 5,35. Esta proteína foi denominada similar a “p53-associated parkin-like cytoplasmic protein”. Os peptídeos que seqüenciamos apresentaram a mesma identidade de seqüência com a segunda proteína depositada.

A proteína p83 exibe algumas propriedades comparáveis às de “p53-associated parkin-like cytoplasmic protein”: a forma nativa dessa última proteína elui em cromatografia de filtração em gel como formas moleculares ou complexos de 83, ~300 e cerca de 1.000 kDa. Em *western blot* já verificamos formas imunoreativas de 53, 83 e aproximadamente 150 kDa, para p83. A forma anti-KM⁺ imunorreativa de p83 de baixo peso molecular, 53kDa, poderia ser produto de degradação de p83, que em condições nativas teria peso molecular acima destes valores. p83 possui pI ácido, aparentemente em torno de 5,0, por precipitar próximo a este pH. Os precipitados obtidos durante a extração de p83 são extremamente difíceis de solubilizar. Entretanto, as evidências disponíveis são fracas para apoiar a identidade entre a proteína p83 e “p53-associated parkin-like cytoplasmic protein”.

O projeto inicial de doutorado foi delineado no momento da primeira tentativa de seqüenciamento de p83. Os primeiros peptídeos correspondentes a seqüências ainda não

descritas já estavam sendo identificados e embora as seqüências ainda não tivessem sido enviadas, os relatórios da Rockefeller eram animadores e esperava-se que muito em breve a seqüência completa de aminoácidos da proteína p83 fosse identificada. Nesse contexto estavam inseridas, como ainda permanecem, as questões referentes à caracterização bioquímica e molecular e ao papel biológico de p83, uma proteína aparentemente nova, sistema nervoso-específica, desenvolvimento-regulada, provavelmente associada a macromoléculas que incluem HSP90 β , tau e laminina e que parece ser biologicamente importante. Assim, o objetivo geral do projeto inicial de doutorado consistia na: **“identificação, clonagem e seqüenciamento do cDNA codificante da proteína p83 e análise da expressão de seu mRNA no sistema nervoso central de rato”**, e seria parte importante da caracterização molecular e biológica da proteína p83 pois as ferramentas e o conhecimento gerados seriam fundamentais para estudar o papel biológico da proteína p83.

***PARTE I - SCREENING DE UMA BIBLIOTECA DE EXPRESSÃO DE cDNA DE
CEREBELO DE RATO USANDO-SE COMO SONDA O ANTICORPO ANTI-KM⁺***

2. OBJETIVOS

- 2.1 Isolar o cDNA de p83 a partir de uma biblioteca de expressão de cDNA de cerebelo de rato (*Lambda zapII[®] rat cerebellum premade library, Stratagene*).
- 2.2 Obter a seqüência de nucleotídeos do cDNA de p83.
- 2.3 Estudar a expressão do mRNA de p83 nos diferentes tecidos de rato adulto por *dot blot*, *northern blot* e hibridização *in situ*.
- 2.4 Estudar a expressão regional do mRNA de p83 no SNC de rato adulto por *dot blot*, *northern blot* e hibridização *in situ*.
- 2.5 Estudar a expressão ontogenética do mRNA de p83 no cerebelo e córtex de rato por *dot blot*, *northern blot* e hibridização *in situ*.

*PARTE I - SCREENING DE UMA BIBLIOTECA DE EXPRESSÃO DE cDNA DE
CEREBELO DE RATO USANDO-SE COMO SONDA O ANTICORPO ANTI-KM⁺*

3. MÉTODOS E TÉCNICAS EMPREGADOS

Durante o período em que se tentou o *screening* da biblioteca de expressão de cDNA de cerebelo de rato por meio de *microarrays*, os experimentos foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Jesus Aparecido Aparecido Ferro e Dr.^a Sônia M. Z. Di Mauro, do Departamento de Tecnologia da FCAV/UNESP, Jaboticabal, no BCC Center. Usamos o robô Q-bot (Genetix) para fazer o *picking* dos clones (conteúdo dos halos de lise – fagos λ) a partir de placas 22.5 x 22.5 cm, arranjá-los ordenadamente em soluções estoque em placas 384, fazer réplicas para infecção da bactéria hospedeira XL1-BLUE MRF' e expressão das proteínas da biblioteca e para *gridding* das proteínas em membranas. Padronizamos a rotina do robô, trabalhando-se os limites de detecção da proteína p83. Testamos diferentes tipos de membranas (Nylon positively charged/Genetix, PVDF/Du Pont, PVDF/Amersham, Hybond C-extra/Amersham) com diferentes tratamentos, e em diferentes condições de revelação com o anticorpo anti-KM⁺ (métodos cromogênicos, quimioluminescentes, quimiofluorescentes, e radioativos).

Entretanto, a metodologia empregada no processo realizado com o robô não está aqui apresentada, por não ser relevante para a compreensão do desenvolvimento do projeto, uma vez que o método foi interrompido apenas devido a problemas mecânicos com o equipamento em questão.

Todos os equipamentos utilizados para a realização dos experimentos feitos durante o *screening* convencional da biblioteca de expressão de cDNA de cerebelo de rato foram obtidos com suporte financeiro da FAPESP ao projeto de Auxílio Regular à pesquisa “*Proteína p83: purificação, clonagem, expressão da proteína recombinante, caracterização bioquímica, molecular e biológica*”, coordenado pelo Prof. Dr. Antonio Roberto Martins, no qual esteve inserido o projeto de Doutorado. Os equipamentos dos quais não dispúnhamos foram utilizados em outros laboratórios, e estão citados no texto.

3.1 Screening da biblioteca de expressão de cDNA de cerebelo de rato (*Lambda zapII*[®] *rat cerebellum premade library*, Stratagene), em alto título de plaqueamento de fagos e com recuperação antigênica por cloridrato de guanidina 6M, usando-se como sonda o anticorpo anti-KM⁺ pré-adsorvido contra proteínas de *E. coli* XL1-Blue MRF'

3.1.1 Pré-adsorção do anticorpo anti-KM⁺ contra proteínas de *E. coli* XL1-Blue MRF'

Em *western blot* das frações solúvel e particulada do lisado de *E. coli* XL1-Blue MRF' usando-se o anticorpo anti-KM⁺, verificou-se que o mesmo reconhece uma série de proteínas da bactéria. Nesse experimento preliminar usou-se como tampão de lavagem, o tampão Na₂HPO₄ 20 mM pH 7.5 contendo NaCl 150 mM e Triton X-100 0,1% (v/v), uma condição, relativamente, pouco estrigente. Para que o anticorpo anti-KM⁺ pudesse ser usado como sonda no *screening* da biblioteca de expressão de cDNA de cerebelo de rato, trabalhou-se com a estringência do processo de imunodeteção para se obter menor detecção de proteínas de *E. coli* XL1-Blue MRF' e maior detecção de p83. Entretanto, mesmo depois de definida a condição de melhor estringência, foi necessário pré-adsorver o anticorpo anti-KM⁺ contra proteínas de *E. coli* e retitulá-lo para detecção de p83, antes que pudesse ser usado no *screening* da biblioteca de expressão de cDNA de cerebelo de rato.

3.1.1.1 Definição de melhor condição de estringência para uso do anticorpo anti-KM⁺ como sonda no *screening* da biblioteca de expressão de cDNA de cerebelo de rato

A partir da condição anteriormente testada para imunodeteção cromogênica de p83 e proteínas de *E. coli* XL1-Blue MRF', onde se usou, como tampão de lavagem, o tampão Na₂HPO₄ 20 mM pH 7.5 contendo NaCl 150 mM e Triton X-100 0,1% (v/v), comparou-se outras condições de estringência, alterando-se as concentrações de NaCl e Triton, no tampão. Primeiro comparou-se diferentes concentrações de NaCl, a saber: 150 mM, 250 mM, 350 mM

e 450 mM, mantendo-se a concentração de 20 mM de Na₂HPO₄ (pH 7.5) e 0,1% (v/v) de Triton X-100. Então, para as concentrações de NaCl em que p83 foi detectável e as proteínas de *E. coli* exibiram sinal menos intenso, variou-se a proporção de Triton X-100: 0,1%, 0,2% e 0,3%. Os protocolos de preparo do lisado de *E. coli*, eletroforese, eletrotransferência e imunodeteção cromogênica de p83 e proteínas de *E. coli* estão descritos a seguir.

Preparou-se lisado de *E. coli* XL1-Blue MRF' (Sambrook & Russell, 2001), a partir de uma cultura da bactéria em 100 ml de meio de cultura líquido, LB-tetraciclina. A cultura foi incubada a 37°C em agitação até saturação do meio (~ 20 horas). Coletaram-se as células por centrifugação a 5000g por 10'. Ressuspendeu-se as células em 3 ml de tampão de ressuspensão celular [tampão Tris-HCl 50 mM pH 8.0 contendo EDTA 10 mM]. Congelou-se (5' a -80°C) e descongelou-se (placa aquecedora a 25°C) várias vezes a suspensão. Sonicou-se a mesma, à força máxima por 6 períodos de 20" a 0°C (sonicador Kinematica, Polytron). Centrifugou-se o extrato à velocidade máxima durante 10' a 4°C em microcentrífuga (Eppendorf Bioreserch, 5415R). Recuperou-se o sobrenadante, que foi transferido para novo tubo. O lisado foi estocado a -20°C até o momento de uso. Os *pellets* também foram ressuspendidos em H₂O Milli-Q e estocados a -20°C por curto período de tempo.

Após dosagem de proteínas (Lowry *et al.*, 1955), as amostras foram diluídas (4:1) em tampão de Laemmli [tampão Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 contendo 10% sacarose (p/v), 10% SDS (p/v) e 3.6 M β-mercaptoetanol] e fervidas durante 5'. Aplicou-se uma massa de 50 µg de cada amostra (frações solúvel e particulada do lisado de *E. coli*) em gel de poliacrilamida em gradiente de 6 a 20%. A eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970; Laemmli *et al.*, 1973) foi feita a uma corrente constante de 2.5 mA/cm. Tampão de corrida: Tris-HCl 25 mM pH 8.3 contendo glicina 190mM e SDS 0,1% (p/v). As proteínas foram eletrotransferidas do gel para membrana de nitrocelulose (Towbin *et al.*, 1979) sob

voltagem constante de 35V/gel durante 3h e 30' em tampão de transferência: Tris-HCl 25 mM pH 8.3, contendo glicina 190 mM, SDS 0,1% (p/v) e etanol 20%.

As membranas foram submetidas à imunodeteção cromogênica (fosfatase alcalina e NBT/BCIP) de acordo com protocolos desenvolvidos a partir de métodos convencionais para *western blot* (Burnette, 1981; Harlow, 1999). Bloqueio: 16 horas a 4°C ou 4 horas à temperatura ambiente em tampão de bloqueio (leite 2,5% em tampão de lavagem). Anticorpo primário (IgG coelho anti-KM⁺ 1:1000, em tampão de bloqueio): 4 horas à temperatura ambiente ou 16 horas a 4°C. Lavagem: 3 x 10' em tampão de lavagem. Anticorpo secundário [IgG de cabra anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (Promega) 1:3000 em tampão de bloqueio]: Uma hora à temperatura ambiente. Lavagem: 2 x 10' em tampão de lavagem e 3 x 5' em tampão Tris-HCl 100 mM pH 9.0 contendo NaCl 150 mM e MgCl₂ 1mM (tampão AP). Revelação: de acordo com as instruções do *Kit BCIP/NBT (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/Nitro blue tetrazolium) Color Development Substrate*, Promega.

A condição de estrigência selecionada através dos experimentos descritos neste item (ver item 4.1, em resultados), foi usada em todas as demais imunodeteções com o anti-KM⁺ realizadas durante o *screening* da biblioteca de expressão.

3.1.1.2 Pré-adsorção do anticorpo anti-KM⁺ contra proteínas de *E. coli* XL1-Blue MRF' imobilizadas em membrana de nitrocelulose (modificado a partir de Sambrook & Russell, 2001)

Desenvolveu-se um método para pré-adsorção contra proteínas imobilizadas em membranas de nitrocelulose Hybond C-Extra (Amersham Biosciences), a partir da adaptação de metodologia pré-existente para pré-adsorção de anticorpos contra proteínas de *E. coli* em solução (Sambrook & Russell, 2001).

Prepararam-se as proteínas das frações solúvel e particulada de lisado de *E. coli* XL1-Blue MRF'. A eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) e a eletrotransferência das proteínas do gel para membrana de nitrocelulose foram feitas como citado no item 1.1.1.

Para cada 50 µg de fração solúvel e 50 µg de fração particulada (cada amostra correspondente a uma canaleta do gel) pré-adsorveu-se 1 ml de anti-KM⁺, de acordo com o protocolo a seguir:

- Incubou-se as membranas por uma hora à temperatura ambiente em tampão de bloqueio [leite 2,5% em Na₂HPO₄ 20 mM pH 7.5 contendo NaCl 250 mM e Triton X-100 0,1% (v/v)]
- Lavou-se por 1' em Na₂HPO₄ 20 mM pH 7.5 contendo NaCl 250 mM e Triton X-100 0,1% (v/v)]
- Incubou-se com o anti-KM⁺ diluído 1:100 em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7.5 contendo NaCl 150 mM e soroalbumina bovina 3%, durante duas horas à temperatura ambiente
- O anti-KM⁺ foi recuperado e mantido a 4°C até momento de uso

3.1.1.2.1 Verificação do sucesso da pré-adsorção do anticorpo anti-KM⁺ contra proteínas de *E. coli* XL1-Blue MRF' imobilizadas em membrana de nitrocelulose e de sua capacidade de detecção de p83

Fez-se diluições do anti-KM⁺ pré-adsorvido para uma concentração final (a partir da alíquota original) de 1:1000 e 1:500 (em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7.5 contendo 150 mM de NaCl e soroalbumina bovina 1 µg/µl). As alíquotas diluídas foram utilizadas como anticorpo primário para imunodeteccção cromogênica (fosfatase alcalina/NBT-BCIP; como descrito no item 1.1.1) de p83 e de proteínas de *E. coli* XL1-Blue MRF', submetidas à eletroforese e eletrotransferência para membranas de nitrocelulose (como citado no item

1.1.1). Utilizou-se como anticorpo secundário: IgG de cabra anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (Promega) 1:3000 em tampão de bloqueio.

3.1.2 Titulação da biblioteca de expressão de cDNA de cerebelo de rato (*Lambda zapII*[®] *rat cerebellum premade library*, Stratagene)

A biblioteca foi titulada de acordo com instruções do fabricante.

3.1.3 Procedimento de *Screening*

Para preparo da bactéria hospedeira, plaqueamento, indução da expressão com IPTG, e obtenção das membranas, utilizaram-se os protocolos sugeridos pelo fabricante, com algumas adaptações.

Para o plaqueamento dos fagos, a Stratagene recomenda o uso de 50000 pfu (*plaque-forming units*) para placas de 150 mm, e recomenda o uso de um total de 20 placas, justificando que este grande número inicial de halos de lise aumentaria a representatividade da biblioteca. Assim, inicialmente, usou-se 200000 pfu para cada placa grande. Utilizaram-se placas grandes (22.5 x 22.5 cm) para melhor aproveitamento da área e economia de anticorpo. Usaram-se seis placas com este título para analisar um total de 1200000 clones por vez.

Para a indução da expressão, variou-se a concentração de IPTG e testaram-se diferentes períodos de incubação.

Mesmo após testar diversas condições, as primeiras tentativas de *screening* não foram bem sucedidas. Então, testaram-se tratamentos que pudessem expor epitopos possivelmente não disponíveis para ligação com o anti-KM⁺, antes da imunodeteção. Fizeram-se testes com uma fração do processo de purificação de p83 a partir de cerebelo de rato, eletrotransferida para membranas de nitrocelulose Hybond C-extra após SDS-PAGE (como citado no item 1.1.1). Compararam-se os tratamentos entre si e entre membranas não tratadas.

Antes de submeter as membranas aos tratamentos de recuperação antigênica, foi necessário fixar as proteínas, pois os tratamentos poderiam desfazer as ligações entre as proteínas e as membranas. Testaram-se dois fixadores diferentes: paraformaldeído 4% e glutaraldeído 0,2%. O uso de fixadores aldeídicos partiu de protocolos desenvolvidos em nosso laboratório para fixação de proteínas em tecidos e em membranas, adaptados a partir de trabalhos como o de Espíndola *et al.* (2000).

Com cada um dos fixadores utilizaram-se três métodos diferentes de recuperação antigênica: um com cloridrato de guanidina 6M, outro com deoxicolato de sódio 0,5% e nonidet P-40 0,5%, e um terceiro com uréia 5%. Os tratamentos de recuperação antigênica foram desenvolvidos a partir das seguintes publicações: Marston *et al.* (1990); Rudolph *et al.* (1997); Hagel *et al.* (1971); Taraboulos *et al.* (1992); Martins *et al.* (1999); Clark *et al.* (1999).

Os tratamentos foram comparados a partir dos valores de absorbância integrada, obtidos a partir do processamento da densidade óptica integrada, medida com o programa Gel-Pro Analyzer (Copyright Media Cybernetics 1993-97). O melhor método (fixação com paraformaldeído 4% e recuperação antigênica com cloridrato de guanidina 6M) foi adotado para os *screenings* seguintes.

Assim, após o *plaque lifting* para membranas de nitrocelulose Hybond C-extra, as mesmas foram incubadas durante 15' em tampão Na_2HPO_4 0,1 M pH 7.4 contendo paraformaldeído 4% (p/v), lavadas durante 5' por 3 vezes em água MilliQ, incubadas 30' em tampão Tris 0,1 M pH 7,45 contendo glicina 50 mM, e finalmente lavadas em água MilliQ. Após a fixação, as membranas foram incubadas por duas horas a 25°C em tampão Tris-HCl 100 mM pH 8.0 contendo cloridrato de guanidina 6M, DTT 100 mM e EDTA 1mM, para tratamento de recuperação antigênica. Após a incubação as membranas foram lavadas em água MilliQ, durante 10' por 3 vezes.

Após recuperação antigênica as membranas foram submetidas à imunodeteção cromogênica com o anticorpo anti-KM⁺, pré-adsorvido contra proteínas de *E. coli* (protocolo descrito no item 1.1.1).

Os clones que exibiram sinal imunorreativo, foram retirados das placas com uma área de segurança em volta (~0,5 cm de diâmetro). O fragmento de top ágar correspondente a cada clone foi colocado separadamente em tubos de microcentrífuga em 500 µl de tampão SM [5.8 g de NaCl, 2 g de MgSO₄.H₂O, 50 ml de 1M Tris-HCl (pH 7.5), 5 ml de 2% gelatina (p/v) e H₂O deionizada q.s.p. 1L] contendo clorofórmio 5% (v/v). Cada tubo foi agitado em *vortex* por 30" para permitir a liberação das partículas do fago no tampão SM. Os tubos foram incubados a 4°C durante dezesseis horas, antes de serem utilizados. Adicionou-se dimetilsulfóxido (DMSO) para uma concentração final de 7% e estocou-se os clones a -80°C.

Para o *rescreening*, inicialmente seguiram-se as mesmas condições definidas para o *screening*. Posteriormente, o *rescreening* foi repetido utilizando-se as condições definidas no *screening* da biblioteca de expressão de cDNA de cerebelo de rato utilizando-se o anticorpo anti-GFAP como sonda.

3.1.4 Análise do clone λZAPII anti-KM⁺ imunorreativo após excisão *in vivo* do fagomídeo pBluescript do vetor λZAPII e subclonagem em *E. coli* XL1-Blue MRF'

Dos clones replaqueados durante o *rescreening*, cinco foram utilizados para essa análise.

3.1.4.1 Excisão *in vivo* do fagomídeo pBluescript do vetor Lambda zapII

- Inóculo *over night* de uma colônia isolada de XL1 Blue MRF' a 37°C e 185 rpm (*Shaker* Mod. CH-4103 Minitron, INFORS HT, Departamento de Biologia Celular e Molecular, FMRP-USP)

- Diluição em meio LB suplementado com 0,2% maltose e MgSO₄ 10 mM e incubação a 37°C e 185 rpm até OD₆₀₀=1.0
- Centrifugação a 2000 rpm por 10' para coletar células
- Lavagem das células em MgSO₄ 10 mM
- Centrifugação a 2000 rpm por 10' e ressuspensão em MgSO₄ 10 mM
- Incubação a 37°C por 15': 1µl do *helper phage* em 200µl das células de XL1-Blue MRF' a OD₆₀₀=1.0 e 200 µl do fago (halo de lise) estocado no tampão SM. Usou-se o *helper phage* VCM13, para recuperação de DNA fita simples (usado para seqüenciamento), ou o *helper phage* ExAssist, para recuperação de DNA fita dupla
- Adição de 5 ml de meio LB suplementado com MgSO₄ 10 mM e 0,2% maltose e incubação a 37°C e 185 rpm, durante 16 horas
- Incubação a 70°C por 20'
- Centrifugação a 1000 g por 5' e transferência do sobrenadante para novo tubo (de polipropileno, estéril).
- Adição de 200µl do excisado a 200µl de *E. coli* XL1-Blue MRF' a OD₆₀₀=1.0 lavadas em MgSO₄ 10 mM e incubação a 37°C por 15', para a excisão com VCM13. Adição de *E. coli* SOLR, nas mesmas condições, para a excisão com ExAssist
- Plaqueamento em LB-ampicilina (10mg/ml)
- Incubação a 37°C por 16 horas

3.1.4.2 Extração de DNA plasmidial com o kit *Wizard Plus Minipreps DNA purification System* (Promega) – preparação a partir dos clones de *E. coli* XL1-Blue MRF' transformada com pBluescript excisado do clone λZAPII anti-KM⁺ imunorreativo

A partir de cada uma das cinco excisões, coletou-se dois clones de bactérias transformadas com o pBluescript excisado. Portanto prosseguiu-se com 10 clones. A extração de DNA plasmidial foi feita com o kit *Wizard SV Miniprep* (Promega), de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante.

3.1.4.3 Digestão com EcoRI do DNA plasmidial extraído dos clones pBluescript/ λ ZAPII anti-KM⁺ imunorreativo – para verificação da presença do inserto

Usou-se digestão com Eco RI (enzima que flanqueia o inserto no sítio múltiplo de clonagem do vetor pBluescript) para verificar o tamanho dos fragmentos correspondentes ao vetor e aos insertos.

Protocolo descrito a seguir. Adaptado a partir das instruções do fabricante, InvitrogenTM Life Technologies.

Reação para cada tubo:

- 10% do volume final de Tampão React[®] 3 [10X]
- 1 μ l de Eco RI
- 2 μ l de amostra de DNA
- q.s.p. 20 μ l de H₂O MilliQ
- Incubação a 37°C durante 3 horas

Como foi feita mais de uma reação, preparou-se uma mistura com a quantidade de reagentes suficiente para o número de amostras analisadas, sem se colocar a amostra de DNA. Colocou-se 18 μ l da mistura de reagentes em cada tubo e acrescentou-se 2,0 μ l de uma amostra diferente de DNA a cada um.

3.1.4.3.1 Eletroforese das digestões EcoRI em gel de agarose

As amostras submetidas à digestão com Eco RI foram acrescidas de 10% (v/v) de tampão de amostra para DNA (solução estoque [10X]: EDTA 50 mM pH 8.0 contendo glicerol 30%, SDS 0,6% e azul de bromofenol 0,42% em H₂O) e aplicadas em gel de agarose 1% em tampão TAE (40 mM Tris-acetato contendo 1 mM EDTA) com 0,5µg/ml de brometo de etídeo (v/v). Usou-se os marcadores de peso molecular de DNA de 100 e 500 pares de bases, da Invitrogen™ Life Technologies. Os mesmos foram preparados como indicado pelo fabricante. Aplicou-se 0,8 µg de cada marcador. A eletroforese foi feita a uma corrente constante de 80V (cubas para eletroforese horizontal: Hoefer HE 99X e GNA 100, Amersham; fonte: EPS 301, Amersham). O gel foi exposto à luz ultravioleta em transiluminador (MacroVue UV-25 Hoefer, Amersham) para visualização e documentação. As imagens digitais do gel foram obtidas com o aparelho EDAS da Kodac (equipamento pertencente ao Departamento de Biologia Celular e Molecular, FMRP-USP).

Após confirmação do peso molecular do vetor e observação de insertos de tamanhos diferentes, todos os clones foram submetidos ao seqüenciamento.

3.1.4.4 Seqüenciamento dos clones pBluescript/λZAPII anti-KM⁺ imunorreativos

O material encaminhado ao seqüenciamento foram os plasmídeos extraídos a partir dos clones de *E. coli* XL1-Blue MRF' transformada com pBluescript excisado de clones λZAPII anti-KM⁺ imunorreativos (resultantes do *re-screening* do clone λZAPII anti-KM⁺ imunorreativo identificado).

Fez-se seqüenciamento por eletroforese de capilaridade no seqüenciador ABI3100 (Applied Biosystems), usando-se o kit Big-dye terminator 3.0 (Applied Biosystems). As reações foram preparadas de acordo com instruções do fabricante. Usou-se o *Primer* M13 nas direções direta e indireta de leitura (*primers forward e reverse*).

As reações de seqüenciamento foram feitas no laboratório do Prof. Paulo Lee Ho, no Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan, em São Paulo - SP.

3.1.4.5 Análise das seqüências por bioinformática para identificação dos cDNAs isolados a partir do *screening* da biblioteca de expressão de cDNA de cerebelo de rato (*Lambda zapII*[®] *rat cerebellum premade library*, Stratagene) com o anticorpo anti-KM⁺

As seqüências foram comparadas com as depositadas em bancos de dados do *National Institute of Health* (NIH) e foram analisadas com diversos recursos de bioinformática disponíveis em sites gratuitos:

- ferramentas do *software* de bioinformática do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
- ferramentas do *European Bioinformatics Institute*: www.ebi.ac.uk/clustaw
- recursos disponibilizados no servidor da FMRP-USP: morpheus.fmrp.usp.br
- ferramentas “*the sequence manipulation suite*” da *Bioinformatics Organization*: <http://www.bioinformatics.org/sms>
- Ferramentas do servidor de proteômica *Expert Protein Analysis System* (ExPASy) do *Swiss Institute of Bioinformatics*: <http://ca.expasy.org/>

O Professor Dr. Paulo Lee Ho, do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan, gentilmente orientou os estudos de análise da seqüência por bioinformática e contribuiu com sua interpretação.

3.2 *Screening* da biblioteca de expressão de cDNA de cerebelo de rato (*Lambda zapII*[®] *rat cerebellum premade library*, Stratagene), em baixo título de plaqueamento de fagos e sem recuperação antigênica, usando-se como sonda o anticorpo anti-KM⁺ pré-adsorvido contra proteínas de *E. coli* XL1-Blue MRF’

Após a observação dos resultados obtidos no *screening* com o anticorpo anti-GFAP (ver anexos, item 6, repetiu-se o *screening* da biblioteca com o anticorpo anti-KM⁺ nas mesmas condições: clones isolados (4000pfu/placa) e 10 placas de 22.5 x 22.5 cm.

3.3 Verificação da correspondência entre p83 e drebrina

Constatamos identidade de seqüência nucleotídica entre o cDNA de um dos clones anti-KM⁺ imunorreativos obtidos e o cDNA da drebrina. Esse dado, associado a algumas propriedades exibidas pelas duas proteínas, sugeriu possível equivalência entre p83 e drebrina. Definimos estratégias para avaliar se p83 poderia corresponder à drebrina. Essa informação seria importante para conduzir os passos seguintes em direção à obtenção da seqüência nucleotídica completa do cDNA de p83.

3.3.1 Análise da capacidade de detecção do anticorpo anti-drebrina contra p83 e da capacidade de detecção do anticorpo anti-KM⁺ contra drebrina

Verificamos a imunoreatividade de p83 com um anticorpo comercial anti-drebrina por *western blot*, a partir de fração purificada de p83 submetida à SDS-PAGE.

Utilizamos frações do processo de purificação de p83 a partir de cérebro e cerebelo de rato. O anticorpo anti-drebrina (StressGen) que utilizamos é um anticorpo monoclonal (NBA-110) que reconhece as isoformas A e E de drebrina, em rato, camundongo, coelho e humanos.

Verificamos ainda, também por *western blot*, a capacidade de imunodeteção do anticorpo anti-KM⁺ a partir de homogeneizado total para processo de purificação de drebrina (Shirao & Obata, 1986), submetida à SDS-PAGE.

3.3.2 Produção da proteína recombinante correspondente à seqüência de cDNA do clone anti-KM⁺ imunorreativo, isolado no *screening*

Realizamos todos os experimentos necessários para esta etapa, no laboratório do Professor Paulo Lee Ho, Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan. Portanto, todos os equipamentos utilizados no período foram do referido laboratório.

3.3.2.1 Amplificação e subclonagem da seqüência do clone 9B para produção da proteína recombinante correspondente

O fragmento foi amplificado por PCR (polymerase chain reaction). Os oligonucleotídeos para a amplificação do fragmento foram desenhados a partir da seqüência de interesse, utilizando-se o programa Generunner.

Foram usados os seguintes oligonucleotídeos para a reação:

Forward: 5'-CCCCTCGAGCCGAGTCCACCTAGCTCCAAGTCC-3'

XhoI

Reverse: 5'-CCAAGCTTGAACACTACGTTACCGTGGCAACCC-3'

HindIII

Utilizou-se reagentes para PCR do kit que acompanha a Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen™ Life Technologies). A reação utilizada foi adaptada a partir do protocolo sugerido pelo fabricante e a partir de protocolos de Sambrook & Russell (2001).

Reação por tubo:

- 5 µl de 10X PCR buffer
- 2 µl de MgSO₄ 50 mM
- 1 µl de dNTP mix 10 mM
- 1 µl de cada oligonucleotídeo a 20 pmol/µl
- 2 µl de Platinum[®] Taq DNA Polymerase

- 1 µl de DNA template (alíquota estoque do clone 9B, retirado do alo de lise da placa de screening, em tampão SM)
- q.s.p. 50 µl de H₂O MilliQ

O termociclador utilizado foi o MJ Research.

Programa de ciclagem:

- 1) 95°C, 01' (denaturação inicial)
- 2) 94°C, 01' (denaturação)
- 3) 55°C, 01' (pareamento)
- 4) 72°C, 10' (extensão). CICLAGEM: repetição dos passos 2 a 4 por 34 vezes.
- 5) 72°C, 5' (extrusão)

Observação: a temperatura da placa superior do termociclador foi mantida a 103°C, para impedir a evaporação dos reagentes da PCR contidos nos tubos e evitar o uso de óleo mineral.

O produto PCR foi acrescido de 10% (v/v) de tampão de amostra para DNA (solução estoque [10X]: EDTA 50 mM pH 8.0 contendo glicerol 30%, SDS 0,6% e azul de bromofenol 0,42% em H₂O) e aplicadas em gel de agarose 0,8% em tampão TAE [40 mM Tris-acetato contendo 1 mM EDTA] com 0,5µg/ml de brometo de etídeo (v/v). Usou-se, como marcador de peso molecular de DNA, λHindIII, da InvitrogenTM Life Technologies, preparado como indicado pelo fabricante. Aplicou-se 0,8 µg do marcador. A eletroforese foi feita a uma corrente constante de 90V (cubas para eletroforese horizontal: Hoefer HE 99X e GNA 100, Amersham; fonte: EPS 301, Amersham). O gel foi exposto à luz ultravioleta em transiluminador, para visualização e obtenção das imagens digitais, no aparelho Eagle Eye (Stratagene).

As bandas correspondentes aos insertos foram excisadas do gel com o auxílio de uma lâmina de bisturi e colocadas em tubos de microcentrífuga com capacidade para 1,5 ml. Os tubos foram colocados a 70°C durante 10' para derretimento da agarose. A agarose fundida

foi imediatamente submetida à purificação do produto PCR. Utilizou-se para purificação da banda o “GFX™ PCR DNA and GEL Band Purification Kit” (Amersham Biosciences).

Para confirmação da seqüência nucleotídica do fragmento amplificado por PCR, o mesmo foi subclonado no vetor pGEM-T conforme instruções do fabricante, e após extração do DNA plasmidial, foi submetido ao seqüenciamento.

Depois de confirmados o tamanho do fragmento e a seqüência nucleotídica esperados, prosseguiu-se à etapa de clonagem no vetor de expressão pAE.

3.3.2.2. Clonagem do fragmento amplificado a partir da seqüência do clone 9B no vetor de expressão pAE

Para a clonagem no vetor de expressão, o fragmento obtido a partir da PCR foi separado do vetor de subclonagem por meio de digestões com enzimas de restrição (XhoI e HindIII, cujos sítios foram adicionados por PCR). As digestões foram novamente submetidas à eletroforese, as bandas correspondentes ao fragmento foram excisadas e o DNA purificado a partir da agarose. Esse DNA purificado foi utilizado para ligação no vetor pAE.

Para a reação de ligação do fragmento no vetor pAE foi utilizado um volume final de 20 µl de reação. Foram usados 50 ng de vetor (1vetor : 1inserto), T4 DNA ligase, Tampão T4 DNA Ligase 1X e água e a mistura foi incubada a 16°C por 16 horas.

Bactérias competentes *E. coli* DH5α foram transformadas com o produto da ligação. Para a transformação, adicionou-se 5 µl do produto da reação de ligação a 50 µl de bactérias competentes *E. coli* DH5α. A mistura foi incubada em gelo por 30 minutos e em seguida submetida a choque térmico de 42°C por 2 minutos. Novamente incubou-se a bactéria contendo o plasmídeo em gelo por 5 minutos. Adicionaram-se 300 µl de meio 2YT e deixou-se incubando a 37°C por 50 minutos. O volume total dessa mistura foi dividido e plaqueada

em meio sólido (2YT-ágar) contendo 100 µg/ml de ampicilina. As placas contendo as bactérias com plasmídeo foram incubadas por 16 horas a 37°C.

Os clones transformantes foram selecionados com ampicilina. Fez-se pré-inóculos dos transformantes em meio 2YT, contendo ampicilina, e selecionou-se os clones positivos comparando-se o tamanho dos fragmentos obtidos, após extração do DNA plasmidial com fenol-clorofórmio (Beuken *et al.*, 1998), com fragmentos obtidos de bactérias transformadas apenas com pAE vazio. Para essa análise por fenol-clorofórmio, retirou-se uma alíquota de 200 µl da cultura pré-inoculada e incubada a 37°C por 16 horas. Centrifugou-se por 4 minutos a 12.000 rpm e descartou-se o meio de cultura. Adicionou-se ao *pellet* 40 µl de Ficoll Dye 2X, 15 µl de uma solução de fenol:clorofórmio a 1:1 (v/v). A mistura foi agitada por 1 minuto em *vortex* e em seguida centrifugada por 1 minuto a 12.000 rpm. Aplicou-se 10µl do sobrenadante da mistura (contendo DNA genômico, DNA plasmidial e RNA) em gel de agarose a 1,5%.

Os plasmídeos dos clones escolhidos foram purificados com o kit “Concert Rapid Plasmid Purification” (Gibco BRL) de acordo com as instruções do fabricante.

3.3.2.3. Expressão da proteína recombinante (fragmento amplificado a partir da seqüência do clone 9B) em diferentes linhagens de *E. coli*

A linhagem *E. coli* BL21(SI) induzível por NaCl (Bhandari *et al.*, 1997) possui promotor da T7 RNA polimerase sob ação do promotor responsivo a osmolaridade, promotor proU de *E. coli*. Utilizou-se primeiramente essa linhagem porque as proteínas são expressas pela mesma sob indução de NaCl, de mais baixo custo que IPTG, indutor para as outras linhagens disponíveis no laboratório.

Bactérias competentes *E. coli* BL21-(SI) foram transformadas com o plasmídeo (pAE / fragmento 9B amplificado por PCR). Para a transformação seguiu-se o mesmo procedimento

utilizado para a *E. coli* DH5 α , exceto pela temperatura de incubação, que foi de 30°C, e pela omissão de NaCl nos meios de cultura. As transformações foram repetidas três vezes, porque não se obteve clones transformantes nas placas. Mesmo após a produção de novas bactérias competentes *E. coli* BL21 (SI), as transformações, novamente, não funcionaram. Assim, partiu-se ao uso de outras linhagens de bactérias.

A linhagem utilizada em seguida foi *E. coli* BL21-(DE3)-Star-pLYS, induzível por IPTG. Para a transformação seguiu-se o mesmo procedimento utilizado para a *E. coli* DH5 α , exceto pela seleção, que neste caso deve ser feita com ampicilina e cloranfenicol. Colônias de transformantes foram inoculadas em 5 ml de meio 2YT, contendo 100 μ g/ml de ampicilina e 30 μ g/ml de cloranfenicol, e incubadas a 37°C por 16 horas, sob agitação. As culturas crescidas durante a noite foram diluídas a 1:30 (v/v) para 100 ml de volume final. As diluições foram incubadas a 37°C sob agitação, até atingir OD₆₀₀=0,6 (aproximadamente 3 horas de incubação).

Quando as diluições atingiram OD₆₀₀=0,6, adicionou-se o indutor da expressão, IPTG a 1,2 mM, às culturas em crescimento e manteve-se a incubação sob agitação a 37°C. Testou-se diferentes tempos de indução da expressão, a saber: 2 horas, 4 horas, 6 horas e 16 horas. Fez-se alíquotas de 1 ml de cada cultura não induzida, antes de se adicionar o indutor, e também após cada tempo de indução da expressão. As alíquotas foram centrifugadas e preparou-se o *pellet* para SDS-PAGE.

Após análise por SDS-PAGE, selecionou-se 2 clones e repetiu-se todo o procedimento em larga escala: Os pré-inóculos foram feitos num volume de 100 ml e a diluição no dia seguinte foi feita para um volume final de 1 litro.

A cultura de 1 litro de células foi centrifugada por 10 minutos a 5000 rpm e o precipitado bacteriano obtido foi ressuscitado com 100 ml de tampão PBS 1X, agitado vigorosamente até a homogeneização, e imediatamente congelado a -20°C. A etapa de

congelamento facilita o rompimento das células bacterianas. Após o descongelamento, a mistura foi lisada por pressão no French Pressure[®]. Separaram-se as frações solúvel e particulada do lisado bacteriano, por centrifugação. Prepararam-se ambas para purificação das proteínas, já que não se sabia previamente se a proteína recombinante em questão seria expressa em *E. coli* como proteína solúvel ou em corpúsculos de inclusão.

A fração solúvel foi filtrada em filtro 3M e imediatamente submetida à purificação das proteínas. A fração particulada, na qual estão presentes os corpúsculos de inclusão, foi tratada para lavagem e solubilização das proteínas insolúveis presentes nos mesmos, com soluções 1M e 8M uréia, respectivamente. Após o tratamento, a fração particulada foi também submetida à purificação.

Como não se obteve produção de proteína recombinante com a linhagem de *E. coli* BL21-(DE3)-Star-pLYS, usou-se, também, para tentativa de expressão da proteína recombinante, a *E. coli* BL21-CodonPlus-(DE3)-RP. Esta linhagem contém códons restritivos para *E. coli*. Decidiu-se utilizar essa linhagem porque depois de várias tentativas não sucedidas de expressar a proteína recombinante em linhagens que usualmente produzem proteínas recombinante com grande rendimento, verificamos que a seqüência do fragmento amplificado a partir da seqüência do clone 9B possui número considerável de códons restritivos para *E. coli*, o que pode impedir que a proteína recombinante seja expressa adequadamente.

A *E. coli* BL21-CodonPlus-(DE3)-RP contém cópias extras de genes *argU* (códons AGA e AGG) e *proL* (códon CCC). Estes genes codificam RNAs transportadores que restringem mais frequentemente a tradução de proteínas heterólogas de organismos com genomas ricos em GC. A seqüência nucleotídica do clone 9B, que foi amplificada por PCR para ser expressa como proteína recombinante apresenta uma frequência alta desses códons, especialmente os que codificam para prolina.

Todo o procedimento de transformação, indução da expressão com IPTG em pequena escala, escolha dos clones para indução em larga escala e preparo das frações solúvel e particulada do lisado bacteriano para purificação das proteínas solúveis e insolúveis, foi feito como descrito acima para as outras linhagens de bactéria utilizadas.

3.3.2.4 Purificação da Proteína Recombinante

Purificação a partir da fração solúvel:

A fração solúvel filtrada em papel 3M foi adsorvida pela coluna de Ni²⁺-sepharose (Amersham-Pharmacia), previamente carregada com uma solução 0,3 M NiSO₄, e equilibrada com PBS 1X. A entrada da amostra (volume total de 100 ml) na coluna se deu com o auxílio de uma bomba peristáltica, fluxo de 1,0 ml/min. Para lavagem da coluna aumentou-se progressivamente a concentração de Imidazol no tampão de lavagem. Fez 4 lavagens com PBS 1X contendo 5mM , 20mM, 40mM e 60 mM de Imidazol, progressivamente. Após as lavagens a proteína foi eluída da coluna com 25 ml de PBS 1X contendo 1M de Imidazol. A presença de proteína recombinante foi observada por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 18%.

Purificação a partir da fração particulada:

Os corpúsculos de inclusão, obtidos através do tratamento do precipitado bacteriano, foram lavados primeiramente com 20 ml de uma solução contendo 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 M NaCl, 5 mM β-mercaptoetanol e 1 M uréia. Os corpúsculos de inclusão foram solubilizados por 16 horas em 20 ml de uma solução contendo 50 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 5 mM β-mercaptoetanol, 8 M uréia. Para a renaturação protéica, foi utilizada uma solução de 4 litros contendo 50 mM de Tris-HCl 1 M, pH 8.0, 500 mM NaCl e 5 mM Imidazol, onde foram gotejados apenas 5 ml da solução 8 M uréia. Após o gotejamento da amostra, os 4 litros de solução de renaturação permaneceram a 4°C até o momento de uso (no máximo por 16

horas). A coluna de Ni²⁺/sepharose (Amersham-Pharmacia) foi preparada de acordo com instruções do fabricante e equilibrada com o mesmo tampão utilizado para renaturação protéica. A amostra foi então adsorvida pela coluna, com o auxílio da bomba peristáltica, com fluxo de 2,5 ml/min. Para lavagem da coluna aumentou-se progressivamente a concentração de Imidazol no tampão de lavagem. Fez-se 4 lavagens com PBS 1X contendo 5mM , 20mM, 40mM e 60 mM de Imidazol, progressivamente. Após as lavagens a proteína foi eluída da coluna com 25 ml de PBS 1X contendo 1M de Imidazol. Usou-se o fluxo de 1,0 ml/min para as lavagens e eluições. A presença ou não de proteína recombinante foi observada por SDS-PAGE.

***PARTE I - SCREENING DE UMA BIBLIOTECA DE EXPRESSÃO DE cDNA DE
CEREBELO DE RATO USANDO-SE COMO SONDA O ANTICORPO ANTI-KM⁺***

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Limite de detecção de p83 e proteínas de *E. coli* - condição de estringência adequada para maior intensidade de marcação de p83 e menor de proteínas de *E. coli* XL1-Blue MRF', em imunodeteção cromogênica (fosfatase alcalina / NBT-BCIP) com o anticorpo anti-KM⁺

A escolha de condições básicas (como tipo de membrana e condições de imunodeteção) para o *screening* foram definidas durante o período em que se tentou o *screening* da biblioteca de expressão de cDNA de cerebelo de rato por meio de *microarrays*, usando-se o robô Q-bot (Genetix). Durante a padronização da rotina do robô, testamos os limites de detecção da proteína p83, usando-se várias diluições de uma fração do processo de purificação de p83 a partir de cerebelo de rato, com concentração total de proteínas conhecida. Usamos diferentes tipos de membranas (Nylon positively charged/Genetix, PVDF/Du Pont, PVDF/Amersham, Hybond C-extra/Amersham) com diferentes tratamentos, e em diferentes condições de revelação com o anticorpo anti-KM⁺ (métodos cromogênicos, quimioluminescentes, quimiofluorescentes, e radioativos). As mesmas condições também foram testadas em SDS-PAGE. Após comparar todas as condições, escolhemos utilizar a membrana de nitrocelulose Hybond C-extra, porque obtivemos os melhores resultados em termos de resistência, durabilidade, facilidade de tratamento e revelação. Decidimos adotar a imunodeteção cromogênica, com fosfatase alcalina e NBT/BCIP, porque além da praticidade e pouco ou nenhum background na revelação, o método foi eficiente para detectar a proteína em concentrações muito baixas (a partir de 0.7 µg, aproximadamente). Tivemos que interromper o processo de *screening* usando-se o Q-bot, devido a problemas mecânicos no braço do robô. Assim, partimos ao *screening* convencional mantendo o uso da membrana de nitrocelulose Hybond C-extra e da imunodeteção cromogênica com fosfatase alcalina e NBT/BCIP. As demais condições foram padronizadas a partir de então, como a estringência mais adequada, discutida a seguir.

Em *western blot* das frações solúvel e particulada do lisado de XL1-Blue MRF¹ com o anticorpo anti-KM⁺ verificou-se que o mesmo reconhece uma série de proteínas da bactéria (figura 1). Nesse experimento preliminar usou-se como tampão de lavagem, o tampão Na₂HPO₄ 20 mM pH 7.5 contendo NaCl 150 mM e Triton X-100 0,1% (v/v), uma condição pouco estrigente, que até então era o tampão utilizado em nosso laboratório para imunodeteccção de p83.

Antes de pré-adsorver o anticorpo anti-KM⁺ contra proteínas de *E. coli*, para evitar ligações inespecíficas no *screening* da biblioteca de expressão de cDNA de cerebelo de rato, trabalhou-se com a estringência do processo de imunodeteccção para se obter menor deteccção de proteínas de *E. coli* XL1-Blue MRF¹ e maior deteccção de p83.

As membranas resultantes das imunodeteccções cromogênicas (fosfatase alcalina e NBT/BCIP) com o anticorpo anti-KM⁺ em que se variou a concentração de NaCl no tampão de lavagem, foram submetidas à análise da densidade óptica integrada com o programa Gel-Pro Analyzer (Copyright Media Cybernetics 1993-97). Através dos valores de absorvância integrada (IABS), resultantes do processamento da densidade óptica integrada (IOD) por µg de proteína, selecionou-se as molaridades de 150 mM e 250 mM de NaCl como as melhores para maior deteccção de p83 e menor de proteínas de *E. coli* (figura 2). Ao variar-se a proporção de Triton X-100 para estas duas molaridades de NaCl identificou-se, através do mesmo procedimento descrito acima com o programa Gel-Pro Analyzer, como melhor estringência para maior intensidade de marcação de p83 e menor de proteínas de *E. coli*, o tampão Na₂HPO₄ 20 mM pH 7.5 contendo NaCl 250 mM e 0,1% Triton X-100 (figura 3). Este tampão foi utilizado em todos os experimentos que se seguiram.

Entretanto, mesmo depois de definida a condição de melhor estringência, foi necessário pré-adsorver o anticorpo anti-KM⁺ contra proteínas de *E. coli* e retitulá-lo para

detecção de p83, antes que pudesse ser usado no *screening* da biblioteca de expressão de cDNA de cerebello de rato.

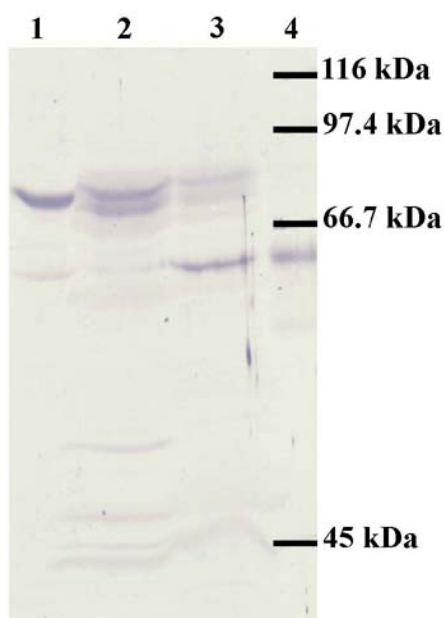


Figura 1. Imunodeteção cromogênica (fosfatase alcalina, NBT/BCIP) em baixa estringência [Na_2HPO_4 20 mM pH 7.5 contendo NaCl 150 mM e Triton X-100 0,1% (v/v)], de proteínas de XL1-Blue MRF' a partir das frações solúvel e particulada de lisado submetidos a SDS-PAGE. Lanes: 1, fração PSA da purificação de p83; 2, fração solúvel do lisado de XL1-Blue MRF'; 3, fração particulada do lisado de XL1-Blue MRF'; 4, padrão de peso molecular Sigma 6H.

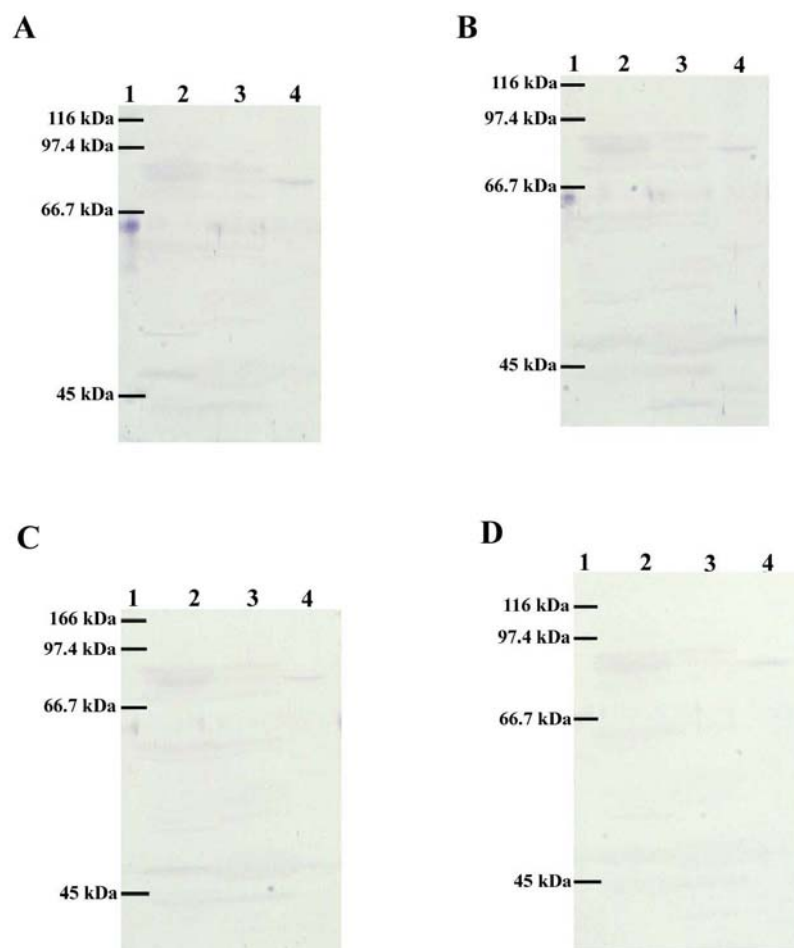


Figura 2. Imunodeteção cromogênica (fosfatase alcalina, NBT/BCIP), em diferentes condições de estringência, de p83, a partir da fração PSA2 da purificação, e de proteínas de XL1-Blue MRF', a partir das frações solúvel e particulada de lisado submetidos a SDS-PAGE. **A, B, C e D:** condições de estringência. **A:** 150 mM NaCl e 0,1 % Triton X-100. **B:** 250 mM NaCl e 0,1 % Triton X-100. **C:** 350 mM NaCl e 0,1 % Triton X-100. **D:** 450 mM NaCl e 0,1 % Triton X-100. Em **A, B, C e D,** manteve-se 20 mM de Na_2HPO_4 . De **A a D,** Lanes: 1, padrão de peso molecular Sigma 6H; 2, fração solúvel do lisado de XL1-Blue MRF'; 3, fração particulada do lisado de XL1-Blue MRF'; 4, fração PSA da purificação de p83 a partir de cerebelo de rato.

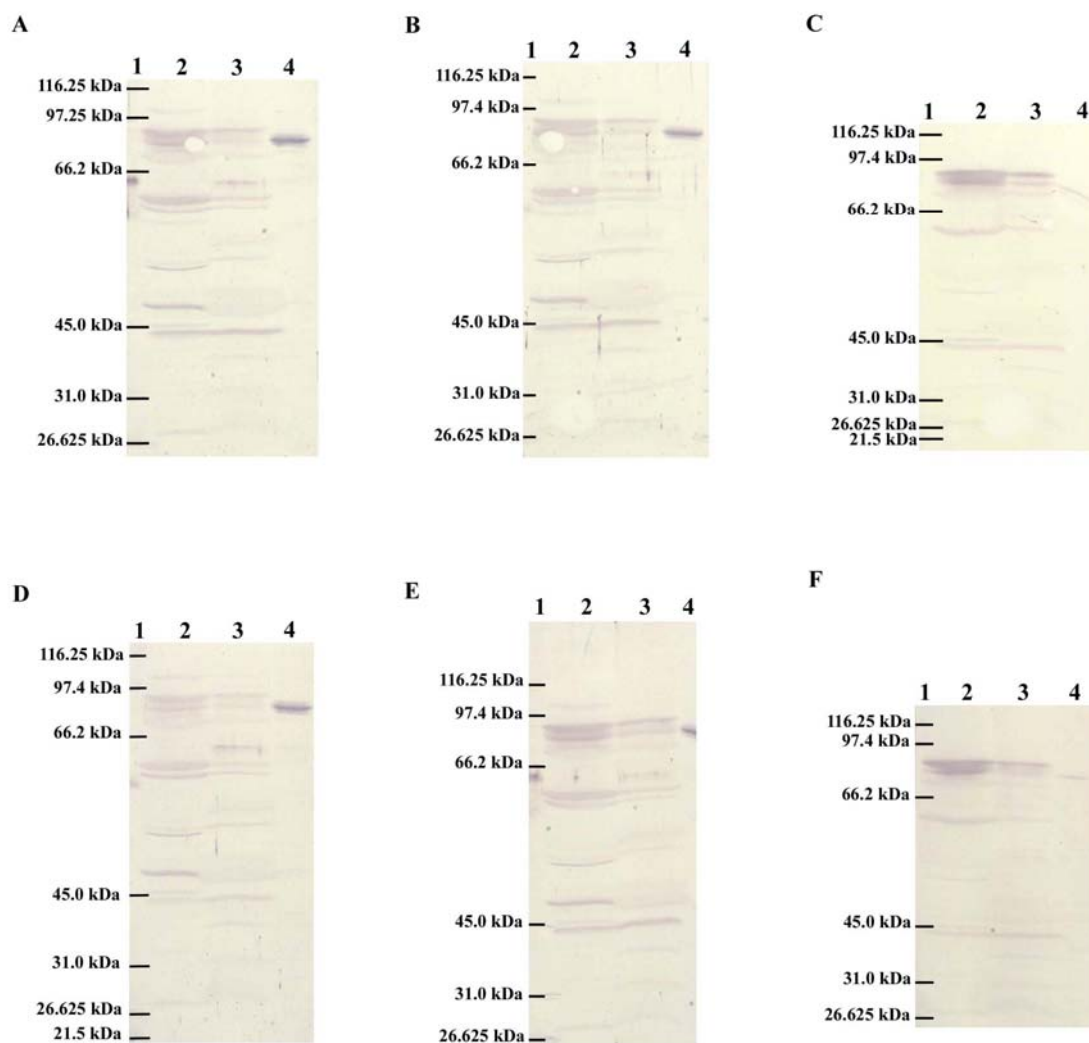


Figura 3. Imunodeteção cromogênica (fosfatase alcalina, NBT/BCIP) em diferentes estringências, de p83 a partir da fração PSA2 da purificação, e de proteínas de XL1-Blue MRF¹ a partir das frações solúvel e particulada de lisado submetidos a SDS-PAGE. **A, B, C, D, E** e **F**: condições de estringência. **A**: 150 mM NaCl e 0,1 % Triton X-100. **B**: 150 mM NaCl e 0,2 % Triton X-100. **C**: 150 mM NaCl e 0,3 % Triton X-100. **D**: 250 mM NaCl e 0,1 % Triton X-100. **E**: 250 mM NaCl e 0,2 % Triton X-100. **F**: 250 mM NaCl e 0,3 % Triton X-100. De **A** a **F**, Lanes: 1, padrão de peso molecular Biorad Broad Range; 2, fração solúvel do lisado de XL1-Blue MRF¹; 3, fração particulada do lisado de XL1-Blue MRF¹; 4, fração PSA da purificação de p83.

4.2 Anticorpo anti-KM⁺ pré-adsorvido contra proteínas de *E. coli* XL1-Blue MRF'

A pré-adsorção do anti-KM⁺ contra proteínas submetidas à SDS-PAGE e eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose Hybond C-Extra (Amersham Biosciences) apresentou resultados satisfatórios. Em diluição 1:500, não se detectou proteínas de *E. coli* XL1-Blue MRF' e obteve-se forte marcação de p83 (figura 4). A cada tentativa de *screening* e *rescreening* preparou-se tanto anti-KM⁺ pré-adsorvido quanto necessário, pois o mesmo perde atividade muito rapidamente uma vez que tenha sido descongelado, diluído e pré-adsorvido.

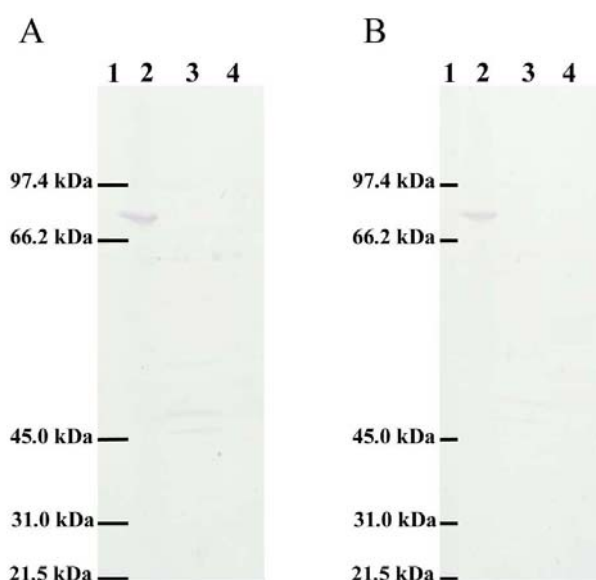


Figura 4. Imunodeteção cromogênica (fosfatase alcalina, NBT/BCIP) com anti-KM⁺ pré-adsorvido contra proteínas de *E. coli* eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose. **a:** diluição 1:500 do anti-KM⁺ pré-adsorvido. **b:** diluição 1:1000 do anti-KM⁺ pré-adsorvido. Em **a** e **b**; Lanes: 1, padrão de peso molecular Biorad Broad Range; 2, fração PSA da purificação de p83; 3, fração solúvel do lisado de XL1-Blue MRF'; 4, fração particulada do lisado de XL1-Blue MRF'.

4.3 Clones λ ZAPII anti-KM⁺ imunorreativos resultantes de *screening* da biblioteca de expressão de cDNA de cerebelo de rato (*Lambda zapII*[®] *rat cerebellum premade library*, *Stratagene*)

Depois que foram definidas as condições de detecção, fez-se 4 *screenings* sem recuperação antigênica, variando-se os tempos de indução da expressão (2h, 4h, 12h, 16h) e 2 *screenings* com recuperação antigênica (12h de indução da expressão) por cloridrato de guanidina 6M. Esses 6 *screenings* foram feitos com plaqueamento de fagos em alto título (para obtenção de halos de lise confluentes).

Identificou-se um clone anti-KM⁺ imunorreativo no primeiro *screening* com recuperação antigênica (figura 5). Em cada um desses 6 *screenings*, o *plating phage* foi feito a 200000pfu/placa, sendo 6 placas analisadas em cada experimento. Ou seja, nos *screenings* em alta confluência identificou-se 1 clone imunorreativo entre 7200000 clones.

No segundo *screening* com recuperação antigênica, nenhum clone anti-KM⁺ imunorreativo foi encontrado. E os *rescreenings* feitos nas mesmas condições foram negativos. Após esses resultados negativos, fez-se o *screening* da biblioteca de expressão de cDNA de cerebelo de rato usando-se o anti-GFAP como sonda, usando-se título de plaqueamento de fagos a 40000 pfu/placa (ver item 6, em anexos). Diante dos resultados obtidos, o *screening* com o anti-KM⁺ foi repetido com plaqueamento de fagos para a obtenção de halos isolados.

No *screening* feito com clones isolados (4000 pfu/placa), mesmo sem recuperação antigênica conseguiu-se identificar um clone anti-KM⁺ imunorreativo entre 40000 clones (figura 6).

Os *rescreenings* dos dois clones anti-KM⁺ identificados foram repetidos (a 40000 pfu/placa) e confirmaram a imunorreatividade com o anticorpo anti-KM⁺ (figura 7).

Em todos os *screenings* e também nos *rescreenings*, o controle positivo para p83 foi fortemente marcado e as frações solúvel e particulada do lisado de *E. coli* XL1-Blue MRF' não foram marcadas. Na figura 8, apresentamos os controles para o *screening* no qual o primeiro clone anti-KM⁺ imunorreativo foi identificado.

As alíquotas armazenadas do clone identificado em *screening* feito em título que permitiu plaqueamento de halos isolados, perderam a capacidade de infectar a bactéria hospedeira, XL1-Blue MRF'. Portanto, prosseguiu-se apenas com o clone anti-KM⁺ imunorreativo identificado no *screening* feito em alto título de plaqueamento de fagos (figura 5).

Antes de se iniciar os *screenings*, o título da biblioteca de expressão de cDNA de cerebelo de rato (*Lambda zapII*[®] *rat cerebellum premade library*, Stratagene) e a proporção de recombinantes foram confirmados. A titulação inicial mostrou um título da ordem de 10⁸ pfu/μl, e uma quantidade de placas (halos de lise) recombinantes aproximadamente 50 vezes maior que a de não recombinantes. Os valores confirmaram os esperados segundo o fabricante: pouco menor que 10¹⁰ pfu/μl para o título da biblioteca, e proporção de recombinantes de 10 a 100 vezes maior que a de não recombinantes. A cada semestre a biblioteca foi retitulada e os resultados confirmaram, sempre, os valores identificados inicialmente. O título não caiu, confirmando que as condições de armazenamento e os cuidados de manipulação foram adequados.

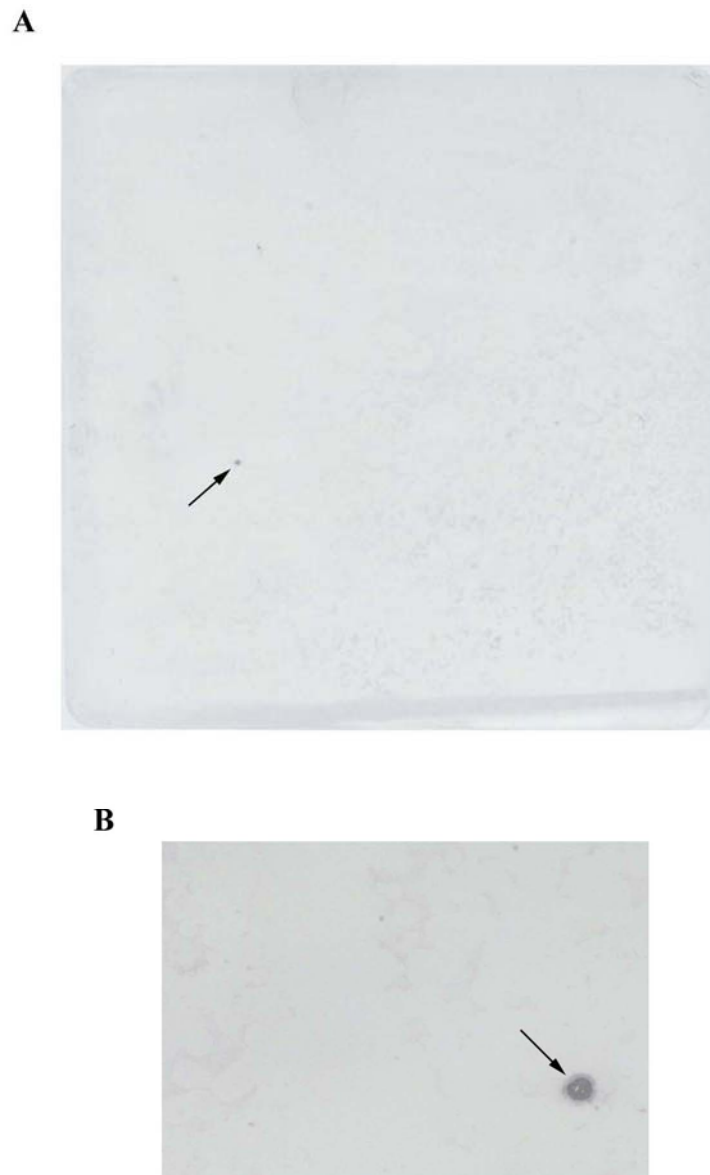


Figura 5. Imunodeteção cromogênica (fosfatase alcalina, NBT/BCIP) após tratamento de recuperação antigênica em membranas resultantes do *screening* da biblioteca de expressão de cDNA de cerebelo de rato com o anti-KM⁺. *a*: vista inteira da membrana que apresentou sinal positivo (indicado pela seta). *b*: *zoom* da região da membrana que contém a marcação positiva (indicado pela seta).

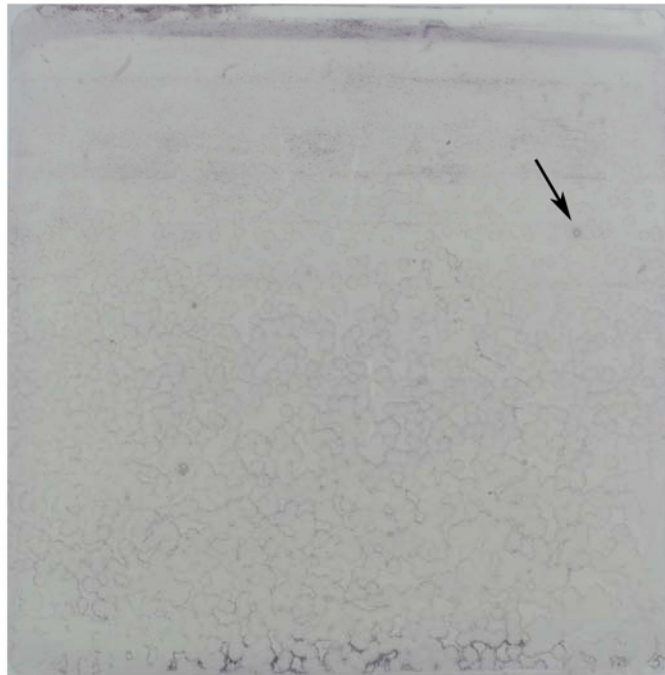
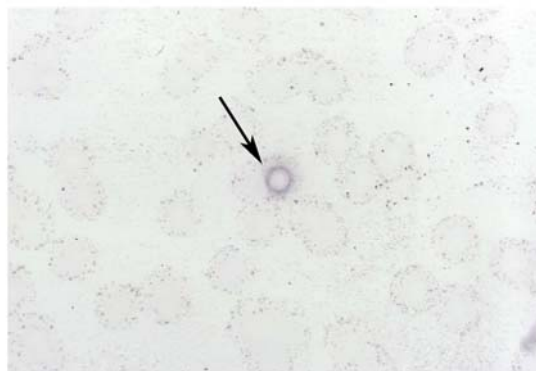
A**B**

Figura 6. Imunodeteção cromogênica (fosfatase alcalina, NBT/BCIP) com o anticorpo anti-KM⁺ pré-adsorvido contra proteínas de *E. coli* XL1-Blue MRF['] para *screening* da biblioteca de expressão de cDNA de cerebelo de rato (*Lambda zapII*[®] rat cerebellum premade library, Stratagene) em baixo título (halos isolados) e sem recuperação antigênica. A: vista inteira da membrana que apresentou sinal positivo (indicado pela seta). B: zoom da região da membrana que contém a marcação positiva (indicada pela seta).

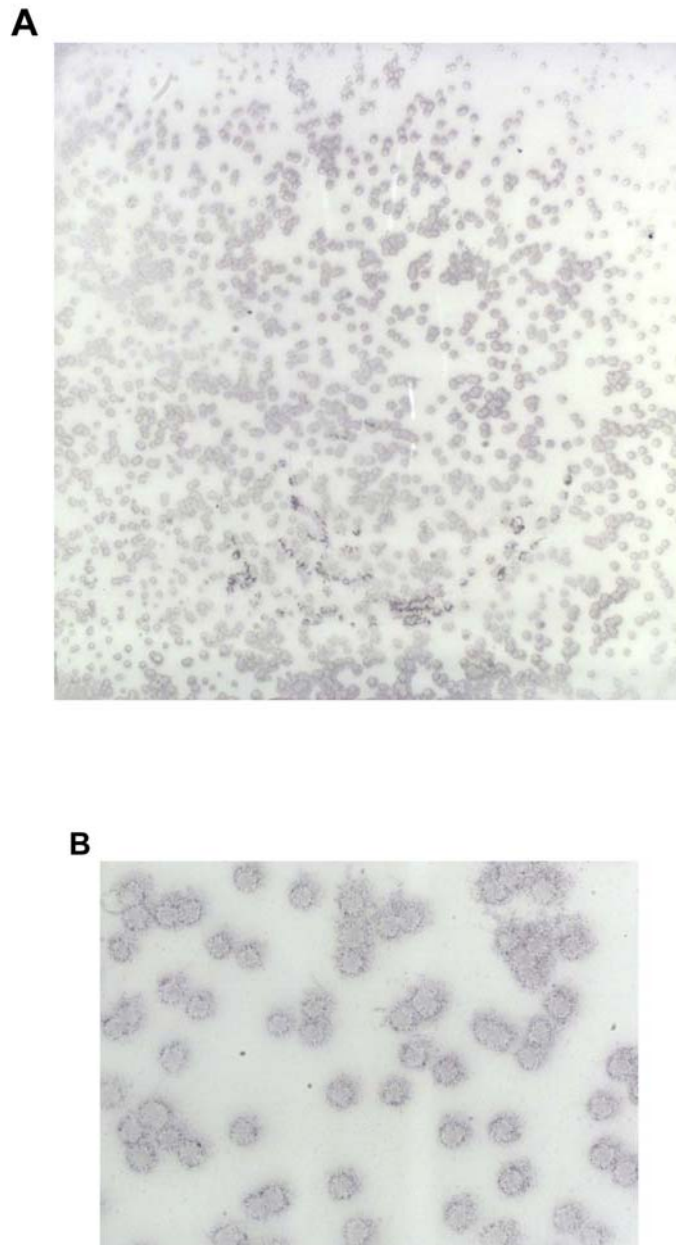


Figura 7. Imunodeteção cromogênica (fosfatase alcalina, NBT/BCIP) com o anticorpo anti-KM⁺ pré adsorvido contra proteínas de *E. coli* XL1-Blue MRF¹ para *rescreening*, em baixo título (halos isolados) e sem recuperação antigênica, da biblioteca de expressão de cDNA de cerebelo de rato, a partir do clone λ ZAPII anti-KM⁺ imunorretivo identificado. A: vista inteira da membrana, onde pode se observar marcação positiva de todos os halos de lise resultantes do replaqueamento. B: zoom de uma região da membrana, para melhor visualização da marcação positiva correspondente a cada halo de lise.

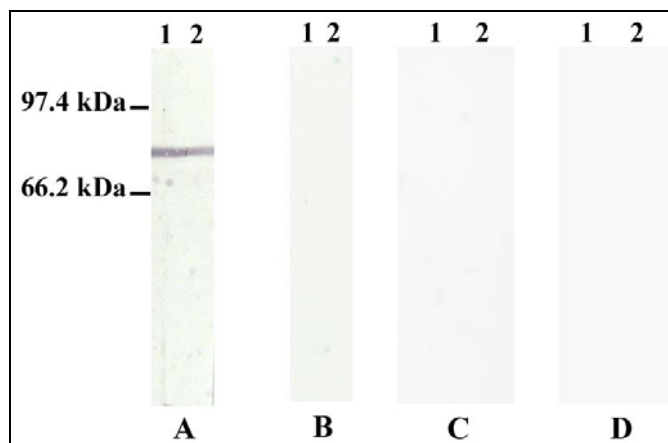


Figura 8. Imunodeteção cromogênica (fosfatase alcalina, NBT/BCIP) de p83 e de proteínas de *E. coli* XL1-Blue MRF' (frações solúvel e particulada de lisado) submetidas a SDS-PAGE, usando-se anti-KM⁺ pré-adsorvido contra proteínas de *E. coli* XL1-Blue MRF'. B e D: controle negativo, ausência de anti-KM⁺. A e C: anti-KM⁺ pré-adsorvido contra proteínas de *E. coli*, diluído 1:500. Lanes em A e B: 1 e 2, 50µg em cada lane da fração PSA da purificação de p83. Lanes em C e D: 1, fração solúvel do lisado de XL1-Blue MRF'; 2, fração particulada do lisado de XL1-Blue MRF'. Padrão de peso molecular Biorad Broad Range.

4.3.1 Caracterização de clones resultantes do *rescreening* do clone λZAPII anti-KM⁺ imunorreativo por excisão *in vivo* do pBluescript, transformação em XL1-Blue MRF', extração do DNA plasmidial, digestão por Eco RI e seqüenciamento

5 clones λZAPII anti-KM⁺ imunorreativos, selecionados aleatoriamente a partir do *rescreening* do primeiro clone positivo identificado durante *screening* da biblioteca de expressão de cDNA de cerebelo de rato, foram utilizados para excisão *in vivo* do fagomídeo pBluescript. Esses 5 clones foram denominados: 6, 7, 8, 9 e 10. Trabalhou-se com 2 clones em *E. coli* XL1-Blue MRF' transformada com pBluescript (subclones) excisados a partir de cada clone λZAPII anti-KM⁺ imunorreativo. Denominaram-se os subclones em *E. coli* de A e B. Assim, os subclones de pBluescript em *E. coli* são: 6A, 6B, 7A, 7B, 8A, 8B, 9A, 9B, 10A e 10B.

Após extração de DNA plasmidial e digestão com EcoRI, constatou-se que os 10 clones apresentaram insertos de tamanhos diferentes (figura 9):

6A e 6B – inserto de aproximadamente 1,7 kb

7A – inserto de aproximadamente 2,0 kb

7B – banda correspondente ao inserto pouco visível

8A e 8B – inserto de aproximadamente 2,25 kb

9A – digestão parcial, não foi possível determinar o tamanho correto dos fragmentos

9B – inserto de aproximadamente 2,65 kb

10A e 10B – bandas correspondentes aos insertos pouco visíveis

Com exceção da construção 9A, onde não foi possível determinar corretamente o tamanho dos fragmentos, as demais apresentaram um fragmento correspondente ao tamanho de 2,96 kb esperado para o vetor pBluescript. O tamanho dos fragmentos foi confirmado usando-se o programa Gel-Pro Analyzer (Media Cybernetics).

Os DNAs plasmidiais purificados a partir dos clones 6A, 6B, 8A, 8B, 7A e 9B, foram submetidos ao seqüenciamento.

Aproximadamente 700 bp de cada amostra foram seqüenciados. Alguns eletroferogramas não ficaram muito bons, apresentando nucleotídeos não reconhecidos e trechos com repetições do mesmo nucleotídeo. As seqüências foram analisadas com as ferramentas de bioinformática e alinhadas contra o banco de dados do NCBI.

A princípio compararam-se as seqüências entre si, em busca de regiões similares. A comparação entre as seqüências não revelou qualquer região de identidade entre elas, indicando que possivelmente o halo positivo, inicialmente isolado, corresponde a mais de um clone λ ZAPII anti-KM⁺ (sobrepostos na placa de *screening*).

Na análise das seqüências por alinhamento com o banco de dados, apenas a seqüência 9B apresentou resultados relevantes.

747 bases foram obtidas no seqüenciamento do fagomídeo 9B. Com ferramentas de bioinformática, identificou-se o trecho inicial da seqüência, correspondente ao vetor, onde se localizou o início do sítio múltiplo de clonagem e a posição dos adaptadores Eco RI utilizados

na construção da biblioteca e que flanqueiam o inserto. O final da seqüência, apresentando um trecho de qualidade ruim, com vários nucleotídeos não identificados foi removido. A seqüência restante correspondente ao inserto está apresentada na figura 10. O alinhamento com o banco de dados de nucleotídeos apresentou identidade com as isoformas adulta e embrionária de drebrinas de várias espécies, assim como com seqüências preditas de drebrina (figura 11). Os resultados mais relevantes foram: 1) Um trecho de 450 bp da seqüência apresentou 87% de identidade com a seqüência do gene *drba* para drebrina A de *Mus musculus* (gene bank: gi/19909850/dbj/AB028740.1); 2) Um trecho de 178 bp apresentou 98% de identidade com a seqüência de cDNA correspondente ao mRNA para a drebrina 1 de *Rattus norvegicus* (gi/297820); 3) Um trecho de 173 bp apresentou 99% de identidade com a seqüência de cDNA correspondente ao mRNA para drebrin E de *Rattus norvegicus* (gi/3192362/AB0150421). Quando a seqüência foi alinhada contra o genoma do rato, o alinhamento confirmou identidade de 99% (420 bp) com o gene da drebrina (figura 12).

A seqüência de aminoácidos deduzida da seqüência de nucleotídeos 9B também alinha com seqüências de aminoácidos da proteína drebrina, depositadas em banco de dados. Os trechos da seqüência que alinham com drebrina correspondem a fragmentos internos da proteína, portanto a seqüência 9B pode estar incompleta tanto na extremidade 5' como também na extremidade 3'. A não identificação do códon de iniciação ATG reforça a idéia de que o cDNA possivelmente esteja incompleto na extremidade 5'. Na extremidade 3' há um stop códon, o que não contribui com a idéia de que o cDNA não esteja completo na extremidade 3'.

Para solucionar essas dúvidas com relação à seqüência 9B, por *primer walking*, desenhou-se pares de oligos para clonar por PCR, usando uma parte da biblioteca de cDNA como template, o que faltava na região 5' deste inserto, e outros pares para confirmar e continuar o seqüenciamento da região 3'. Mas ainda não foi possível completar essa

seqüência, tampouco, portanto, elucidar estas questões. Novos seqüenciamentos serão feitos a partir dessa abordagem e outras ferramentas estão sendo definidas para tentar seqüenciar o clone todo.

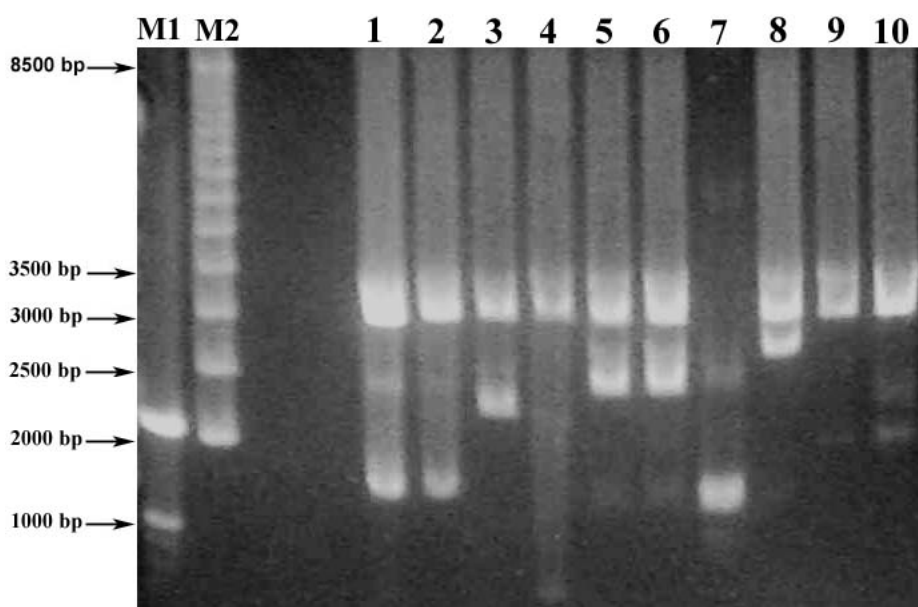


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose de DNA plasmidial de subclones anti-KM⁺ imunorreativos (pBluescript/ λ ZAP II) submetidos à digestão com EcoRI, visualiado em trasiluminador de UV. Lanes: 1 a 10, correspondentes aos subclones 6A, 6B, 7A, 7B, 8A, 8B, 9A, 9B, 10A, 10B; M1 e M2, marcadores de peso molecular *100 bp DNA Ladder* e *500 bp DNA Ladder* (Invitrogen), respectivamente.

1	TCC	TCA	CTC	ACT	AGC	CTG	GAC	GTT	TGC	TCC	ACA	GGC	AGT	CAC
	S	S	L	T	S	L	D	V	C	S	T	G	S	H
43	CTG	GAC	AGC	CAC	CGG	AGG	ATG	GCG	CCC	ACT	CCC	ATT	CCC	ACC
	L	D	S	H	R	R	M	A	P	T	P	I	P	T
85	CGG	AGC	CCA	TCT	GAT	TCC	AGC	ACA	GCC	TCC	ACC	CCC	ATC	ACG
	R	S	P	S	D	S	S	T	A	S	T	P	I	T
127	GAG	CAG	ATC	GAG	AGG	GCC	CTG	GAT	GAG	GTC	ACA	TCC	TCG	CAG
	E	Q	I	E	R	A	L	D	E	V	T	S	S	Q
169	CCT	CCA	CCC	CCA	CCT	CCA	CCA	CCC	CCA	CCA	GCT	CAA	GGT	AAG
	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	Q	G	K
211	AGA	AGG	GCT	CCA	CCG	GTT	CCC	ATT	CTT	CCA	TCA	GTC	TCT	GGG
	R	R	A	P	P	V	P	I	L	P	S	V	S	G
253	CGG	GGG	GAG	GGG	AGA	CCC	TGG	GTT	GCC	ACG	GTA	ACG	TAG	TTC
	R	G	E	G	R	P	W	V	A	T	V	T	*	F
295	AAA	GGA	CCC	GGA	CCA	CTC	CAT	CAC	CAA	CAC	TAC	ACT	GGT	AAG
	K	G	P	G	P	L	H	H	Q	H	Y	T	G	K
337	GAT	GTG	GCT	GTA	GCT	GAG	GAC	AGC	CCC	GGT	GTT	GCT	GTC	AGA
	D	V	A	V	A	E	D	S	P	G	V	A	V	R
379	CTT	CTC	TAA	ACC	TCA	TTG	GCT	CAT	CAC	TGA	GGA	ATG	TGG	CCT
	L	L	*	T	S	L	A	H	H	*	G	M	W	P
421	TCC	TCC	CAG	GGG	TTT	AAA	AAG	AGT	GGG	TGA	AAG	GAC	CGG	GAG
	S	S	Q	G	F	K	K	S	G	*	K	D	R	E
463	GTA	TAC												
	V	Y												

Figura 10. Sequência nucleotídica obtida para o clone anti-KM⁺ imunorreativo. Em preto, a sequência nucleotídica. Em azul, a sequência deduzida de aminoácidos.

Accession	Description	Max score	Query coverage	E value	Max ident
gi 74096677 AC154402.2	Mus musculus BAC clone RP24-235N24 from chromosome 13, complete sequence	523	96%	2e-145	87%
gi 84992938 CT009762.8	Mouse DNA sequence from clone RP23-21109 on chromosome 13, complete sequence	523	96%	2e-145	87%
gi 19909850 AB028740.1	Mus musculus drba gene for drebrin A, partial cds	523	96%	2e-145	87%
gi 146218399 BC139847.1	Rattus norvegicus cDNA clone MGC:156631 IMAGE:8368018, complete cds	322	37%	8e-85	100%
gi 13591935 NM_031024.1	Rattus norvegicus drebrin 1 (Dbn1), mRNA >gi 297820 emb X59267.1 RNDRREBRIN R.norvegicus mRNA for drebrin A	318	38%	1e-83	98%
gi 3192362 AB015042.1	Rattus norvegicus mRNA for drebrin E, partial cds	316	37%	4e-83	99%
gi 19911151 AB064321.1	Mus musculus mRNA for drebrin A2, complete cds	313	43%	5e-82	94%
gi 118130629 NM_019813.3	Mus musculus drebrin 1 (Dbn1), mRNA	272	37%	8e-70	94%
gi 74204955 AK132060.1	Mus musculus 12 days embryo head cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:3010022H11 product:drebrin 1, full insert sequence	272	37%	8e-70	94%
gi 74183948 AK162697.1	Mus musculus adult female vagina cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:9930032015 product:drebrin 1, full insert sequence	272	37%	8e-70	94%
gi 6694228 AF187148.1	Mus musculus drebrin E2 mRNA, complete cds	272	37%	8e-70	94%
gi 13879471 BC006714.1	Mus musculus drebrin 1, mRNA (cDNA clone MGC:11679 IMAGE:3710497), complete cds	272	37%	8e-70	94%
gi 6694226 AF187147.1	Mus musculus drebrin A mRNA, complete cds	268	38%	1e-68	93%
gi 37999245 AC145098.2	Homo sapiens chromosome 5 clone RP11-1334A24, complete sequence	243	46%	6e-61	87%
gi 18997253 AC090063.4	Homo sapiens chromosome 5 clone CTB-22D11, complete sequence	243	46%	6e-61	87%
gi 29569254 AC138865.3	Homo sapiens chromosome 5 clone RP11-1407J20, complete sequence	243	46%	6e-61	87%
gi 29569242 AC140179.3	Homo sapiens chromosome 5 clone RP11-933K12, complete sequence	243	46%	6e-61	87%
gi 114603660 XM_001143297.1	PREDICTED: Pan troglodytes drebrin 1, transcript variant 1 (DBN1), mRNA	222	37%	8e-55	89%
gi 114603658 XM_518132.2	PREDICTED: Pan troglodytes drebrin 1, transcript variant 2 (DBN1), mRNA	222	37%	8e-55	89%
gi 117645695 AM393436.1	Synthetic construct Homo sapiens mRNA for hypothetical protein (DBN1 gene), clone DKF2p434D064.1E1	217	37%	4e-53	89%
gi 110623958 AK225523.1	Homo sapiens mRNA for drebrin 1 isoform a variant, clone: KAT04801	217	37%	4e-53	89%
gi 109079952 XM_001091295.1	PREDICTED: Macaca mulatta drebrin 1, transcript variant 2 (DBN1), mRNA	217	37%	4e-53	89%
gi 109079948 XM_001091536.1	PREDICTED: Macaca mulatta drebrin 1, transcript variant 4 (DBN1), mRNA	217	37%	4e-53	89%
gi 18426912 NM_080881.1	Homo sapiens drebrin 1 (DBN1), transcript variant 2, mRNA	217	37%	4e-53	89%
gi 18426914 NM_004395.2	Homo sapiens drebrin 1 (DBN1), transcript variant 1, mRNA	217	37%	4e-53	89%
gi 21753123 AK094125.1	Homo sapiens cDNA FLJ36806 fis, clone ASTRO1000165, highly similar to DREBRIN E	217	37%	4e-53	89%
gi 12653038 BC000283.1	Homo sapiens drebrin 1, mRNA (cDNA clone MGC:1517 IMAGE:3356428), complete cds	217	37%	4e-53	89%
gi 13938304 BC007281.1	Homo sapiens drebrin 1, mRNA (cDNA clone MGC:15625 IMAGE:3343626), complete cds	217	37%	4e-53	89%
gi 14043158 BC007567.1	Homo sapiens drebrin 1, mRNA (cDNA clone MGC:15517 IMAGE:3028196), complete cds	217	37%	4e-53	89%
gi 5817161 AL110225.1	Homo sapiens mRNA; cDNA DKF2p434D064 (from clone DKF2p434D064); partial cds	217	37%	4e-53	89%
gi 498650 D17530.1	Homo sapiens mRNA for drebrin E, complete cds	217	37%	4e-53	89%
gi 392889 U00802.1	Human drebrin E2 mRNA (DBN1), complete cds	217	37%	4e-53	89%
gi 109079950 XM_001091425.1	PREDICTED: Macaca mulatta drebrin 1, transcript variant 3 (DBN1), mRNA	213	38%	5e-52	88%
gi 109079946 XM_001091175.1	PREDICTED: Macaca mulatta drebrin 1, transcript variant 1 (DBN1), mRNA	213	38%	5e-52	88%
gi 90651992 BC114553.1	Homo sapiens drebrin 1, mRNA (cDNA clone IMAGE:40053662), with apparent retained intron	213	38%	5e-52	88%
gi 67970835 AB169679.1	Macaca fascicularis brain cDNA, clone: QccE-17231, similar to human drebrin 1 (DBN1), transcript variant 2, mRNA, RefSeq: NM_080881.1	213	38%	5e-52	88%
gi 56009296 AK185119.1	Mus musculus cDNA, clone:Y0G0132K22, strand:plus, reference:ENSEMBL:Mouse-Transcript-ENST:ENSMUST00000054646, based on BLAT search	180	25%	5e-42	93%

Figura 11. Resultado do alinhamento da seqüência obtida, contra o banco de dados de nucleotídeos. Nota-se que a seqüência apresenta identidade com drebrinas de várias espécies. O resultado não foi editado, ou seja, não se retirou resultados de alinhamento da lista.

Accession	Description	Max score	Query cover	E value	Max ident
gi 34873863 NW_047487.1	Rattus norvegicus chromosome 17 genomic contig, reference assembly (based on RGSC v3.4)	861	76%	0.0	99%
gi 109505484 NW_001084721.1	Rattus norvegicus chromosome 17 genomic contig, alternate assembly (based on Celera assembly)	861	76%	0.0	99%


```

>gi|34873863|ref|NW_047487.1|Rn17_WGA2009_4
(based on RGSC v3.4)
Length=10665079

Features in this part of subject sequence:
  drebrin 1

Score = 861 bits (466), Expect = 0.0
Identities = 469/470 (99%), Gaps = 1/470 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 TCCTCACTCACTAGCCTGGACGTTTGCTCCACAGGCAGTCACCTGGACAGCCACCGGAGG 60
Sbjct 9717605 ..... 9717664

Query 61 ATGGCGCCCACTCCCATTCACACCCGGAGCCCATCTGATTCCAGCACAGCCTCCACCCCC 120
Sbjct 9717665 ..... 9717724

Query 121 ATCACGGAGCAGATCGAGAGGGCCCTGGATGAGGTCACATCCTCGCAGCCAccacccccca 180
Sbjct 9717725 ..... 9717784

Query 181 cctccaccacccccaccaccGCTCAAGGTAAGAGAAGGGGCTCCACCGGTTCCCATTCCTCCA 240
Sbjct 9717785 ..... 9717844

Query 241 TCAGTCTCTGGGCGGGGGGAGGGGAGACCCCTGGGTTGCCACGGTAACGTAGTTCAAAGGA 300
Sbjct 9717845 ..... 9717904

Query 301 CCGGACCCTCCATCACCAACACTACACTGGTAAGGATGTGGCTGTAGCTGAGGACAGC 360
Sbjct 9717905 ..... 9717964

Query 361 CCGGTGTGTGCTGTACAGACTTCTCTAAACCTCATTGGCTCATCACTGAGGAATGTGGCCT 420
Sbjct 9717965 ..... 9718024

Query 421 TCCTCCAGGGGTTTAAAAAGAGTGGGTGAAAGGACCGGGAGGTAT-ACT 469
Sbjct 9718025 .....G... 9718074

>gi|109505484|ref|NW_001084721.1|Rn17_WGA2786_4
(based on Celera assembly)
Length=8538797

Features in this part of subject sequence:
  drebrin 1

Score = 861 bits (466), Expect = 0.0
Identities = 469/470 (99%), Gaps = 1/470 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 TCCTCACTCACTAGCCTGGACGTTTGCTCCACAGGCAGTCACCTGGACAGCCACCGGAGG 60
Sbjct 6552604 ..... 6552663

Query 61 ATGGCGCCCACTCCCATTCACACCCGGAGCCCATCTGATTCCAGCACAGCCTCCACCCCC 120
Sbjct 6552664 ..... 6552723

Query 121 ATCACGGAGCAGATCGAGAGGGCCCTGGATGAGGTCACATCCTCGCAGCCAccacccccca 180
Sbjct 6552724 ..... 6552783

Query 181 cctccaccacccccaccaccGCTCAAGGTAAGAGAAGGGGCTCCACCGGTTCCCATTCCTCCA 240
Sbjct 6552784 ..... 6552843

Query 241 TCAGTCTCTGGGCGGGGGGAGGGGAGACCCCTGGGTTGCCACGGTAACGTAGTTCAAAGGA 300
Sbjct 6552844 ..... 6552903

Query 301 CCGGACCCTCCATCACCAACACTACACTGGTAAGGATGTGGCTGTAGCTGAGGACAGC 360
Sbjct 6552904 ..... 6552963

Query 361 CCGGTGTGTGCTGTACAGACTTCTCTAAACCTCATTGGCTCATCACTGAGGAATGTGGCCT 420
Sbjct 6552964 ..... 6553023

Query 421 TCCTCCAGGGGTTTAAAAAGAGTGGGTGAAAGGACCGGGAGGTAT-ACT 469
Sbjct 6553024 .....G... 6553073

```

Figura 12. Resultado do alinhamento da seqüência obtida, contra o genoma do rato (*Rattus norvegicus*), confirmando identidade com drebrina. O resultado não foi editado, para mostrar a especificidade do alinhamento.

4.4 Capacidade de detecção do anticorpo anti-KM⁺ contra drebrina e capacidade de detecção do anticorpo anti-drebrina (StressGen) contra p83

O anticorpo monoclonal M2F6 anti-drebrina (NBA 110, StressGen), detecta uma proteína de aproximadamente 140 kDa, numa banda dublete correspondente à massa molecular aparente de drebrina A e E em imunoblotes SDS-PAGE, em amostras de rato, embora o peso molecular predito a partir do cDNA para drebrina A de rato seja 77,471 kDa. A proteína também é detectada em banda dublete em amostras humanas, de camundongo, gato, cobaia e macaco. Em galinha, o anticorpo identifica apenas drebrina E (massa molecular aparente ~110 kDa). A massa molecular aparente varia entre as espécies e também se observa essa discrepância entre o peso molecular predito e a massa molecular aparente em SDS-PAGE, que se deve à presença de grande número de resíduos negativamente carregados nessa proteína. (Shirao & Obata, 1986; Imamura *et al.*, 1992; Shirao *et al.*, 1994; Shirao, 1995).

Verificamos a capacidade de detecção de drebrina a partir de uma preparação de cerebelo com o anticorpo anti-drba (StressGen), para definição de controle positivo e título de anticorpo adequado para imunodeteção cromogênica (fosfatase alcalina/NBT-BCIP). Identificamos a banda dublete de aproximadamente 140 kDa usando uma diluição do anti-drebrina a 1:100.

4.4.1 Imunorreatividade entre o anticorpo anti-drba e frações do processo de purificação de p83

A biblioteca utilizada para *screening* na identificação do cDNA de p83, é uma biblioteca de cerebelo de rato. Por isso, verificamos também a imunorreatividade entre o anticorpo anti-drba e frações do processo de purificação de p83 a partir de cerebelo. Como utilizamos apenas homogeneizado total de cérebro durante a titulação do anticorpo,

comparamos também a imunorreatividade entre o anti-drba e frações do processo de purificação de cérebro, juntamente com as amostras de cerebelo.

A figura 13, A e B, mostra os resultados obtidos para a imunodeteção com o anticorpo anti-drba contra o homogeneizado total de cérebro e duas frações purificadas da preparação de p83 de cérebro, uma de coluna DEAE-Sepharose FF e outra de Phenyl-Sepharose FF (amostras purificadas pela doutoranda Thaís D. Dombroski e Prof. Dr. Antonio Roberto Martins). Embora não seja muito visível na imagem, o anticorpo anti-drebrina reconhece um dublete (a banda superior corresponderia à forma adulta e a banda inferior, à forma embrionária) correspondente a sua massa molecular aparente no homogeneizado total de cérebro da preparação de p83, semelhante ao controle positivo para drebrina [preparação do homogeneizado total de cerebelo: fração rica em proteínas do citoesqueleto, previamente usada como controle positivo para drebrina (Shirao & Obata, 1986).], embora com marcação menos visível. Nas frações purificadas de cérebro, de fato, não há qualquer marcação evidente.

O controle positivo para p83, é apresentado na figura 13, C. As mesmas amostras do processo de purificação de p83 de cérebro foram submetidas à imunodeteção cromogênica com o anti-KM⁺. O resultado confirma a presença de p83 nas frações do processo de purificação de p83 a partir de cérebro. Na preparação usada como controle positivo para drebrina há bandeamento semelhante ao verificado no controle positivo para p83, sugerindo que há p83 nessa preparação. Há uma banda anti-KM⁺ imunorreativa na fração purificada em DEAE-Sepharose, que apresenta massa molecular aparente de aproximadamente 140 kDa (figura 13, C, canaleta 2). Nessa fração há proteínas que interagem fortemente com p83. Embora essa banda não tenha sido identificada com o anti-drebrina na mesma fração, ela é semelhante à banda identificada com o anti-drebrina em homogeneizado total de cérebro.

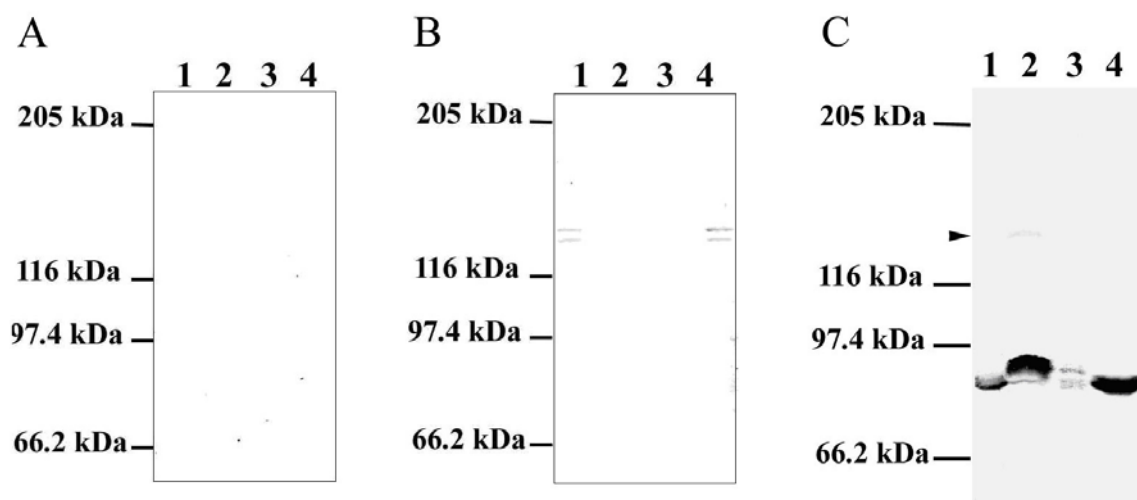


Figura 13. Imunodeteção cromogênica (fosfatase alcalina, NBT/BCIP) com os anticorpos anti-drb e anti-KM⁺ em frações purificadas de p83 a partir de cérebro, submetidas a SDS-PAGE. *Lanes:* 1 - homogeneizado total de cérebro para preparação de p83; 2 - fração DEAE da preparação de p83 a partir de cérebro; 3 - fração Phenyl da preparação de p83 a partir de cérebro; 4 - homogeneizado total de cerebelo para preparação de drebrina. Padrão de peso molecular: Sigma 6H. Em **A**: ausência de anticorpo primário. **B**: com anticorpo anti-drebrina. **C**: Com anticorpo anti-KM⁺ (a cabeça de seta aponta para a banda de 140 kDa na canaleta 2).

A figura 14 mostra os resultados obtidos para a imunodeteção cromogênica entre o anti-drba e o homogeneizado total de cerebelo, e frações purificadas da preparação de p83 de cerebelo, em DEAE-Sepharose (amostras provenientes de preparações realizadas por Fabíola Singaretti de Oliveira e Prof. Dr. Antonio R Martins). O anticorpo anti-drebrina reconhece o dublete com massa molecular aparente de 140 kDa, no controle positivo para p83 (homogeneizado total), semelhante ao controle positivo para drebrina, embora com marcação menos intensa. Em uma das frações purificadas de cerebelo, há a marcação de uma banda com massa molecular aparente de aproximadamente 140 kDa. A mesma fração em imunodeteção com o anti-KM⁺, após SDS-PAGE, apresenta uma banda com alto peso molecular (cerca de 160 kDa), além da banda de 83 kDa.

As mesmas amostras do processo de purificação de p83 de cerebelo foram submetidas à imunodeteção cromogênica com o anti-KM⁺, que confirmou a presença de p83 nas frações (membrana não apresentada).

Esses resultados sugerem que drebrina pode estar presente em frações purificadas de p83 e indicam que p83 e drebrina são proteínas diferentes.

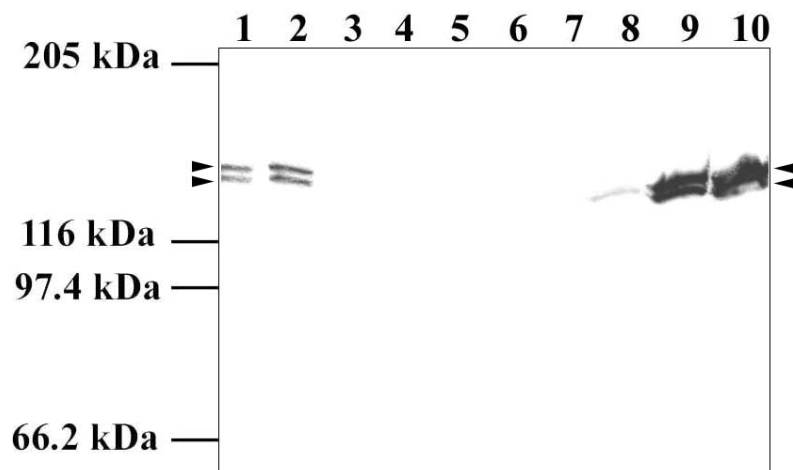


Figura 14. Imunodeteção cromogênica (fosfatase alcalina, NBT/BCIP) com o anti-drb em frações purificadas de p83 a partir de cerebelo, submetidas a SDS-PAGE. *Lanes:* 1 e 2 - homogeneizado total de cerebelo para preparação de p83; 3 a 8 - frações DEAE da preparação de p83 a partir de cerebelo; 9 e 10 - homogeneizado total de cerebelo para preparação de drebrina. Padrão de peso molecular: Sigma 6H. Cabeças de setas: apontam para banda dublete correspondente ao peso molecular da drebrina, 140 kDa.

4.5 Produção da proteína recombinante a partir da seqüência do clone anti-KM⁺ imunorreativo identificado no *screening* da biblioteca de expressão de cDNA de cerebelo de rato

4.5.1 Fragmento amplificado a partir da seqüência do clone 9B e subclonagens realizadas

A figura 15 ilustra a região da seqüência do clone anti-KM⁺ imunorreativo, que foi utilizada para amplificação, por PCR, a partir da biblioteca de expressão de cDNA de cerebelo de rato (*Lambda zapII*[®] *rat cerebellum premade library*, Stratagene) e expressão da proteína recombinante em *E. coli*. Os oligonucleotídeos desenhados estão posicionados na figura.

O fragmento amplificado por PCR a partir da alíquota do clone 9B (alíquota estocada a partir de placa de *screening*, mantida em tampão SM) apresentou massa molecular correspondente à esperada (aproximadamente 0,3 Kb), visualizado em gel de agarose 1,5% (figura 16). Nenhum outro fragmento foi amplificado, confirmando a especificidade das condições utilizadas para a PCR.

O seqüenciamento (a partir do plasmídeo construído na subclonagem: pGEM-T/fragmento amplificado) confirmou a identidade da seqüência.

O plasmídeo construído na subclonagem foi digerido com as enzimas de restrição XhoI e HindIII, para retirada do inserto a partir do vetor de subclonagem (pGEM-T) e posterior ligação no vetor de expressão (pAE).

A figura 17 mostra a análise pelo método de extração com fenol-clorofórmio, dos clones resultantes da transformação de DH5 α com a construção pAE/fragmento amplificado a partir do clone 9B. Foram analisados 10 clones, em gel de agarose, dos quais 7 se mostraram positivos e cuja seqüência foi confirmada por seqüenciamento.

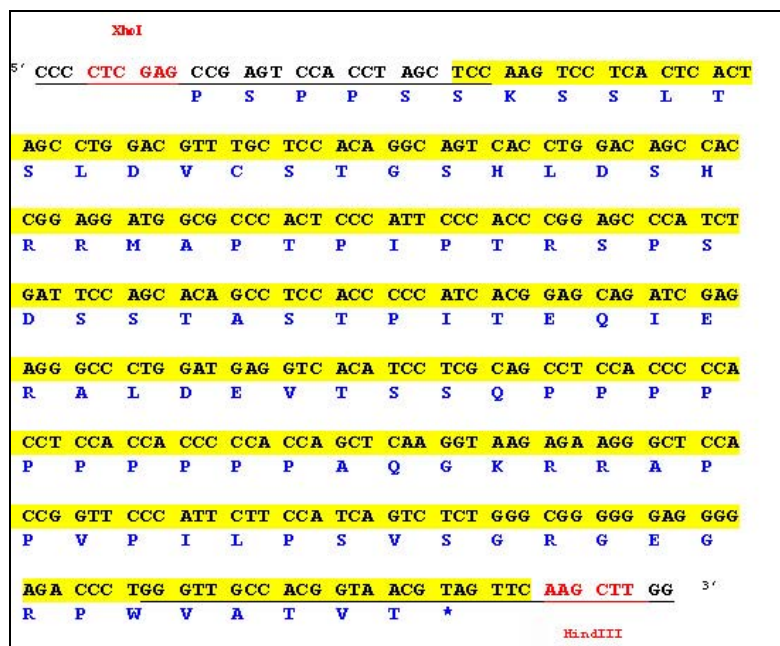


Figura 15. Região da seqüência do clone anti-KM⁺ imunorreativo, que foi utilizada para amplificação, por PCR, a partir da biblioteca de expressão de cDNA de cerebelo de rato (*Lambda zapII[®] rat cerebellum premade library, Stratagene*) e expressão da proteína recombinante em *E. coli*. Primers: sublinhados; Sítios de restrição: **em vermelho**; região que alinha com banco de dados do NCBI (gene drba, drebrina A, *Mus musculus*: gi[19909850] dbj [AB028740.1]): **realçada em amarelo**; tradução: **em azul**.

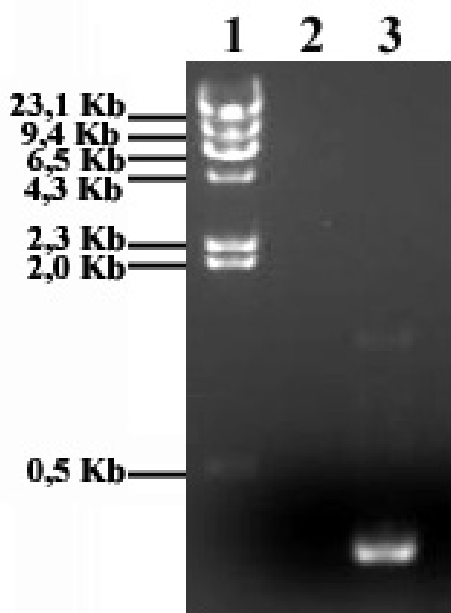


Figura 16. Gel de agarose a 1,5%, da eletroforese do fragmento amplificado por PCR a partir do clone 9B, para produção da proteína recombinante, visualizado em transiluminador de UV. Lanes: 1, marcador de peso molecular λ Hind III (Invitrogen); 2, branco (H_2O MilliQ autoclavada utilizada como *template*); 3, produto PCR, contendo aproximadamente 0,3 Kb (*template*: alíquota do clone 9B - alo de lise de placa de *screening* - em tampão SM).

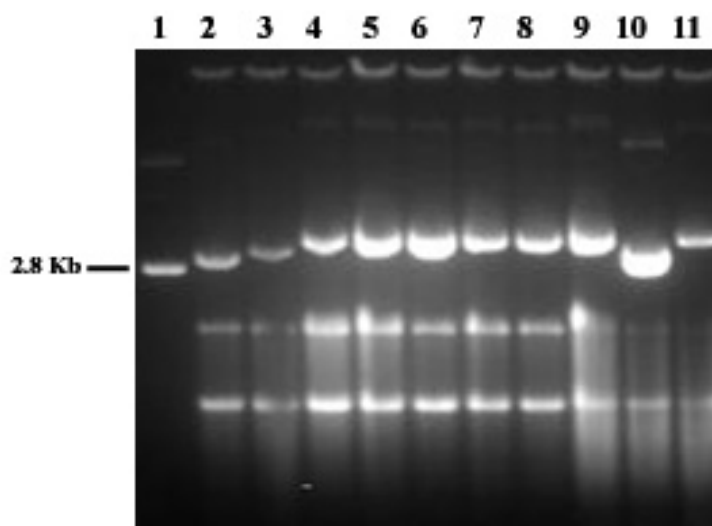


Figura 17. Gel de agarose a 1,5 % (eletroferograma), para verificar a ligação do fragmento amplificado a partir do clone 9B ao vetor de expressão (pAE). Amostras preparadas por extração fenol-clorofórmio. Visualização em transiluminador UV. Lanes: 1, pAE vazio (obtido de miniprep); 2, 3 e 10, clones negativos, contendo apenas o vetor vazio; 4 a 9 e 11, clones positivos, contendo a ligação inserto + vetor.

4.5.2 Expressão e purificação da proteína recombinante

A massa molecular esperada para a proteína recombinante é de 10,72 kDa e o PI é 8.61 (calculados com as ferramentas do ExPasy), correspondente à proteína madura e às seis histidinas da cauda N-terminal, inseridas para facilitar a purificação.

Em SDS-PAGE, frações da purificação das preparações solúvel e insolúvel do lisado de *E. coli* BL21-(DE3)-RP induzida, exibiram proteínas com massa molecular aparente próxima à esperada para a proteína recombinante, entretanto, em quantidade muito baixa, e não reativas ao corante com afinidade à cauda de histidina. (Figuras 18 e 19).

Na eluição da proteína recombinante a partir da preparação solúvel, verificamos por SDS-PAGE, a presença de uma banda de aproximadamente 10 kDa, em várias frações (figura 18, B e C). A banda apareceu muito fracamente nos géis, e em presença de contaminantes (figura 18, B). Quando o mesmo gel foi corado com o corante de afinidade pela cauda de histidina, não se obteve marcação positiva dessas bandas de ~10 kDa, mas sim uma marcação muito tênue corresponde à bandas SDS-PAGE de maior massa molecular (~18 kDa).

Na eluição da preparação insolúvel (a partir dos corpúsculos de inclusão solubilizados em 8M uréia), verificou-se na fração 15, uma banda SDS-PAGE um pouco mais intensa que na preparação solúvel e com massa molecular aparente pouco maior que 14 kDa (figura 19, B).

A pequena discrepância entre a massa molecular predita e a massa molecular aparente em SDS-PAGE, é aceitável, devido ao grande número de códons para resíduos negativos na seqüência nucleotídica utilizada para a produção da proteína recombinante. Entretanto, havia ainda muitos contaminantes nessa fração da purificação e quantidade muito baixa da proteína. Usou-se 40 µl da fração para visualizar-se a banda fracamente corada com Comassie, na figura 19-B. Quando o mesmo gel foi corado com o corante de afinidade para histina, a intensidade de marcação da banda não foi maior que a marcação de fundo em outras

proteínas (qualquer histidina presente no gel é corada, já que essa é a única especificidade do corante). O controle positivo, uma proteína recombinante com cauda de histidina, altamente expressa em *E. coli*, produzida no mesmo vetor de expressão, de massa molecular aparente 14 kDa, ficou fortemente marcada.

Assim, mesmo que a banda em questão correspondesse à proteína recombinante que tentamos produzir, não havia quantidade suficiente sequer para verificar sua imunorreatividade com o anticorpo anti-KM⁺ e um anticorpo anti-drebrina, quanto mais para a produção de anticorpo recombinante.

Nas preparações de corpúsculos de inclusão, a etapa de renaturação resultou sempre em preparação precipitada. Portanto, é possível que não se tenha identificado proteínas na preparação proveniente dos corpúsculos, devido ao insucesso no processo de renaturação.

Outros clones foram usados para indução da expressão e purificação da proteína recombinante, mas novamente sem sucesso.

Outra abordagem está em andamento para tentar produzir a proteína recombinante em colaboração com o Prof. Dr. Paulo Lee Ho. Definimos experimentos para tentar produzi-la como proteína de fusão com outra proteína recombinante abundantemente expressa. Se for possível produzi-la, a mesma será utilizada para produção de anticorpo, que será por sua vez usado na elucidação de questões abertas neste trabalho, a respeito da identidade e papel da proteína p83.

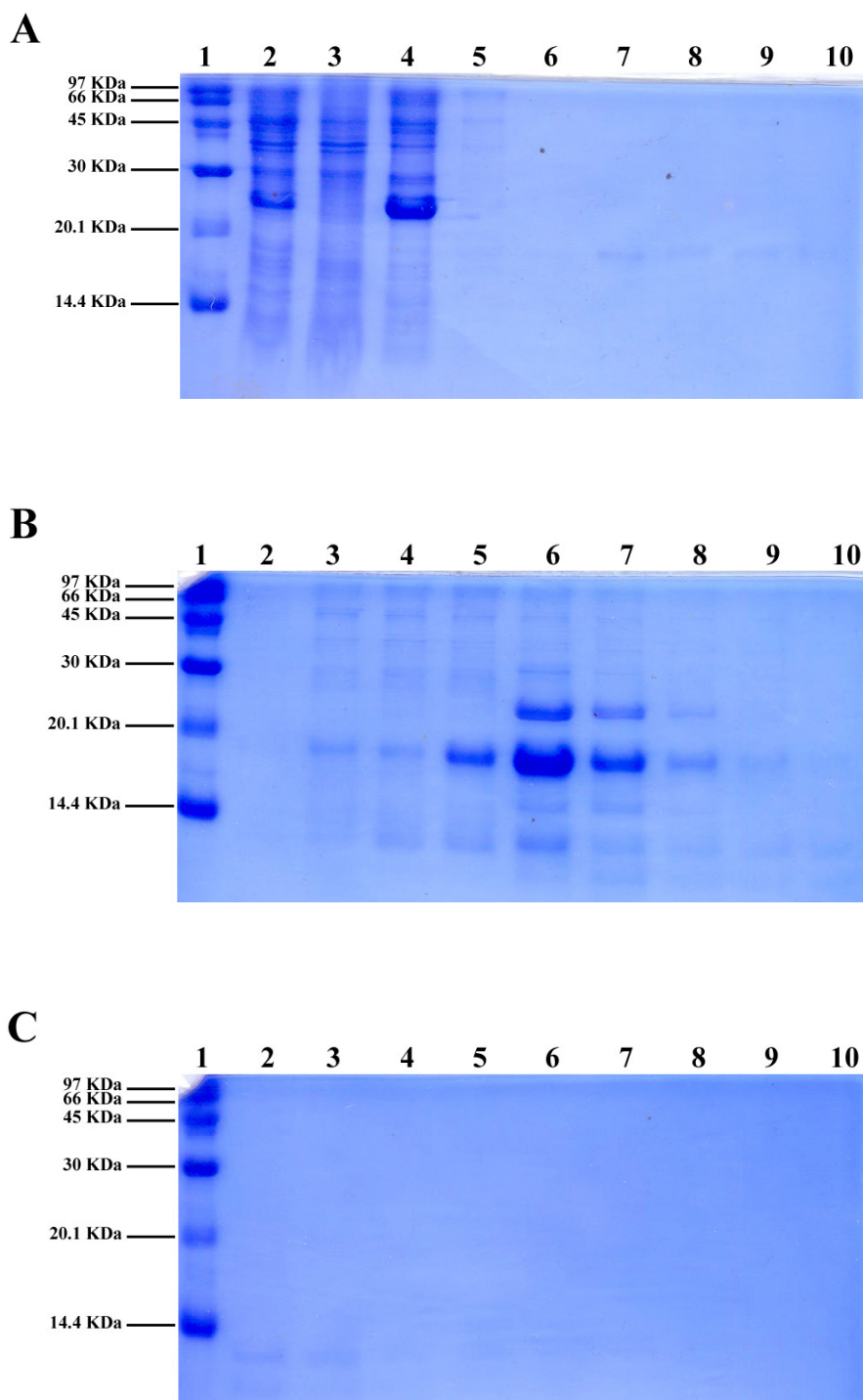


Figura 18. Gel de poliacrilamida a 18% contendo frações das etapas de purificação da proteína recombinante a partir da fração solúvel do lisado de *E. coli* BL21-(DE3)-RP em coluna de Ni²⁺ sepharose. **A.** Lanes: 1, padrão de peso molecular Biorad Low Range; 2, lisado da *E. coli* (amostra aplicada na coluna). 3, *flow through* (entrada da amostra); 4 a 7, lavagens da coluna com 5mM, 20mM, 40mM e 60mM de imidazol, respectivamente; 8 a 10, frações 1, 3 e 4, respectivamente, da eluição com 1M imidazol (1ml/fração). **B.** Lanes: 1, padrão de peso molecular Biorad Low Range; 2 a 10, frações 5 a 13, respectivamente, da eluição com 1M imidazol (1ml/fração). **C.** Lanes: 1, padrão de peso molecular Biorad Low Range; 2 a 10, frações 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27 e 29, respectivamente, da eluição com 1M imidazol (1ml/fração).

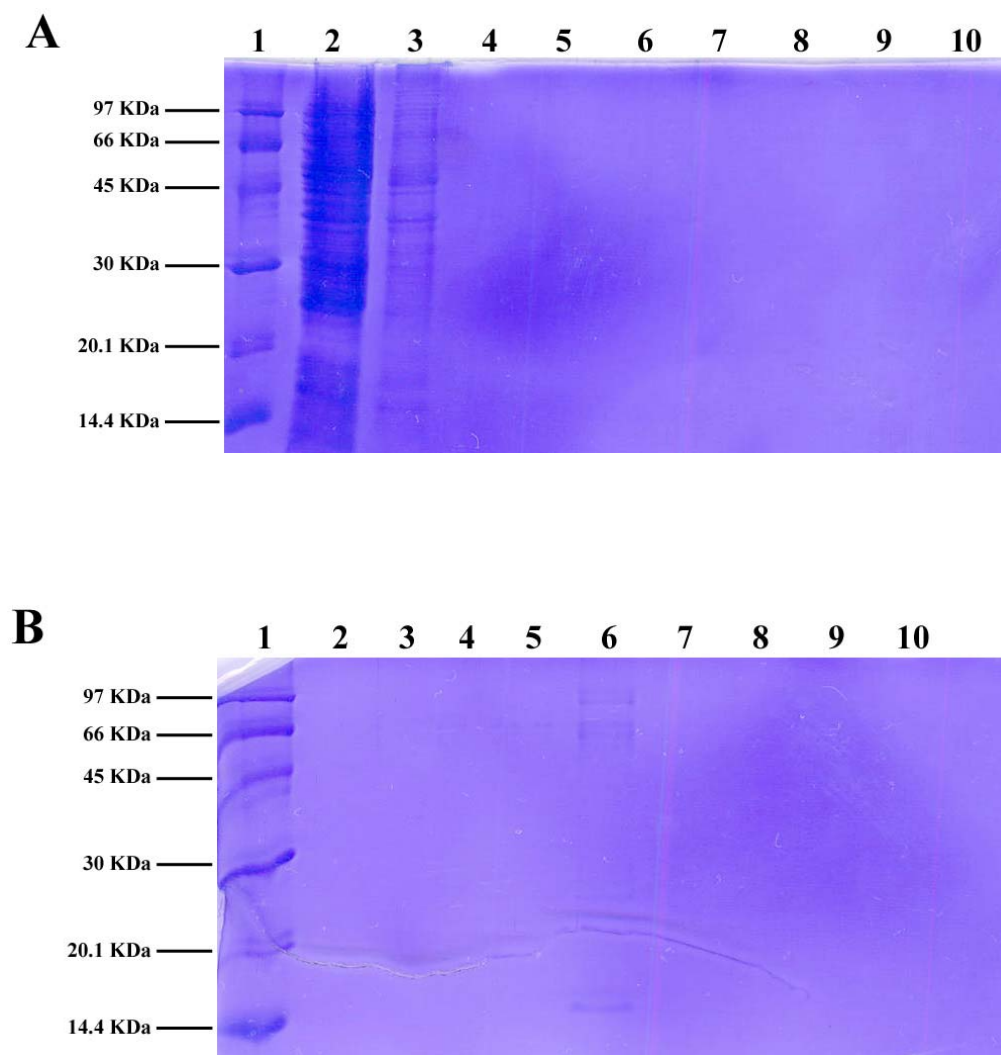


Figura 19. Gel de poliacrilamida a 18% contendo frações das etapas de purificação da proteína recombinante a partir dos corpúsculos de inclusão solubilizados com 8M uréia, a partir da fração particulada do lisado de *E. coli* BL21-(DE3)-RP em coluna de Ni²⁺ sepharose. **A.** Lanes: 1, padrão de peso molecular Biorad Low Range; 2, corpúsculos de inclusão solubilizados em 8M uréia (amostra aplicada na coluna). 3, *flow through* (entrada da amostra); 4 a 7, lavagens da coluna com 5mM, 20mM, 40mM e 60mM de imidazol, respectivamente; 8 a 10, frações 1, 3 e 5, respectivamente, da eluição com 1M imidazol (1ml/fração). **B.** Lanes: 1, padrão de peso molecular Biorad Low Range; 2 a 10, frações 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 e 23, respectivamente, da eluição com 1M imidazol (1ml/fração).

***PARTE I - SCREENING DE UMA BIBLIOTECA DE EXPRESSÃO DE cDNA DE
CEREBELO DE RATO USANDO-SE COMO SONDA O ANTICORPO ANTI-KM⁺***

5. CONCLUSÕES

Desenvolvemos um método eficiente para pré-adsorção de anticorpos contra proteínas de *E. coli*. imobilizadas em membranas de nitrocelulose. O método é útil para o *screening* de bibliotecas de expressão usando-se anticorpos como sonda.

O método de recuperação antigênica padronizado para imunodeteção de p83 com o anti-KM⁺, permitiu identificar um clone anti-KM⁺ imunorreativo no *screening* da biblioteca de expressão de cDNA de cerebelo de rato.

A análise molecular dos subclones λ ZAPII anti-KM⁺ imunorreativos resultou no alinhamento da seqüência com fragmentos internos das isoformas adulta e embrionária da drebrina para várias espécies, inclusive de *Rattus norvegicus* e *Mus musculus*. A seqüência também alinhou com drebrinas preditas. O alinhamento da seqüência da proteína com o genoma do rato confirmou identidade de 99% (420 bp) com o gene da drebrina.

Os resultados de *western blot* não permitiram afirmar se p83 corresponde a drebrina ou a alguma isoforma.

O *screening* da biblioteca de expressão de cDNA de cerebelo de rato usando o anticorpo anti-KM⁺ não nos permitiu identificar o cDNA de p83 mas levou-nos à drebrina, uma proteína com importante participação em processos de crescimento neural e na formação de sinapses e associada com proteínas importantes para a manutenção da forma e estabilidade dos terminais sinápticos, embora pouco explorada quanto à função na homeostase da atividade eletrofisiológica cerebral. Assim, decidimos investigar a expressão de drebrina em tecidos humanos epiléticos. O delineamento e os resultados dessa investigação estão apresentados a seguir, na PARTE II do presente trabalho.

***PARTE I - SCREENING DE UMA BIBLIOTECA DE EXPRESSÃO DE cDNA DE
CEREBELO DE RATO USANDO-SE COMO SONDA O ANTICORPO ANTI-KM⁺***

6. ANEXOS

6.1 ANEXO I: VERIFICAÇÃO DA FUNCIONALIDADE DA BIBLIOTECA E DO TÍTULO DE PLAQUEAMENTO ADEQUADO, PARA *SCREENING* USANDO-SE ANTICORPOS COMO SONDA

6.1.1 MÉTODOS E TÉCNICAS EMPREGADOS

6.1.1.1 *Screening* da biblioteca de expressão de cDNA de cerebelo de rato (*Lambda zapII*[®] *rat cerebellum premade library*, *Stratagene*) em baixo título (halos isolados) e sem recuperação antigênica, com o anticorpo anti-GFAP (Dako) pré-adsorvido contra proteínas de *E. coli* XL1-Blue MRF'

Diante dos resultados negativos obtidos nos primeiros *rescreenings* do clone positivo conseguido e no novo *screening* mesmo após tratamento de recuperação antigênica, definiu-se outra estratégia. Decidiu-se partir ao *screening* da biblioteca de expressão de cDNA de cerebelo de rato (*Lambda zapII*[®] *rat cerebellum premade library*, *Stratagene*) para identificação de uma proteína estrutural, conhecida, abundante no cerebelo de rato, com anticorpo disponível comercialmente que permite boa detecção. Pretendeu-se, assim, testar a funcionalidade da biblioteca e do procedimento padronizado para *screening*.

Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) foi a proteína escolhida por ser abundantemente expressa no cerebelo e pela disponibilidade de anticorpo comercial, que apresenta forte marcação mesmo em grande diluição. Além disso, frações ricas em GFAP podem ser obtidas de preparações protéicas feitas a partir de cerebelo e cérebro (Huston, 1977; Fisher, 1989; Fukuyama, 1991).

6.1.1.1.1 Preparo de GFAP a partir de cerebelo de rato *wistar*, como controle positivo para o *screening* com anti-GFAP (adaptado a partir de Fukuyama, 1991)

O protocolo descrito a seguir resulta numa fração de proteínas do citoesqueleto, rica em GFAP.

- Homogeneização de cada 8 g de tecido em 200 ml de tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7.4) contendo 5 mM de MgCl₂, 5mM de DTT e 1 mM de PMSF
- Centrifugação por 10' a 2000 rpm
- Descarte do sobrenadante
- Ressuspensão do *pellet* em 40 ml do mesmo tampão contendo 8 M de uréia
- Agitação suave a 4°C durante 4 horas
- Centrifugação a 10000 rpm durante 15'
- Recuperação do sobrenadante e acréscimo de 6 partes de etanol gelado (v/v)
- Centrifugação por 10' a 2000 rpm
- Ressuspensão do *pellet* em 15 ml de H₂O Milli-Q
- Diálise em H₂O Milli-Q em volume 2X maior que o volume final

Após dosagem de proteínas (Lowry *et al.*, 1955) e verificação da qualidade do material por eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) em gel de poliacrilamida, eletrotransferência para membrana de nitrocelulose e imunodeteção cromogênica com anti-GFAP, liofilizou-se a amostra para estoque.

6.1.1.1.2 Titulação do anticorpo anti-GFAP para detecção de GFAP a partir de preparação de proteínas do citoesqueleto de cerebelo, imobilizada em membrana de nitrocelulose Hybond C-Extra (Amersham)

Aplicou-se 50 µg da preparação em cada canaleta de géis de poliacrilamida em gradiente de 6-20% para eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE), eletrotransferência e imunodeteção cromogênica com anti-GFAP. Os protocolos de

eletroforese, eletrotransferência e imunodeteção cromogênica foram feitos como descrito no item 3.1.1.1, diferindo-se, para a imunodeteção cromogênica, no anticorpo primário, coelho anti-GFAP de cérebro bovino (Dako).

Para se observar qual o título adequado para melhor detecção de GFAP com menos sinais inespecíficos na estrigência definida para o anticorpo anti-KM⁺, testou-se várias diluições do anti-GFAP na imunodeteção cromogênica: 1:2000, 1:4000, 1:6000 e 1:8000.

6.1.1.1.3 Pré-adsorção do anticorpo anti-GFAP contra proteínas de *E. coli* XL1-Blue MRF' immobilizadas em membrana de nitrocelulose (modificado a partir de Sambrook & Russell, 2001)

Em *western blot* das frações solúvel e particulada do lisado de XL1-Blue MRF' com o anticorpo anti-GFAP verificou-se que o mesmo reconhece uma série de proteínas da bactéria nas condições de estrigência e diluições utilizadas. Detectaram-se proteínas de *E. coli* XL1-Blue MRF' com forte intensidade de marcação e peso molecular muito próximo ao do GFAP. Embora isso pudesse resultar em perda do título do anticorpo recuperado da pré-adsorção contra proteínas de *E. coli*, trata-se de um anticorpo comercial usado em grande diluição. Por isso, não se trabalhou com a estrigência antes de se fazer a pré-adsorção.

Assim, o anticorpo anti-GFAP foi pré-adsorvido e retitulado para detecção de GFAP, antes de ser usado em *screening* da biblioteca de expressão de cDNA de cerebelo de rato. O protocolo utilizado para pré-adsorção foi o mesmo desenvolvido para pré-adsorção do anticorpo anti-KM⁺, descrito no item 3.1.1.2.

6.1.1.1.3.1 Verificação do sucesso da pré-adsorção do anti-GFAP contra proteínas de *E. coli* XL1-Blue MRF' immobilizadas em membrana de nitrocelulose e de sua capacidade de detecção de GFAP

Fizeram-se diluições do anti-GFAP pré-adsorvido para uma concentração final (a partir da alíquota original) de 1:4000 e 1:8000 (em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, contendo 150 mM de NaCl e soroalbumina bovina 1 µg/µl). As alíquotas diluídas foram utilizadas para imunodeteccção cromogênica de GFAP e de proteínas de *E. coli* XL1-Blue MRF'. (Para protocolos de eletroforese, eletrotransferência e imunodeteccção de GFAP e proteínas de *E. coli* XL1-Blue MRF' ver item 3.1.1.1).

6.1.1.1.4 Procedimento de *Screening*

Todas as etapas do *screening*, propriamente dito: preparo de bactéria hospedeira, *plating phage*, indução da expressão com IPTG 10 mM, *plaque lifting* e imunodeteccção cromogênica, foram feitas como descrito no item 3.1.1.1. **Com exceção do título de plaqueamento** que foi feito a **4000pfu/placa** e não a 200000pfu/placa. Usou-se este título baixo para se obter **halos de lise isolados**. Decidiu-se fazer o *screening* com o anticorpo anti-GFAP de modo a se obter alos isolados nas placas porque se constatou evidências de que alto título de fagos atrapalhe a imunodeteccção, possivelmente devido a interações entre as proteínas dos halos de lise.

6.1.1.1.5 *Rescreening* de clone λZAPII anti-GFAP imunorreativo

Todos os clones que exibiram sinal imunorreativo, foram retirados das placas com uma área de segurança em volta (~1 cm de diâmetro). O fragmento de top ágar correspondente a cada clone foi colocado separadamente em tubos de microcentrífuga em 500 µl de tampão SM [5.8 g de NaCl, 2 g de MgSO₄.H₂O, 50 ml de 1M Tris-HCl (pH 7.5), 5 ml

de 2% gelatina (p/v) e H₂O deionizada q.s.p. 1L] contendo clorofórmio 5% (v/v). Cada tubo foi agitado em *vortex* por 30'' para permitir a liberação das partículas do fago no tampão SM. Os tubos foram incubados a 4°C durante dezesseis horas, antes de serem utilizados. Adicionou-se dimetilsulfóxido (DMSO) para uma concentração final de 7% e estocou-se os clones a -80°C.

Para o *rescreening*, escolheu-se um dos clones, por meio da comparação da intensidade de marcação do alo de lise com a de bandas específicas e inespecíficas identificadas com os controles positivo e negativo da imunodeteção. Seguiram-se as mesmas condições definidas para o *screening*.

6.1.1.1.6 Análise do clone λZAPII anti-GFAP imunorreativo

O clone submetido ao *rescreening* foi o utilizado para análise.

6.1.1.1.6.1 Excisão *in vivo* do fagomídeo pBluescript do vetor λZAPII, do clone anti-GFAP imunorreativo escolhido para análise

Como descrito no item 3.1.4.1

6.1.1.1.6.2 Extração de DNA plasmidial por lise alcalina com SDS em pequena escala (modificado a partir de Sambrook & Russell, 2001) – preparação a partir dos clones de *E. coli* XL1-Blue MRF' transformada com pBluescript excisado do clone λZAPII anti-GFAP imunorreativo

Dos clones obtidos no plaqueamento das bactérias transformadas com o pBluescript excisado do clone λZAPII GFAP imunorreativo, 14 foram submetidos às primeiras análises. A extração de DNA plasmidial foi feita de acordo com o protocolo a seguir.

- Inocular colônias isoladas de clones de *E. coli* XL1-Blue MRF' transformadas com o pBluescript, a 37°C por 16 horas em 5 ml de meio LB-ampicilina (10mg/ml)
- Coletar as células por centrifugação a 14000 rpm por 5' (microcentrífuga Eppendorf, modelo 5417 R)
- Ressuspender as células em 300 µl de tampão Tris-HCL 50 mM pH 8.0 contendo 10 mM EDTA e 100 µg/ml de RNase A
- Incubar a 25°C durante 15'
- Adicionar 300 µl de NaOH 200 mM contendo 1% de SDS, agitar em *vortex* e incubar a 25°C por 5'
- Adicionar 300 µl de Acetato de Potássio 3M pH 5.5, agitar suavemente
- Centrifugar a 14000 rpm durante 10' a 4°C. Transferir o sobrenadante para novo tubo
- Adicionar 400 µl de isopropanol ao sobrenadante obtido e centrifugar a 14000 rpm por 10' a 25°C
- Descartar o sobrenadante com cuidado, adicionar 700 µl de etanol 70% gelado e centrifugar a 14000 rpm por 5' a 4°C
- Descartar o etanol, secar o *pellet* a 37°C durante uma hora e ressuspender em 25 µl de tampão Tris-HCl 10 mM pH 7.5 contendo 1 mM de EDTA
- Armazenar a -20°C

A qualidade do material foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1%. Usou-se 3 µl de cada amostra diluídos em 6 µl de H₂O MilliQ autoclavada.

6.1.1.1.6.3 *Polymerase Chain Reaction* (PCR) do cDNA dos clones pBluescript/ λ ZAPII anti-GFAP imunorreativos – para verificação da presença do inserto

Utilizaram-se reagentes para PCR do *kit* que acompanha a Platinum[®] *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen[™] Life Technologies). A reação utilizada foi adaptada a partir do protocolo sugerido pelo fabricante.

Reação por tubo:

- 2 μ l de 10X PCR *buffer*
- 0,6 μ l de 50 mM MgCl₂
- 1,5 μ l de 10 mM dNTPs *mix*
- 1,5 μ l de *Primer* M13 (10 μ M)
- 0,2 μ l de Platinum[®] *Taq* DNA Polymerase
- 2 μ l da amostra de DNA (obtido a partir de preparação em pequena escala de DNA plasmidial de clones *E. coli* XL1-Blue MRF⁺ transformada com pBluescript excisado do clone λ ZAPII anti-GFAP imunorreativo)
- q.s.p. 15 μ l de H₂O MilliQ

Como foi feita mais de uma reação, preparou-se uma mistura com a quantidade de reagentes suficiente para o número de amostras analisadas, sem se colocar a amostra de DNA. Colocou-se 13 μ l da mistura de reagentes em cada tubo (tubos Eppendorf com capacidade para 0,5 ml, modelo *PCR clean*) e acrescentou-se 1,0 μ l de uma amostra diferente de DNA a cada um. Para cada amostra de DNA fizeram-se reações com as formas de leitura nas direções direta e reversa do *Primer* M13.

O termociclador utilizado foi o modelo *Mastercycler gradient* da Eppendorf.

Programa de ciclagem:

- 1) 94°C, 04' (denaturação inicial)
- 2) 94°C, 45" (denaturação)

3) 55°C, 45" (pareamento)

4) 72°C, 1'30" (extensão). CICLAGEM: repetição dos passos 2 a 4 por 35 vezes.

5) 72°C, 5' (extrusão)

Observação: a temperatura da placa superior do termociclador foi mantida a 103°C, para impedir a evaporação dos reagentes da PCR contidos nos tubos e evitar o uso de óleo mineral.

Completada a ciclagem, os tubos foram centrifugados e congelados até momento de uso.

6.1.1.1.6.4 Eletroforese dos produtos PCR em gel de agarose

Os produtos PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, como descrito no item 3.1.4.3.1. Os clones que continham insertos foram submetidos ao seqüenciamento.

6.1.1.1.6.5 Seqüenciamento dos clones pBluescript portadores de insertos

Os clones em que se pôde verificar, por meio da PCR, a presença de inserto, foram seqüenciados por eletroforese de capilaridade no seqüenciador ABI3100 (Applied Biosystems), usando-se o kit Big-dye terminator 3.0 (Applied Biosystems). As reações foram preparadas de acordo com instruções do fabricante. Usou-se o *Primer* M13 na direção direta de leitura (*primer foward*).

As reações de seqüenciamento foram feitas no laboratório do Prof. Vanderlei Rodrigues, no Departamento de Imunologia da FMRP-USP.

6.1.1.1.7 Análise das seqüências por bioinformática para identificação dos cDNAs isolados a partir do *screening* da biblioteca de expressão de cDNA de cerebelo de rato (*Lambda zapII*[®] *rat cerebellum premade library*, Stratagene) com o anticorpo anti-GFAP

As seqüências foram analisadas em bancos de dados do *National Institute of Health* (NIH). Usaram-se os recursos do software de bioinformática do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

6.1.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1.2.1 *Screening* da biblioteca de expressão de cDNA de cerebelo de rato (*Lambda zapII*[®] *rat cerebellum premade library*, Stratagene) em baixo título (halos isolados) e sem recuperação antigênica, com o anticorpo anti-GFAP (Dako) pré-adsorvido contra proteínas de *E. coli* XL1-Blue MRF'

Através de comparação de resultados com grupos de pesquisa que fazem *screening* de bibliotecas de expressão, constatamos evidências de que embora plaqueamento de alto título de fagos teoricamente aumente a representatividade da biblioteca por garantir expressão de maior número de clones por área da placa de cultura, por outro lado, pode atrapalhar a imunodeteção, o que na prática para *screenings* com anticorpos como sondas, pode ser nada vantajoso, pelo menos para identificação de genes que codificam proteínas que formam complexos macromoleculares [os trabalhos de Kim *et al.* (1999) e Song *et al.* (2002) listam diversas referências sobre proteínas que formam complexos macromoleculares com *Heat Shock Protein 90* e *Neural Nitric Oxide Synthase*, respectivamente].

Essa sugestão surgiu da observação do aspecto isolado, na placa de *screening*, do único clone imunorreativo para anti-KM⁺, identificado entre milhões de clones após tratamento de recuperação antigênica, e do acompanhamento da dificuldade em se purificar p83 devido a suas fortes interações com outras proteínas. Analisando-se visualmente imagens

de membranas com sinais imunorreativos de clones identificados a partir de bibliotecas de expressão por outros grupos de pesquisa, observou-se que os mesmos também apresentavam aspecto isolado. As placas de *screening* em alta confluência não são completamente homogêneas, apresentam regiões mais e menos densas, com áreas contendo clones aglomerados e poucos isolados.

As proteínas de um halo de lise em contato umas com as outras na placa de cultura estão num ambiente que permite interações e formação de complexos proteicos, de forma a poder esconder epítopos detectáveis pelos anticorpos usados como sonda. Além disso, a não glicosilação das proteínas de mamífero pela *E. coli* pode alterar o *folding* correto das mesmas, o que possibilitaria a ocorrência de dobramentos e interações que escondam epítopos. Dependendo do complexo formado é possível que mesmo a recuperação antigênica não seja suficiente para expor epítopos escondidos. Isso pode ter acontecido no segundo *screening* com recuperação antigênica para p83 feito em alta confluência, usando-se o anticorpo anti-KM⁺ como sonda. Não se identificou outro clone positivo, como no primeiro *screening* com recuperação antigênica.

Por isso no *screening* com o anticorpo anti-GFAP, onde se pretendeu testar a funcionalidade da biblioteca diante da metodologia padronizada para *screening*, fez-se o plaqueamento dos fagos com título que garantiu halos isolados nas placas.

6.1.2.1.1 Capacidade de detecção de GFAP a partir de uma preparação de citoesqueleto com o anticorpo anti-GFAP - definição de controle positivo e título de anticorpo anti-GFAP adequado para o *screening*

A preparação de citoesqueleto a partir de cerebelo de rato rendeu aproximadamente 150 mg de proteína total, em 25 ml de homogeneizado, ou seja, 6 mg/ml. O material exibiu forte marcação de GFAP (banda de 49 kDa) mesmo com a diluição de 1:8000 do anticorpo

anti-GFAP (figura 20). Observam-se outras bandas marcadas fracamente porque o anticorpo anti-GFAP utilizado não é monoespecífico. Assim, definiu-se como controle positivo para o *screening* com o anticorpo anti-GFAP, o uso de 50 μ g de preparação de citoesqueleto, imobilizada em membrana de nitrocelulose Hybond C-Extra (Amersham) por eletrotransferência após SDS-PAGE.

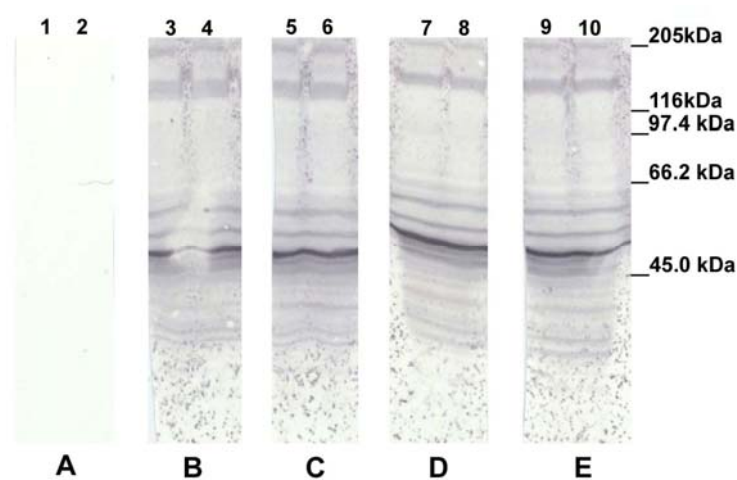


Figura 20. Imunodeteção cromogênica (fosfatase alcalina, NBT/BCIP) de GFAP a partir de preparação de citoesqueleto com várias diluições de anti-GFAP (protocolos descritos nos itens 3.2.1 e 3.2.2). A: controle negativo, ausência de anti-GFAP. B: diluição 1:2000 do anti-GFAP. C: diluição 1:4000 do anti-GFAP. D: diluição 1:6000 do anti-GFAP. E: diluição 1:8000 do anti-GFAP. *Lanes:* 1 a 10, 50 μ g em cada *lane* da preparação de citoesqueleto a partir de cerebelo de rato. Padrão de peso molecular Biorad Broad Range.

6.1.2.2 Anticorpo anti-GFAP pré-adsorvido contra proteínas de *E. coli* XL1-Blue MRF' adequado para detecção de GFAP (fração do citoesqueleto)

O anticorpo anti-GFAP reconhece proteínas nas frações solúvel e particulada do lisado de *E. coli* XL1-Blue MRF', com peso molecular próximo aos 49 kDa do GFAP (figura 21).

A pré-adsorção do anticorpo anti-GFAP contra proteínas de *E. coli* submetidas a SDS-PAGE e eletrotransferência para membranas de nitrocelulose Hybond C-Extra (Amersham) foi eficiente. Mesmo em diluição 1:8000, manteve-se forte marcação de GFAP, e não se detectou proteínas de *E. coli* (figuras 22 e 23, respectivamente).

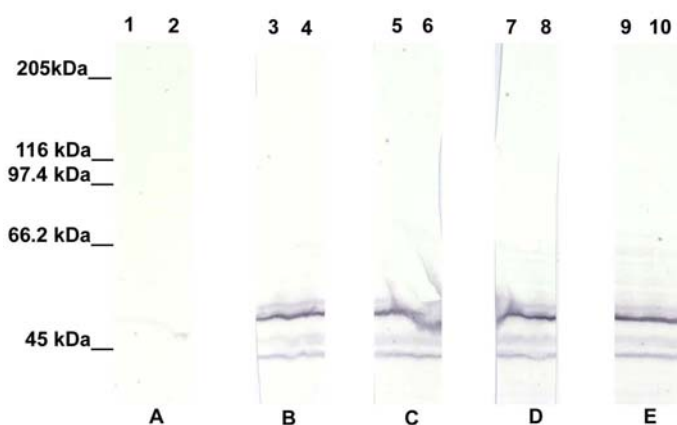


Figura 21. Imunodeteção cromogênica (fosfatase alcalina, NBT/BCIP) de proteínas de *E. coli* XL1-Blue MRF' a partir das frações solúvel e particulada de seu lisado submetidas a SDS-PAGE, usando-se várias diluições de anti-GFAP (protocolo descrito no item 4.2.3). A: controle negativo, ausência de anti-GFAP. B: diluição 1:2000 do anti-GFAP. C: diluição 1:4000 do anti-GFAP. D: diluição 1:6000 do anti-GFAP. E: diluição 1:8000 do anti-GFAP. Lanes: 1, 3, 5, 7 e 9, fração solúvel do lisado de XL1-Blue MRF'; 2, 4, 6, 8 e 10, fração particulada do lisado de XL1-Blue MRF'. Padrão de peso molecular Biorad Broad Range.

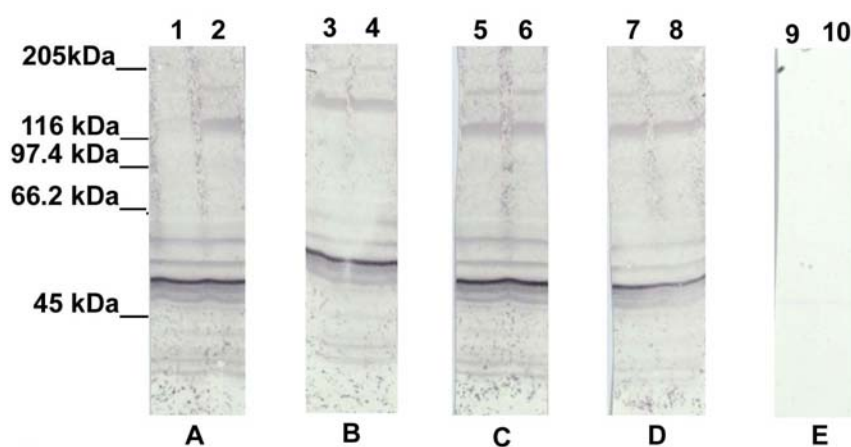


Figura 22. Imunodeteccção cromogênica (fosfatase alcalina, NBT/BCIP) de GFAP a partir de preparação de citoesqueleto com várias diluições de anti-GFAP pré-adsorvido contra proteínas de *E. coli* XL1-Blue MRF' eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose. A: diluição 1:2000 do anti-GFAP. B: diluição 1:4000 do anti-GFAP. C: diluição 1:6000 do anti-GFAP. D: diluição 1:8000 do anti-GFAP. E: controle negativo, ausência de anti-GFAP. Lanes: 1 a 10, 50 μ g em cada lane da preparação de citoesqueleto a partir de cerebelo de rato. Padrão de peso molecular Biorad Broad Range.

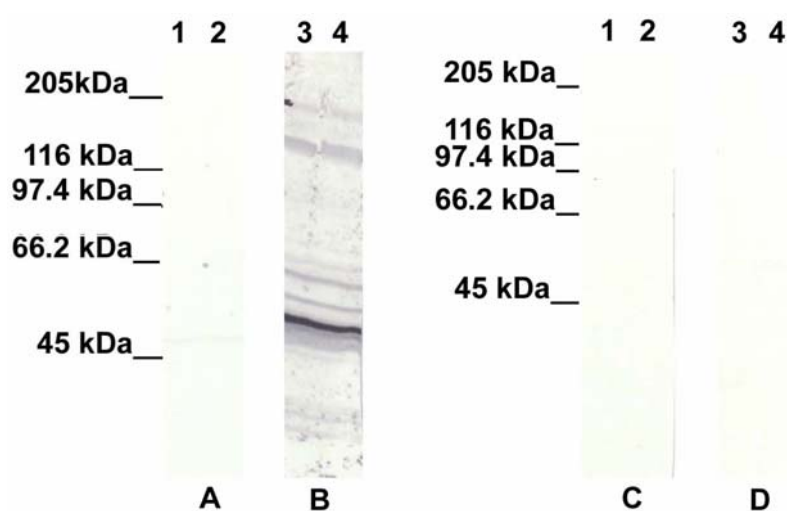


Figura 23. Imunodeteção cromogênica (fosfatase alcalina, NBT/BCIP) de GFAP a partir de preparação de citoesqueleto, e de proteínas de *E. coli* XL1-Blue MRF⁷ a partir das frações solúvel e particulada de seu lisado submetidas a SDS-PAGE, usando-se anti-GFAP pré-adsorvido contra proteínas de *E. coli* XL1-Blue MRF⁷. A e C: controle negativo, ausência de anti-GFAP. B e D: anti-GFAP pré-adsorvido contra proteínas de *E. coli*, diluído 1:8000. Lanes em A e B: 1, 2, 3 e 4, 50µg em cada lane da preparação de citoesqueleto a partir de cerebelo de rato. Lanes em C e D: 1 e 3, fração solúvel do lisado de XL1-Blue MRF⁷; 2 e 4, fração particulada do lisado de XL1-Blue MRF⁷. Padrão de peso molecular Biorad Broad Range.

6.1.2.3 Clones λ ZAPII anti-GFAP imunorreativos

Obteve-se 4 clones anti-GFAP imunorreativos no *screening* da biblioteca de expressão de cDNA de cerebelo rato (*Lambda zapII[®] rat cerebellum premade library, Stratagene*) baixo título (alos isolados) e sem recuperação antigênica (figuras 25, 26). O *plating phage* foi feito a 4000pfu/placa em 10 placas. Ou seja, identificou-se 4 clones anti-GFAP imunorreativos entre 40000 clones. O controle positivo para GFAP foi fortemente marcado e as frações solúvel e particulada do lisado de *E. coli* XL1-Blue MRF' não foram marcadas (figura 24). Escolheu-se para análise e seqüenciamento o clone que apresentou marcação mais intensa (figura 25).

Todos os alos positivos estavam muito bem isolados, exceto um que estava em parte fundido com outro (figura 26). Nesse clone, o sinal de marcação é interrompido exatamente no local de confluência com outro alo. Este resultado é uma forte evidência de que o que propusemos quanto ao título adequado de *plating phage* para *screening* de bibliotecas de expressão (item 4.5), esteja correto.

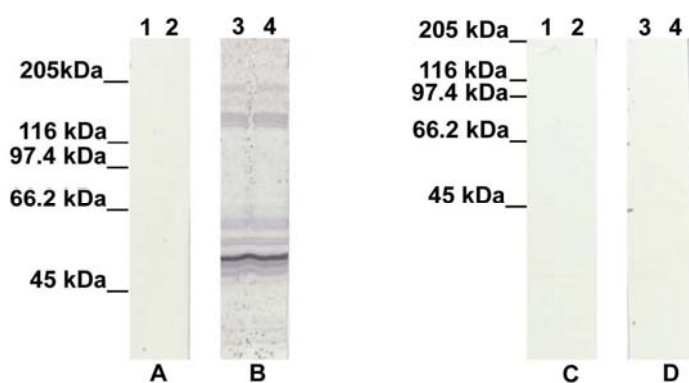


Figura 24. Imunodeteção cromogênica (fosfatase alcalina, NBT/BCIP) de GFAP a partir de preparação de citoesqueleto, e de proteínas de *E. coli* XL1-Blue MRF' (frações solúvel e particulada de lisado) submetidas a SDS-PAGE, usando-se anti-GFAP pré-adsorvido contra proteínas de *E. coli* XL1-Blue MRF'. A e C: controle negativo, ausência de anti-GFAP. B e D: anti-GFAP pré-adsorvido contra proteínas de *E. coli*, diluído 1:8000. Lanes em A e B: 1, 2, 3 e 4, 50µg em cada lane da preparação de citoesqueleto a partir de cerebelo de rato. Lanes em C e D: 1 e 3, fração solúvel do lisado de XL1-Blue MRF'; 2 e 4, fração particulada do lisado de XL1-Blue MRF'. Padrão de peso molecular Biorad Broad Range.

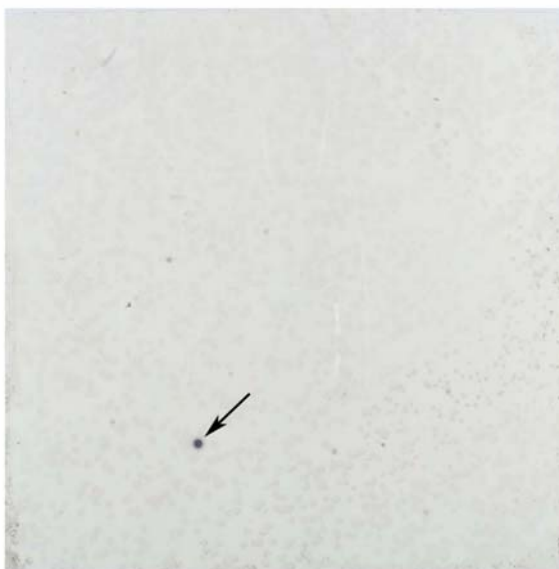
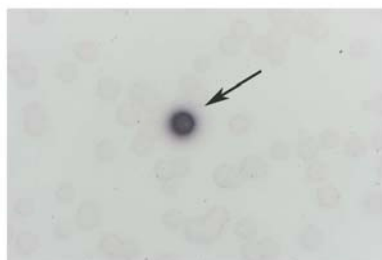
A**B**

Figura 25. Imunodeteção cromogênica (fosfatase alcalina, NBT/BCIP) com o anticorpo anti-GFAP pré-adsorvido contra proteínas de *E. coli* XL1-Blue MRF' para *screening* da biblioteca de expressão de cDNA de cerebelo de rato (*Lambda zapII*[®] *rat cerebellum premade library*, Stratagene) em baixo título (alós isolados) e sem recuperação antigênica. A: vista inteira da membrana que apresentou sinal positivo (indicado pela seta). B: zoom da região da membrana que contém a marcação positiva (indicada pela seta).

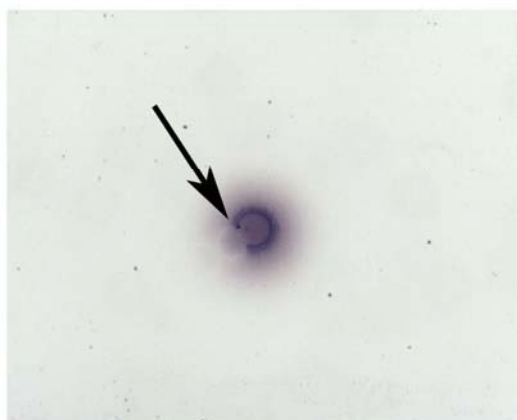
A**B**

Figura 26. Imunodeteção cromogênica (fosfatase alcalina, NBT/BCIP) com o anticorpo anti-GFAP pré-adsorvido contra proteínas de *E. coli* XL1-Blue MRF' para *screening* da biblioteca de expressão de cDNA de cerebelo de rato (*Lambda zapII*[®] rat cerebellum premade library, Stratagene) em baixo título (alos isolados) e sem recuperação antigênica. A: vista inteira da membrana que apresentou sinal positivo (indicado pela seta). B: zoom da região da membrana que contém a marcação positiva (a seta indica a região de intersecção do alo marcado com o alo adjacente; nessa região de intersecção a marcação está ausente).

6.1.2.3.1 Caracterização de clones resultantes do *rescreening* do clone λ ZAPII anti-GFAP imunorreativo por excisão *in vivo* do pBluescript, transformação em XL1-Blue MRF', extração do DNA plasmidial, PCR e seqüenciamento

Dos 12 clones em *E. coli* XL1-Blue MRF' transformada com pBluescript (subclones) excisado do clone λ ZAPII anti-GFAP imunorreativo, e submetidos à PCR, quatro apresentaram o inserto (figura 21). O tamanho dos fragmentos foi confirmado usando-se o programa Gel-Pro Analyzer (Copyright Media Cybernetics 1993-97). Esses quatro clones foram submetidos ao seqüenciamento.

Embora os seqüenciamentos não tenham ficado muito bons, apresentando vários nucleotídeos não identificados, dentre as quatro seqüências analisadas, uma apresentou regiões de 100% de identidade com seqüências de cDNA de GFAP depositadas no *GenBank* (NCBI). O alinhamento mais relevante foi com a seqüência de NM 017009, gene ID 24387 (cDNA de GFAP de *Ratus norvegicus*). As regiões das seqüências correspondentes ao vetor pBluescript (o *primer* utilizado para seqüenciamento inicia a reação a partir da região do vetor que flanqueia o inserto) também foram corretamente identificadas quando alinhou-se as seqüências obtidas com a seqüência do pBluescript depositada no GenBank (gi 58062, 58063, 58067 e 58066).

Este resultado cumpriu o objetivo de testar a funcionalidade da biblioteca e das condições padronizadas para o *screening* usando-se anticorpos como sonda, confirmando que pelo menos um (o escolhido para análise) dos clones imunorreativos identificados no *screening* com o anticorpo anti-GFAP corresponde de fato a seqüências de cDNA do gene que codifica GFAP.

A proposta apresentada neste trabalho sobre a importância da relação entre interações proteína-proteína, *folding* e imunodeteção no *screening* de bibliotecas de expressão, usando anticorpos como sonda, foi fortalecida pela confirmação da seqüência do clone anti-GFAP

imunorreativo identificado, e pela comparação entre os resultados dos *screenings* feitos com o anti-KM⁺, em alto e baixo título de plaqueamento.

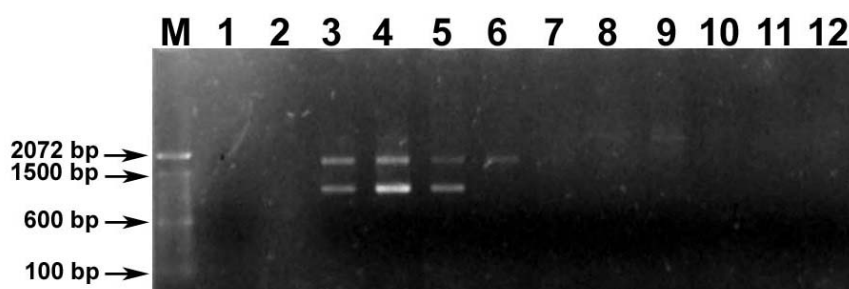


Figura 27. Eletroforese em gel de agarose contendo produtos PCR dos subclones anti-GFAP imunorreativos (pBluescript/ λ ZAP II), visualiado em transiluminador de UV (protocolo descrito no item 3.2.6). Lanes: 3, 4, 5 e 6, produto PCR dos subclones portadores de inserto; 1, 2, 7, 8, 9, 10, 11 e 12, produtos PCR de subclones que não contém o inserto; M, marcador de peso molecular *100 bp DNA Ladder* (Invitrogen).

***PARTE II - EXPRESSÃO DE DREBRINAS EM DISPLASIA CORTICAL FOCAL IIB
ASSOCIADA COM EPILEPSIA DE DIFÍCIL CONTROLE MEDICAMENTOSO***

1. INTRODUÇÃO

1.1 Drebrinas: Estrutura e Função no Sistema Nervoso Central

O crescimento dos processos das células neuronais é o primeiro passo na formação da rede neuronal no Sistema Nervoso Central (SNC). O citoesqueleto tem sido sugerido como um dos mais importantes fatores endógenos que controlam a elaborada morfologia dos processos neuronais. A expressão dos reguladores intracelulares dessa morfogênese neuronal é maior, espacialmente e temporalmente, durante o desenvolvimento do SNC. Vários estudos apontam proteínas associadas aos microtúbulos como participantes fundamentais na morfogênese neuronal. Por outro lado, não está muito claro qual o mecanismo que regula o sistema de microfilamentos nesse processo, embora proteínas ligadoras de actina tenham sido identificadas no SNC com propriedades similares às das proteínas que se ligam à actina em outros tecidos não-musculares.

Nesta introdução, descreveremos como a análise de alterações que ocorrem durante o desenvolvimento do SNC conduziu à descoberta de novas proteínas ligadoras de actina, com expressão desenvolvimento-regulada, as drebrinas; e apresentaremos suas características e seu papel na morfogênese neuronal.

1.1.1 Descrição e identificação das principais propriedades bioquímicas

As drebrinas foram inicialmente identificadas em estudos das alterações na composição de proteínas do teto óptico de galinha durante o desenvolvimento (Shirao & Obata, 1985, 1986; Shirao *et al.*, 1987, 1988).

Duas isoformas de drebrinas ocorrem nos mamíferos: Drebrina E (forma embrionária) e Drebrina A (forma adulta) (Shirao & Obata, 1986; Shirao *et al.*, 1989; Hayashi *et al.*, 1998). Ambas são expressas nos neurônios, mas apenas drebrina A é neurônio-específica (Shirao & Obata, 1986).

Embora a massa molecular da drebrina difira entre as isoformas e entre as espécies, seu ponto isoelétrico é similar, aproximadamente 4.5. Para todas as isoformas há uma discrepância entre a massa molecular aparente em SDS-PAGE e a massa molecular deduzida a partir da seqüência de aminoácidos; essa diferença é conservada entre as espécies. Em mamíferos, a massa molecular aparente média para drebrina A é de aproximadamente 125 kDa e para drebrina E, aproximadamente 115 kDa (Majoul *et al.*, 2007). Drebrina A de rato já foi identificada com massa molecular aparente 140 kDa, enquanto sua massa molecular deduzida a partir da seqüência de aminoácidos é aproximadamente 77,5 kDa (Shirao, 1995).

A identidade no alinhamento das seqüências da drebrina A de galinha e rato é 68%. Em particular, a homologia da metade amino-terminal e dois trechos curtos na metade carboxy-terminal é maior que 80%. As mesmas regiões também são bem conservadas na drebrina A humana, a qual é muito semelhante à drebrina A do rato. Essas regiões constituem domínios conservados, de ligação a proteínas do citoesqueleto. O principal deles, conservado amplamente nas isoformas entre as espécies, é o domínio de ligação à actina (Shirao, 1995).

1.1.2 A expressão da drebrina é desenvolvimento-regulada

Estudos iniciais, em galinha:

A clonagem dos cDNAs da drebrina mostrou que as seqüências de aminoácidos das formas E1 e E2 são idênticas, exceto por uma seqüência de 43 resíduos de aminoácidos inseridos na porção média da drebrina E2 (Kojima *et al.*, 1988).

Drebrina A, além da inserção de 43 aminoácidos, tem uma outra inserção de 46 aminoácidos *upstream* àquela (Kojima *et al.*, 1993).

Análise das seqüências genômica e de cDNA mostraram que as duas inserções são exons diferentes do gene da drebrina, revelando que os mRNAs são transcritos a partir de um único gene por mecanismos de *splicing* alternativo.

Por meio de imunohistoquímica e hibridização *in situ* demonstrou-se que drebrina E1 acumula-se primeiro em neurônios migratórios. Imediatamente após o término da migração neuronal, a expressão do mRNA de drebrina E1 é interrompida. Paralelamente, drebrina E2 acumula-se nos processos celulares, em crescimento, dos neurônios. Há uma correlação temporal entre a expressão de drebrina E1 e migração celular, e entre a expressão de drebrina E2 e processos neuronais em crescimento. A expressão da drebrina A começa com o início da maturação da rede neuronal, que marca a diferenciação terminal das conexões sinápticas entre axônios e dendritos (Shirao *et al.*, 1990).

Em mamíferos:

A expressão também é desenvolvimento regulada, mas a transição é apenas entre drebrina E e drebrina A, já que a isoforma E2 não foi identificada em mamíferos. De modo semelhante, a drebrina E aparece inicialmente em neurônios migratórios e a expressão de drebrina A começa com o início da maturação da rede neuronal (Shirao, 1995).

1.1.3 Atividade de ligação à actina e interação com outras proteínas ligadoras de actina

As drebrinas formam complexos com gelsolina, miosinas I e V e F-actina *in vivo* (Hayashi *et al.*, 1996).

Estudos *in vitro* revelaram que drebrina se liga à F-actina competitivamente com as proteínas estabilizadoras de F-actina, como fascina, α -actina, e tropomiosina (Ishikawa *et al.*, 1994; Sasaki *et al.*, 1996).

A super expressão de drebrina em fibroblastos resulta em remodelamento de F-actina (Shirao *et al.*, 1994; Hayashi *et al.*, 1999).

Mostrou-se também interação de drebrina com profilina, uma proteína ligadora a monômeros de actina que estimula a polimerização da actina. Provavelmente essa interação se dá através do domínio rico em prolina, da drebrina (Mammoto *et al.*, 1998).

Essas observações indicam envolvimento da drebrina no citoesqueleto de actina.

Estudos recentes mostraram que drebrina A compete com α -actinina-2 pela ligação com a actina. A α -actinina-2 é uma proteína dinâmica da densidade pós-sináptica (Nakagawa *et al.*, 2004), com sítios de ligação para F-actina e receptores glutamatérgicos tipo NMDA (Wysznski *et al.*, 1997; Dunah *et al.*, 2000).

1.1.4 Compartimentalização subcelular da drebrina e relações funcionais

A distribuição subcelular da drebrina foi mostrada inicialmente, no teto óptico e cerebelo de galinha, usando-se um anticorpo monoclonal (M2F6) que reconhece tanto a isoforma E, quanto a isoforma A, e identificou-se que a sua expressão era altamente concentrada nas sinapses (Shirao & Obata, 1986; Shirao *et al.*, 1987). Por microscopia eletrônica, verificou-se que sua localização se restringia aos sítios pós-sinápticos dos dendritos. Em células não-neuronais, drebrina E colocaliza com *stress fibers* de actina ao longo de sítios de adesão ao substrato (Asada *et al.*, 1994; Peitsch *et al.*, 1999), enquanto em neurônios em cultura, drebrinas E e A se localizam nas espinhas dendríticas (Shirao *et al.*, 1987; Hayashi *et al.*, 1996), junto com a F-actina (Takahashi *et al.*, 2003).

Transfecção de células não-neuronais com o cDNA de drebrina A leva ao aumento da adesão dessas células ao substrato (Ikeda *et al.*, 1995) e ao aparecimento de processos semelhantes a neuritos (Shirao *et al.*, 1992), enquanto transfecção de cultura de neurônios hipocâmpais com cDNA de drebrina A causa alongamento de espinhas dendríticas (Hayashi & Shirao, 1999).

Essas observações indicam que drebrina A pode estar envolvida na extensão de neuritos e formação de espinhas dendríticas.

Aoki *et al.* (2005) procuraram determinar se drebrina A atinge a membrana plasmática dos neurônios a tempo de conduzir espinogênese e sinaptogênese no SNC de rato. Nesse

estudo, a emergência de drebrina A no córtex e hipocampo foi examinada com um anticorpo que reconhece especificamente drebrina A (DAS2) e não reconhece drebrina E. Os resultados do estudo mostraram que *in vivo* drebrina A se localiza exclusivamente nos dendritos, tanto nos estágios iniciais do desenvolvimento pós-natal, quanto no adulto, em sinapses excitatórias axodendríticas. Drebrina A pode estar envolvida na organização do *pool* dendrítico de actina para a formação de espinhas dendríticas e de sinapses excitatórias durante períodos pós-natais iniciais.

1.1.5 Correlação da expressão de drebrina com plasticidade sináptica

Os trabalhos a seguir foram as primeiras evidências de que as drebrinas possivelmente desempenham algum papel na plasticidade sináptica, levando-se em consideração a correlação temporal e espacial da expressão de drebrina com plasticidade sináptica, e os achados sobre a atividade de formação de processos neuronais.

Imamura *et al.* (1992) verificaram que durante o período de sensibilidade, no início do desenvolvimento pós-natal, a arquitetura do córtex visual de gatos é altamente susceptível a alterações no ambiente visual. Os autores verificaram que os padrões de expressão de drebrina estão correlacionados temporalmente com as mudanças nas etapas de plasticidade cortical, fisiologicamente definidas. No início do período de sensibilidade, os níveis de drebrina são altos e concentrados na camada IV do córtex visual. Após o final do período de sensibilidade (por volta de 3 meses depois do nascimento), a expressão de drebrina diminui consideravelmente. Diferentemente, em gatos mantidos no escuro, nos quais o período de sensibilidade é retardado, a expressão de drebrina persiste no córtex visual maduro, de maneira quantitativamente similar aos níveis de expressão encontrados durante o desenvolvimento.

Shirao (1995) cita que no bulbo olfatório de rato adulto, o qual mantém alta plasticidade durante a vida, há expressão de grandes quantidades de drebrina.

Trabalhos recentes suportam, consistentemente, a participação da drebrina em processos de crescimento neural e na formação de sinapses (Shirao *et al.*, 1992; Hayashi & Shirao, 1999; Minghao *et al.*, 2002; Aoki *et al.*, 2005) e sua associação com proteínas importantes para a manutenção da forma e estabilidade dos terminais sinápticos como *post-synaptic density 95 protein* (PSD95) e proteínas do citoesqueleto (actina, miosina e gelsolina) (Shirao, 1995; Hayashi *et al.*, 1996; Takahashi *et al.*, 2003). A PSD95 é uma proteína de ancoragem abundante na densidade pós-sináptica, e liga-se diretamente a receptores NMDA por meio do domínio PDZ.

Fujisawa *et al.* (2006) propuseram que numa resposta homeostática *in vivo*, aumento da drebrina A e F-actina, nas espinhas dendríticas, pode melhorar o tráfego de NMDAR por reduzir a rigidez do citoesqueleto dentro do citoplasma dos terminais sinápticos sem alterar a morfologia manifesta das sinapses axo-espinosas. Takahashi *et al.* (2006) demonstraram que drebrina é necessária para a homeostase do acúmulo sináptico dos receptores NMDA.

1.1.6 Drebrina em patologias

Em humanos, sinapses anormais em densidade ou forma estão associadas com muitas desordens neurológicas (entre elas, por exemplo, retardo mental, síndrome de Down, síndrome do X frágil e epilepsia), indicando pelo menos uma ligação indireta entre formação de processos neuronais (morfogênese) e doença (Hering & Sheng, 2001).

1.1.6.1 Drebrina em doença de Alzheimer

Harigaya *et al.* (1996) encontraram perda significativa de drebrina no hipocampo de pacientes com Doença de Alzheimer (DA). Proteínas marcadoras pré-sinápticas não diferiram

significativamente entre tecidos patológicos e controles. Os autores concluíram que a diminuição da drebrina pós-sináptica pode ser um sensível marcador de danos sinápticos em DA.

Hatanpaa *et al.* (1999) encontraram baixos níveis de drebrina no córtex cerebral de indivíduos senis normais. Em DA os níveis de drebrina diminuem 81% a mais. Os achados sugerem que o comprometimento da plasticidade pode contribuir para a disfunção cognitiva tanto no envelhecimento normal quanto em DA.

Shim & Lubec (2002) examinaram a distribuição de drebrina no cérebro de pacientes com DA e Síndrome de Down (SD). A expressão de drebrina diminuiu significativamente nos córtices temporal e frontal de pacientes com DA e SD. Os autores sugerem que essa diminuição pode representar perda na plasticidade sináptica e desorganização da arborização dendrítica, o que pode corroborar a disfunção cognitiva.

1.1.7 Como drebrina participa da regulação da morfogênese neuronal

Como supracitado, vários trabalhos evidenciam atualmente que a forma e estabilidade do terminal sináptico é determinada pelo citoesqueleto de actina. Proteínas que se ligam à actina são candidatas primárias como reguladoras da morfogênese das sinapses. Drebrina parece ser a principal proteína ligadora de actina, sistema nervoso-específica. Várias evidências apontam um papel importante para as drebrinas na plasticidade sináptica, mas os mecanismos moleculares envolvidos ainda não estão claros.

1.1.8 Perspectivas

Provavelmente, a maior necessidade para as pesquisas em drebrina, é explorar sua função nos organismos vivos.

Os mecanismos moleculares que dirigem a reorganização do citoesqueleto não estão bem definidos e aguardam ser explorados. A comparação entre as condições moleculares presentes no citoesqueleto do SNC normal e patológico pode contribuir para direcionar investigações nesse sentido.

1.2 Displasias Corticais Focais

As Malformações do Desenvolvimento Cortical (MDC) têm sido reconhecidas como patologias desde o final do século XIX, sendo a maioria atribuída a defeitos de migração neuronal durante um período crucial do desenvolvimento cortical. As MDCs são um grupo heterogêneo de desarranjos anatômicos focais ou difusos, cujas características patológicas dependem muito do momento e da natureza do defeito ocorrido durante o processo de desenvolvimento (Bentivoglio *et al.*, 2003).

O advento das técnicas de imagem em alta resolução, particularmente Imagem por Ressonância Magnética (IRM), permitiu o diagnóstico das MDC *in vivo* e a correlação entre dados de imagem e achados eletroclínicos, uma vez que a maioria dessas malformações é epileptogênica.

Conseqüentemente, diversos tipos de epilepsias parciais, previamente descritas como criptogênicas, são hoje reconhecidas como secundárias às lesões corticais. Especialmente as alterações resultantes do desenvolvimento cortical anormal são frequentemente associadas com epilepsia farmacologicamente intratável, resultando num aumento do número de pacientes candidatos a tratamento cirúrgico.

As Desordens de Migração Neuronal (DMN) são geralmente consideradas como um subgrupo de MDC, e sua definição pode dar a entender que o único mecanismo no qual as malformações estão baseadas são distúrbios de migração. Entretanto, tem se mostrado que

nem todas as DMNs são devidas exclusivamente a distúrbios de migração neuronal, e outros mecanismos estão envolvidos.

As MDC previamente agrupadas sob o termo geral de DMN são atualmente diversificadas para refletir o aumento do conhecimento do substrato patológico, os possíveis fatores etiológicos e as relações entre características estruturais alteradas nas malformações e tipos de epilepsia. No entanto, a despeito de muitos esforços, é amplamente reconhecido que a classificação dessas desordens está longe de ser satisfatória e não há um consenso geral sobre essas anormalidades estruturais complexas. Além disso, sua etiologia é frequentemente incerta e os mecanismos pelos quais ela gera epilepsia não são claros.

Nos últimos anos, tem se dedicado atenção especial aos desarranjos da organização cortical. Taylor *et al.* (1971) descreveram uma série de achados que categorizaram como uma entidade única: paciente com epilepsia farmacologicamente resistente, que exibia desarranjo da citoarquitetura cortical associado com neurônios displásicos e citomegálicos sem padrão de orientação definido e *balloon cells* nas camadas mais profundas do córtex cerebral e na substância branca. Os achados clínicos e neuropatológicos indicaram uma desordem predominantemente focal e unilateral, que foi categorizada como Displasia Cortical Focal (DCF).

Desde então, o termo Displasia Cortical tem sido usado muitas vezes de forma indiscriminada na literatura, referindo-se a uma ampla variedade de desarranjos da anatomia cortical (microdisgenesias, polimicrogírias, paquigíria, heterotopia nodular, hemimegalencefalia e hamartomas), porque a descrição de Taylor suscitou controvérsias quanto à classificação morfológica das DC. A displasia descrita por Taylor tem padrão histológico similar ao da esclerose tuberosa, especialmente no que se refere à ocorrência de *balloon cells* (Taylor *et al.*, 1971; Garbelli *et al.*, 1999).

Por outro lado, alguns autores não consideram o diagnóstico de DCF, como descrito por Taylor, como uma entidade individual (Barth, 1987; Barkovich *et al.*, 2001a, 2001b). Muitos autores assumem a DC associada com a presença de *balloon cells* como o tipo mais severo ou mesmo como uma categoria completamente diferente de DCF (Mischel *et al.*, 1995; Barkovich *et al.*, 2001). Palmini *et al.* (2004), classificaram as displasias corticais focais em tipo I (sem neurônios dismórficos e sem *balloon cells*) e tipo II, também chamada DCF tipo Taylor. Esta última é caracterizada pela presença de neurônios dismórficos sem (tipo IIA) ou com (tipo IIB) células balonadas (*balloon cells*). As DCF do SNC nas quais ocorrem *balloon cells* são a DCF IIB (ou tipo Taylor) e a hemimegalencefalia.

Um aspecto fundamental da DCF IIB é que os neurônios citomegálicos displásicos e as *balloon cells* conseguem “escapar” da apoptose. Uma possível explicação é que estas células expressariam continuamente neurotrofinas e seus receptores *trk* (Nishio *et al.*, 1999). Isto levaria à persistência destas células no adulto e também modelaria e aumentaria anormalmente a rede sináptica destas células pela conservação de plasticidade neurítica ativa (Yamanouchi *et al.*, 1998).

Estudos imunocitoquímicos sugeriram elementos biológicos associados à epileptogenicidade intrínseca e aumentada das DCF IIB e hemimegalencefalia (Spreafico *et al.*, 1996; Babb *et al.*, 1998). Ocorre uma redução consistente na densidade de interneurônios GABA-érgicos e um aumento na densidade de células piramidais orientadas anormalmente, que exibem imunomarcção para receptores de aminoácidos excitatórios. Este aumento de excitação concomitante à redução da inibição parece predominar nas DCF tipo Taylor e na hemimegalencefalia e é aparentemente menos acentuado em outras formas de DCF.

1.3 Drebrinas e Displasias Corticais Focais

O papel das drebrinas na homeostase da atividade eletrofisiológica cerebral é pouco estudado, embora seja conhecida sua participação em processos de crescimento neural e na formação de sinapses, e sua associação com proteínas importantes para a manutenção da forma e estabilidade dos terminais sinápticos. No córtex cerebral e hipocampo de rato, drebrina está presente exclusivamente em sinapses excitatórias assimétricas axodendríticas, associadas ao citoesqueleto de actina, sendo necessária para o acúmulo homeostático de receptores NMDA.

Dada a associação entre drebrina, *developmentally-regulated brain protein*, desenvolvimento neural e sinapse axo-dendrítica excitatória, investigamos inicialmente se haveria alteração da expressão de drebrina em distúrbios do desenvolvimento neural, usualmente associados à epilepsia. Em experimento-piloto, drebrina foi detectada usando-se o anticorpo monoclonal M2F6 anti-drebrina, apenas em tecido proveniente de corticectomia de paciente com displasia cortical focal tipo Taylor, mas não em tecido proveniente de ressecção de heteropia subventricular ou de displasia cortical focal não-Taylor. Assim, investigamos a expressão de drebrina em córtex cerebral proveniente de pacientes com displasia cortical focal tipo IIB, submetidos a tratamento cirúrgico de epilepsia, comparando-se com aquela em córtex cerebral obtido em necrópsia.

***PARTE II - EXPRESSÃO DE DREBRINAS EM DISPLASIA CORTICAL FOCAL IIB
ASSOCIADA COM EPILEPSIA DE DIFÍCIL CONTROLE MEDICAMENTOSO***

2. OBJETIVOS

2.1 Verificar a expressão de drebrinas em cortes histológicos de tecido nervoso humano com Displasia Cortical Focal IIB associada com epilepsia de difícil controle medicamentoso; usando-se os anticorpos DAS2 (anti-drebrina isoforma adulta) e M2F6 (anti-drebrina isoformas adulta e embrionária) em imunohistoquímica.

***PARTE II - EXPRESSÃO DE DREBRINAS EM DISPLASIA CORTICAL FOCAL IIB
ASSOCIADA COM EPILEPSIA DE DIFÍCIL CONTROLE MEDICAMENTOSO***

3. MÉTODOS E TÉCNICAS EMPREGADOS

3.1 Casuística

Utilizamos blocos de tecido cortical humano, provenientes de necropsias e de ressecção cortical durante cirurgia para epilepsia farmacologicamente intratável nos Departamentos de Patologia e de Cirurgia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, no Serviço de Neurocirurgia do Hospital Brigadeiro, em São Paulo, no Hospital São Lucas da PUCRS, em Porto Alegre, e no “Istituto Nazionale Neurologico C. Besta”, Milano, Italy de acordo com protocolos aprovados pela Comissão de Ética da FMRP. Os tecidos displásicos (tabela 1) foram analisados pelos patologistas Dra. Leila Maria C. Chimelli, Dr. Luciano Neder Serafini e Dra. Ligia Coutinho. O diagnóstico para DCF IIB foi atribuído de acordo com critérios morfológicos, segundo classificação proposta por Palmieri *et al.* (2004).

Como controles para as DCF, usamos tecido obtido de necropsia sem história de patologia neurológica e que não apresentou evidências de alterações neuropatológicas, com a mesma idade e sexo que os dos pacientes com displasia (tabela 2).

O tecido nervoso foi fixado em formalina a 10% (v/v) tamponada. A seguir, as regiões de interesse foram dissecadas e procedeu-se à desidratação em etanol (Merck, grau P.A), diafanização em xileno (Merck, grau P.A) e inclusão em parafina (Merck, Histosec). Secções de 5 e 8 μm de espessura foram obtidas por microtomia (Micrótomo Leica, modelo RM 2065), montadas em lâminas gelatinizadas ou silanizadas, e armazenadas a 4° C até o momento de uso. Para avaliação microscópica do tecido e posterior seleção as secções de 8 μm (em lâminas silanizadas) foram coradas pelo método de hematoxilina e eosina (HE). As lâminas foram analisadas utilizando lupa Olympus (SZH10) e microscópio óptico Olympus (modelo BX 60).

Cortes do mesmo bloco, em cada caso, foram caracterizados (por coloração hematoxilina-eosina e Bielchowsky; e por imunomarcção com anti-GFAP e anti-NEU-N) antes de serem utilizados para imunohistoquímica com os anticorpos anti-drebrina.

3.1.1 TABELAS

Tabela 1. Resumo dos dados clínicos de pacientes incluídos no ensaio imunohistoquímico. Siglas: ND, não disponível.

CASO	SEXO	IDADE À CIRURGIA (anos)	FREQUÊNCIA DE CRISES (por dia)	IDADE DE INÍCIO (anos)	DURAÇÃO (anos)	ZONA EPILEPTOGENICA	TIPO DA CIRURGIA	REGIÃO DA CIRURGIA	SEGUIMENTO (anos)
1	Feminino	14	ND	ND	ND	ND	Lesionectomia	Frontal - Direita	5
2	Masculino	22	ND	ND	ND	ND	Lesionectomia parcial	Frontal - Esquerda	ND
3	Masculino	3	ND	ND	ND	ND	Lesionectomia	Frontal - Direita	ND
4	Masculino	9	ND	ND	ND	ND	Corticectomia	Frontal - Direita	ND
5	Masculino	6	ND	ND	ND	ND	ND	Parietal	ND
6	Feminino	9	ND	ND	ND	ND	ND	Temporal	ND
7	Feminino	34	ND	ND	ND	ND	ND	Temporal	ND
8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Frontal	ND
9	Feminino	5	5	< 1	5	Temporal/Parietal/ Occipital - Direita	Multilobectomia	Temporal/Parietal/ Occipital - Direita	9
10	Feminino	2	5	< 1	2	Temporal/Parietal/ Occipital - Direita	Lobectomia Temporal	Temporal - Direita	10
11	Feminino	5	5	< 1	5	Temporal/Parietal/ Occipital - Direita	Lobectomia Temporoccipital	Temporal/Occipital Direita	7
12	Masculino	< 1	5	< 1	< 1	Frontal - Esquerda	Lobectomia	Frontal - Esquerda	6
13	Feminino	5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Tabela 2. Caracterização dos casos de autópsia utilizados no ensaio imunohistoquímico.

CASO	SEXO	IDADE (anos)	CÓRTEX	INTERVALO PÓS MORTE	DIAGNÓSTICO
1	Feminino	1	Temporal	6h26m	Cardiopatía congênita complexa
2	Masculino	2	Frontal/Temporal	4h	Estado pós-operatório, correção cirúrgica tetralogia de Fallot
3	Feminino	7	Frontal/Temporal/Occipital	6h45m	Broncopneumonia
4	Masculino	9	Frontal/Temporal	5h30m	Insuficiência cardíaca congestiva
5	Feminino	15	Temporal	5h	Lesão alveolar pulmonar difusa
6	Masculino	19	Temporal/Occipital	4h	Choque hemorrágico (hemorragia intraperitoneal)
7	Feminino	20	Frontal/Temporal/Occipital	14h20m	Insuficiência respiratória
8	Masculino	21	Frontal	8h	Insuficiência cardíaca congestiva
9	Masculino	23	Frontal	5h	Leucemia linfóide aguda
10	Masculino	26	Temporal	4h	Septicemia
11	Masculino	33	Temporal	3h05m	Broncopneumonia
12	Masculino	37	Occipital	4h40m	Pneumonia aspirativa bilateral
13	Masculino	39	Temporal	5h	Choque séptico / tuberculose pulmonar
14	Masculino	47	Temporal	4h	Choque hipovolêmico

3.2 Recuperação Antigênica

Utilizamos uma modificação do procedimento de recuperação antigênica descrito por Martins *et al.* (1999) e Zanardo *et al.* (1997). Um aparelho de microondas (Sharp RB-4A33) foi utilizado em potência nominal máxima. As lâminas com as secções de tecido desparafinizadas foram tratadas por 20 minutos em jarros de Coplin contendo tampão Tris-HCl 50 mM, pH 9.5. Utilizamos três jarros contendo o mesmo volume de solução, posicionados simetricamente, uma vez que o número e a posição dos jarros podem influenciar na temperatura.

3.3 Imunohistoquímica

As secções tissulares foram desparafinizadas, hidratadas, e tratadas com solução de H₂O₂ 3% (v/v) em tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7.4, para bloquear a atividade da peroxidase endógena.

A recuperação antigênica foi realizada conforme procedimento descrito acima. Após resfriadas até a temperatura ambiente, as secções foram incubadas em tampão Tris-Glicina 0,1 M pH 7.4, por 30 minutos. Em seguida, foram bloqueadas com tampão de bloqueio [tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7.4 contendo: soro de jumento 1:6 (v/v), leite desnatado em pó 5% (w/v), NaCl 0,45 M e Triton X-100 0,3% (v/v)] por 4-5 horas, para bloquear sítios de ligação inespecífica dos anticorpos.

As reações de imunohistoquímica foram feitas utilizando-se, separadamente, os anticorpos primários: camundongo anti-drebrina E de galinha (NBA-110 da StressGen, clone M2F6, que reconhece ambas isoformas de drebrina, A e E, em várias espécies, inclusive em humanos), IgG de coelho anti-drebrina A purificado por afinidade, denominado DAS-2 (gentilmente cedido pelo Prof. Tomoaki Shirao, Departamento de Neurobiologia, Universidade Gunma, Japão) diluídos em tampão de bloqueio a 1:50, e 1:20, respectivamente. Previamente testou-se diluições seriadas dos anticorpos antes de se definir o título a ser utilizado. Os controles foram feitos substituindo-se o anticorpo primário por tampão de

bloqueio. A incubação ocorreu por aproximadamente 14 horas e as secções foram lavadas posteriormente com tampão de lavagem [tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7.4 contendo NaCl 0,45 M e Triton X-100 0,3% (v/v)]. A detecção dos anticorpos primários foi realizada utilizando-se os anticorpos secundários: coelho anti-IgG de camundongo, biotilado (Dako E0354), e porco anti-IgG de coelho, biotilado (Dako E0353), diluídos com tampão de bloqueio a 1:100, ambos. Na seqüência, as secções foram incubadas com o complexo avidina-biotina-peroxidase (Kit Elite ABC Vector). A presença do complexo foi visualizada por reação com H₂O₂ e 0,4 mg/ml de 3,3'-diaminobenzidina (DAB), por 12 minutos.

As secções foram desidratadas com etanol, clareadas com xileno e montadas entre lâmina e lamínula com Permount (Fischer). Todas as operações foram realizadas à temperatura ambiente.

Para a detecção de GFAP usou-se IgG de coelho anti-GFAP de vaca (Dako) e como secundário biotinoil-IgG de porco anti-IgG de coelho (Dako). Para a detecção de NeuN usou-se biotinoil-IgG de camundongo anti-Neu N (Chemicon) e como secundário IgG de cabra anti-IgG de camundongo (Vector). A revelação foi feita com o kit ABC/ H₂O₂-DAB.

Os experimentos imunohistoquímicos foram feitos com o aluno de doutorado do nosso grupo César Augusto Bueno Zanella.

3.4 Documentação das imagens

As lâminas foram fotografadas usando microscópio Olympus BX60 equipado com sistema de microfotografia Olympus B32. Os diapositivos foram revelados pelo sistema E-6 (Kodak) e digitalizados usando sistema Polaroid. As imagens foram editadas com o programa Adobe Photoshop 7.0 em nosso laboratório.

***PARTE II - EXPRESSÃO DE DREBRINAS EM DISPLASIA CORTICAL FOCAL IIB
ASSOCIADA COM EPILEPSIA DE DIFÍCIL CONTROLE MEDICAMENTOSO***

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização histopatológica dos tecidos DCF IIB

A perturbação de processos de desenvolvimento pode resultar em malformações do SNC, em particular do neocortex, anormalidades da arquitetura cortical e de suas propriedades eletrofisiológicas. Estas malformações têm sido classificadas com base em sua morfologia e/ou provável etiologia (Rakic, 1988, 1995; Sarnat, 1992) e mais recentemente, com base nas suas características neuropatológicas associadas à etiologia gênica (Sarnat & Flores-Sarnat, 2003; Sarnat, 2005).

Os critérios de classificação seguidos para caracterizar os tecidos usados neste trabalho foram aqueles utilizados por Palmmini *et al.* (2004): classificaram as DCF em tipo I (sem neurônios dismórficos e sem *balloon cells*) e tipo II, também chamada DCF tipo Taylor. Esta última é caracterizada pela presença de neurônios dismórficos sem (tipo IIA) ou com (tipo IIB) células balonadas (*balloon cells*).

As figuras 28 e 29 ilustram características da DCF IIB. Próximo à superfície pial, observa-se perda da organização laminar e colunar corticais com presença de células grandes, arredondadas com núcleo excêntrico (*balloon cells*) ou central (células indeterminadas) ou sem núcleo observável e com citoplasma claro (*pale cells*) (Figura 28, A). Em região mais profunda, notam-se neurônios escuros (*dark neurons*), geralmente presentes nestas displasias e cujo significado é desconhecido (Figura 28, B). Nota-se a zona de transição entre as substâncias cinzento-branca caracteristicamente borrada, com células arredondadas em ambas regiões (Figura 28, C). Na substância branca vêem-se células arredondadas, algumas das quais parecem ser *balloon cells* (Figura 28, D). Na figura 29, observam-se as células características da DCFIIB em maior aumento: neurônio gigante dismórfico (A); neurônios gigantes dismórficos próximos à superfície pial (B); *balloon cells*, inclusive binucleadas (C); célula clara e *balloon cells* (D); perda da ordenação de processos neuronais (E); células gemistocítica, clara, indeterminada, *balloon* e indeterminada com inclusão intranuclear (D).

No diagnóstico diferencial entre *balloon cells*, *pale cells* e neurônios gigantes presentes em DCF IIB, corado pelo método de Bielschowsky (Figura 30), observam-se alguns neurônios gigantes com os processos fortemente corados (A). Notam-se *pale cells*, *balloon cells*, algumas células indeterminadas, e neurônios gigantes (B). No painel C, da Figura 30, nota-se um neurônio gigante típico com *balloon cells* ao redor. Diversas *balloon cells* podem ser vistas na profundidade do córtex (D).

A figura 31 evidencia a presença do marcador neuronal Neu-N nas *balloon cells* e nas células indeterminadas. Observam-se *balloon cells*, *pale cells* e células indeterminadas marcadas e não marcadas, enquanto se vê grande número de neurônios fortemente marcados. Em C, observa-se um neurônio gigante exibindo marcação positiva. Na figura 32, observa-se forte marcação de astrócitos e fibras de Rosenthal (A e C), e expressão variável do marcador glial GFAP (de quase ausente à forte) em células indeterminadas e *balloon cells* (B e D).

4.2 Expressão de drebrina em DCF IIB

Detectou-se forte marcação, relativamente homogênea, no citoplasma e núcleo, inclusive na membrana nuclear, nas *balloon cells* e marcação de células indeterminadas e de neurônios citomegálicos displásicos, entre outras células presentes na região displásica, usando-se os anticorpos M2F6, que reconhece as isoformas adulta e embrionária, e DAS2, que reconhece apenas a isoforma adulta, (figuras 33 a 37). A marcação nuclear e justa-nuclear foi mais evidente com o anticorpo M2F6 (figuras 33 e 34), embora a presença e intensidade da marcação nuclear observada seja variável. Maior número de *balloon cells* é marcado com o M2F6 em comparação ao DAS2. Observam-se algumas poucas *balloon cells* sem qualquer marcação evidente com o anticorpo anti-drebrina que reconhece apenas a forma adulta (figuras 35, 36 e 37).

Usando o anticorpo M2F6, observamos *balloon cells*, células indeterminadas, *pale cells* e neurônios gigantes fortemente marcados, tanto próximos à superfície pial quanto na profundidade do córtex (figura 33, A, B, C e D). Em maior aumento notamos a intensa marcação de *balloon cells* e de um neurônio gigante, ao redor de um vaso cujo endotélio também parece estar marcado (figura 34, A). Observamos células indeterminadas, exibindo marcação relativamente homogênea no citoplasma, e marcação nuclear (figura 34, B), assim como, *balloon cells* típicas, exibindo marcação relativamente homogênea no citoplasma, e marcação nuclear, e poucas ou algumas outras *balloon cells* marcadas com maior e menor intensidade (figura 34, C). Na figura 34, D, pode-se observar a membrana nuclear de uma *balloon cell* que parece exibir marcação positiva.

Obtivemos resultados semelhantes usando-se o anticorpo DAS2. Observamos *balloon cells*, células indeterminadas e *pale cells* fortemente marcadas, desde próximas à superfície pial até a profundidade do córtex (figura 35, A, B, C e D). Em maior aumento notamos *balloon cells* com citoplasma e núcleo marcados, exibindo marcação evidente da membrana nuclear (figura 36, A e B). Observamos, também, aglomerados de células displásicas exibindo marcação positiva (figura 37, A). Esse mesmo campo é GFAP-positivo e NeuN-positivo em cortes adjacentes do mesmo tecido. Em aumento maior, observa-se a diversidade e a forma bizarra dos tipos celulares (Figura 37, B). Em aumento ainda maior observa-se que a intensidade de marcação varia de uma célula para a outra e podem-se identificar também células não marcadas (figura 37, C). A forma destas células sugere astrócito ativado (Figura 37, C). Notamos, também, marcação de *balloon cells* e de células com morfologia de glia ativada (figura 37, D). Essas células com morfologia de glia ativada são células grandes, de tamanho comparável às *balloon cells*, parecem expressar GFAP e também o anticorpo DAS2 (em cortes adjacentes do mesmo tecido), um marcador de sinapse neuronal (Aoki *et al.*, 2005).

Os controles de necrópsia exibiram apenas fraca marcação em poucos neurônios piramidais pequenos e grandes (marcação nuclear), nas camadas III e V, respectivamente (figura 39), muito embora, essa marcação quase não seja evidente. Aoki *et al.* (2005) identificaram imunorreatividade para drebrina A em neurônios piramidais da camada V de córtex cerebral de rato, durante o desenvolvimento, com fraca marcação do corpo celular e marcação intensa nos dendritos. Eles não detectaram drebrina A em neurônios corticais de rato adulto.

Os controles cirúrgicos, provenientes de ressecção cirúrgica do lobo temporal em pacientes submetidos à hipocampectomia, exibiram marcação celular, especialmente na camada I, em intensidade variável (desde ausente até tão intensa quanto nos tecidos displásicos), e forte marcação da neurópila (Figura 40). Esse resultado levou-nos a algumas perguntas: 1) podemos considerar essa marcação como expressão normal de drebrina e concluir que como há pouca diferença em intensidade de marcação, comparada ao tecido displásico, drebrina não é diferencialmente expressa em Taylor? 2) A que se deve a diferença na intensidade de marcação entre os controles de mesmo grupo? 3) Qual seria o melhor tipo de controle?

Nos tecidos provenientes de necrópsia, apesar de termos dados sobre a causa da morte, não se sabe como o efeito do estado agônico, do intervalo post-mortem e do tempo de fixação, podem alterar o padrão de expressão da drebrina. Outro aspecto a se considerar é que possivelmente os tecidos usados como controles cirúrgicos, provenientes de ressecção do lobo temporal para retirada do hipocampo esclerótico, tenham sido lesados pela atividade epiléptica. Nesses tecidos, encontramos variações na intensidade de expressão de drebrina na camada I, principalmente.

Já foi demonstrado que a proporção de espinhas dendríticas imunopositivas para drebrina é regulada de maneira atividade-dependente. O bloqueio da atividade de receptores

NMDA por duas horas aumenta a proporção de espinhas dendríticas drebrina-imunopositivas (Fujisawa *et al.*, 2006). O aumento da expressão de drebrina foi previamente observado em sinapses excitatórias: o acúmulo de drebrina A no interior das espinhas dendríticas é requerido para induzir o acúmulo da proteína ancoradora do receptor de glutamato (PSD95), nos sítios pós-sinápticos (Takahashi *et al.*, 2003). A ativação de receptores NMDA induz o deslocamento da drebrina das espinhas dendríticas para os dendritos (Sekino *et al.*, 2006). A drebrina A é necessária para a homeostase do acúmulo sináptico de receptores NMDA (Takahashi *et al.*, 2006). Assim, é possível que a variação da intensidade de marcação de drebrina, que observamos nos tecidos usados como controle cirúrgico, seja devida a alguma variação na atividade excitatória. Nos controles de necrópsia, com causas de morte diversas, não houve tanta variação no padrão de expressão quanto nos controles cirúrgicos.

Delineamos estratégias em direção à resolução dessas questões. A microdissecção de tecidos displásicos, e tecidos normais obtidos para remoção de tumores deverá permitir fazer *western blot* com amostras de tecido relativamente homogêneas para verificar quantitativamente a expressão das isoformas adulta e embrionária de drebrina. Pretendemos verificar os dados de *western blot* também usando PCR em tempo real.

Identificamos marcação de drebrina evidente e intensa nas células características da DCF IIB, neuropatologia considerada como resultado de distúrbio de desenvolvimento associada à epilepsia de difícil controle medicamentoso. E a imunorreatividade para drebrina parece ser maior quando se utiliza o anticorpo que reconhece as formas adulta e embrionária da drebrina, especialmente para *ballon cells*, embora não tenha sido possível quantificar ainda essa observação. Esse dado associado ao fato de que as *ballon cells* expressam marcadores neuronais e gliais e parecem ser células pouco diferenciadas ou indiferenciadas sugere que as *ballon cells* tenham expressão anormal da isoforma embrionária da drebrina, e que

possivelmente os anticorpos anti-drebrina M2F6 e DAS2 sejam úteis como marcadores de células pouco diferenciadas ou indiferenciadas.

A forma adulta da drebrina foi identificada apenas em sinapses e a forma embrionária no corpo celular, em rato e ave adultos. Em ratos adultos quase toda a drebrina sináptica está localizada nas espinhas dendríticas, formando sinapses excitatórias assimétricas, verificadas pela imunonegatividade para GABA e imunorreatividade com receptores de NMDA. A forma adulta da drebrina pode estar envolvida na organização do *pool* dendrítico de actina para a formação de sinapses excitatórias axoespinosas durante períodos pós-natais iniciais do desenvolvimento (Aoki *et al.*, 2005). Além disso, expressão de drebrina embrionária foi recentemente descrita como associada à geração de forma celular anormal, formação de prolongamentos anormais e perda da capacidade migratória em células em cultura (Peitsch *et al.*, 2006).

Nossos resultados para a imunodeteção de drebrina em DCF IIB levantaram a questão do possível envolvimento da drebrina nessa neuropatologia. Há alteração da expressão de drebrina adulta e/ou embrionária na DCF IIB? Essa expressão estaria relacionada à gênese dos tipos celulares aberrantes presentes em DCF IIB? A expressão de drebrina seria uma característica primária ou secundária nesse processo?

Para responder a essas perguntas planejamos: 1) Fazer microscopia confocal usando o anticorpo que reconhece a drebrina adulta e o anticorpo que reconhece as formas adulta e embrionária. No entanto, os tecidos parafinizados de que dispomos foram inadequados para microscopia confocal, resultando em intenso background e desperdício dos anticorpos e de tecido. É necessário conseguir material fresco para que possamos controlar o tempo de fixação e obter cortes congelados para imunohistoquímica. 2) Fazer *western blot* de tecidos DCF IIB usando o anticorpo que reconhece drebrina adulta e embrionária. Entretanto, para resultados inequívocos precisamos obter tecido congelado, a fim de utilizar parte para o

western blot, usando tecido microdissecado, e imunohistoquímica. 3) Comparar a expressão de drebrina em DCF IIB com Esclerose Tuberosa. Já conseguimos esses tecidos para completar e prosseguir com nossa investigação.

4.3 Figuras

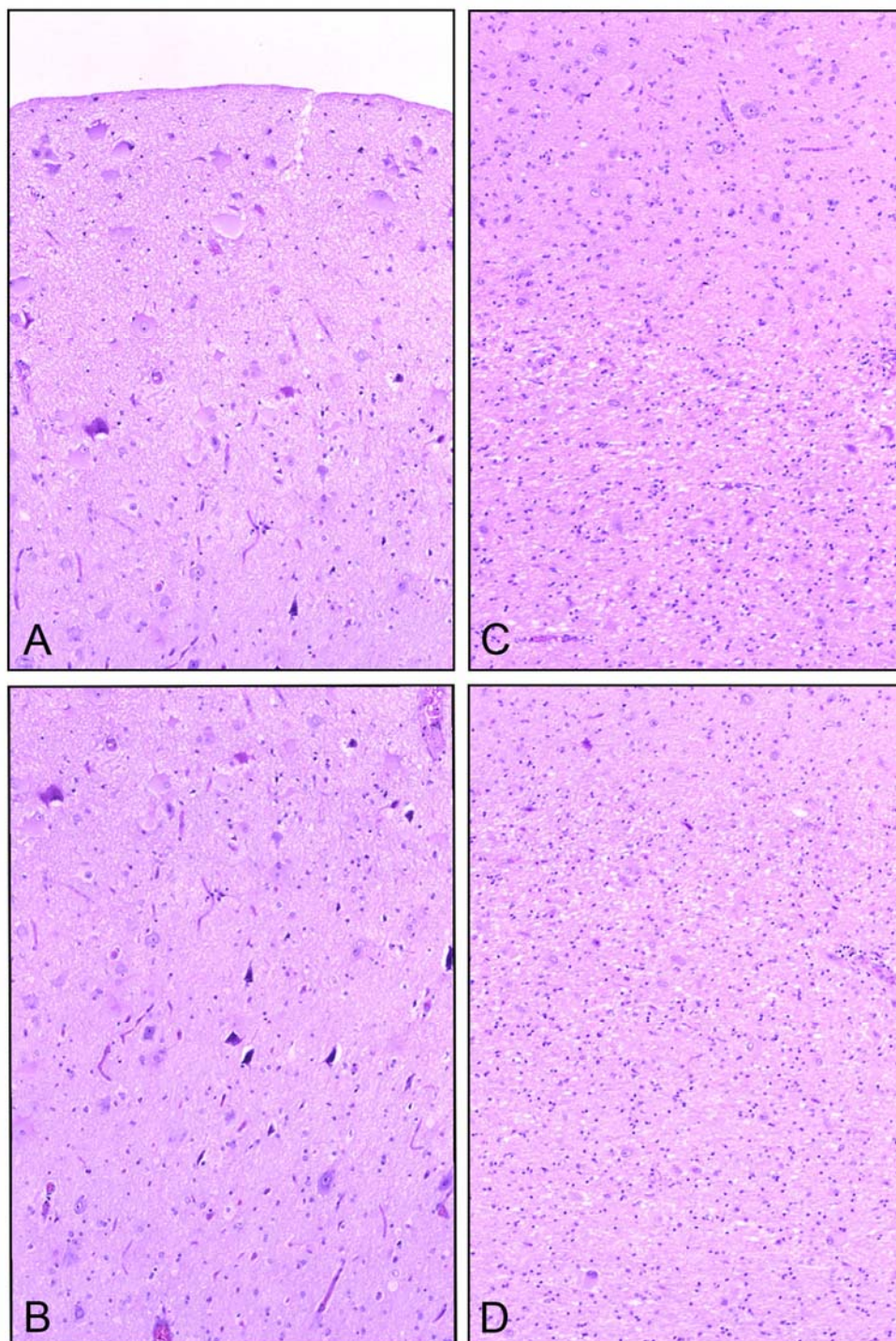


Figura 28. Caracterização histológica de DCF IIB. Coloração Hematoxilina-eosina (HE). Caso 3. **A:** Observa-se perda das organizações laminar e colunar corticais, com presença de células grandes e arredondadas com núcleo excêntrico (*balloon cells*) ou central (células indeterminadas) ou sem núcleo observável e com citoplasma claro (*pale cells*) (33X). **B:** Numa região mais profunda e contínua à do painel A, notam-se neurônios escuros (*dark neurons*), geralmente presentes nestas displasias e cujo significado é desconhecido (33X). **C:** Zona de transição entre as substâncias cinzenta-branca caracteristicamente borrada, com células arredondadas em ambas regiões (33X). **D:** Mostrando células arredondadas na substância branca (33X).

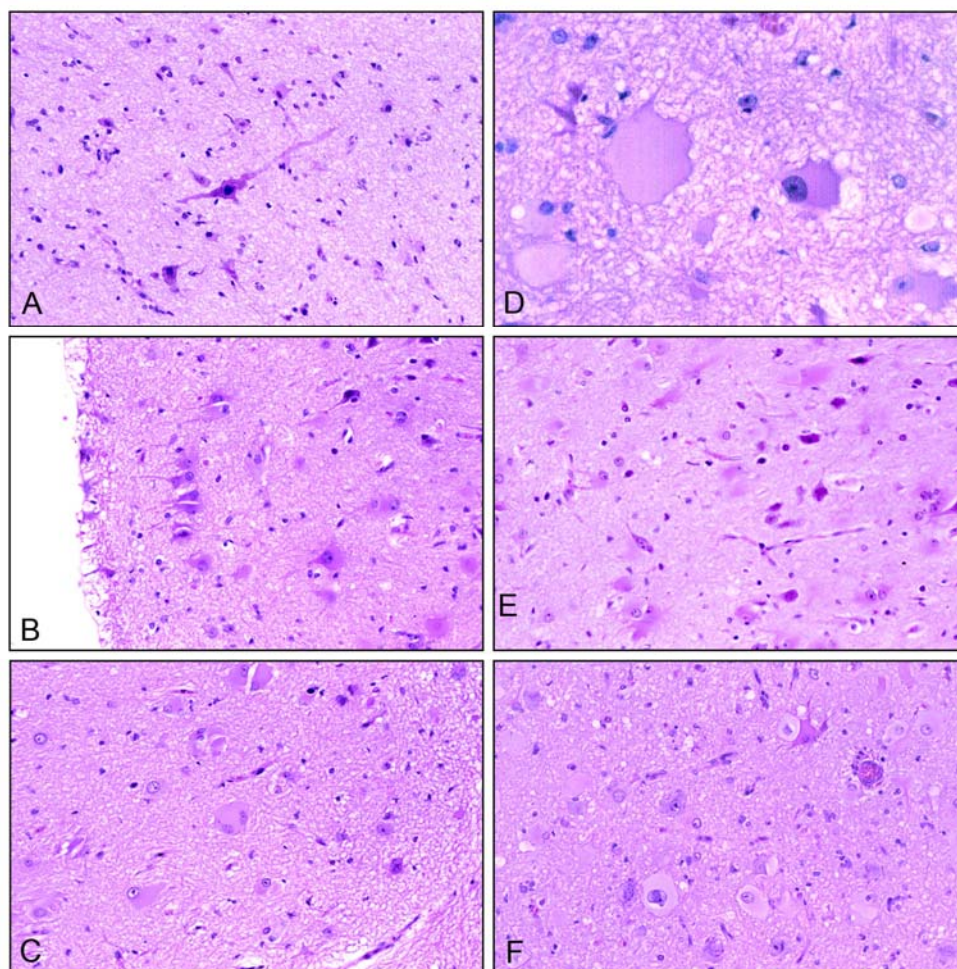


Figura 29. Caracterização histológica de DCF IIB. Coloração Hematoxilina-eosina (HE). (continuação). **Caso 1:** A, D e F. **Caso 3:** B, C e E. **A:** Neurônio gigante dismórfico (33X). **B:** Neurônios gigantes dismórficos próximos à superfície pial (33X). **C:** *Balloon cells*, nota-se uma *balloon cell* binucleada (33X). **D:** Célula clara e *balloon cells* (132X). **E:** Perda da ordenação de processos neuronais (66X). **F:** Células gemistocítica, clara, indeterminada, *balloon* e indeterminada com inclusão intranuclear (66X).

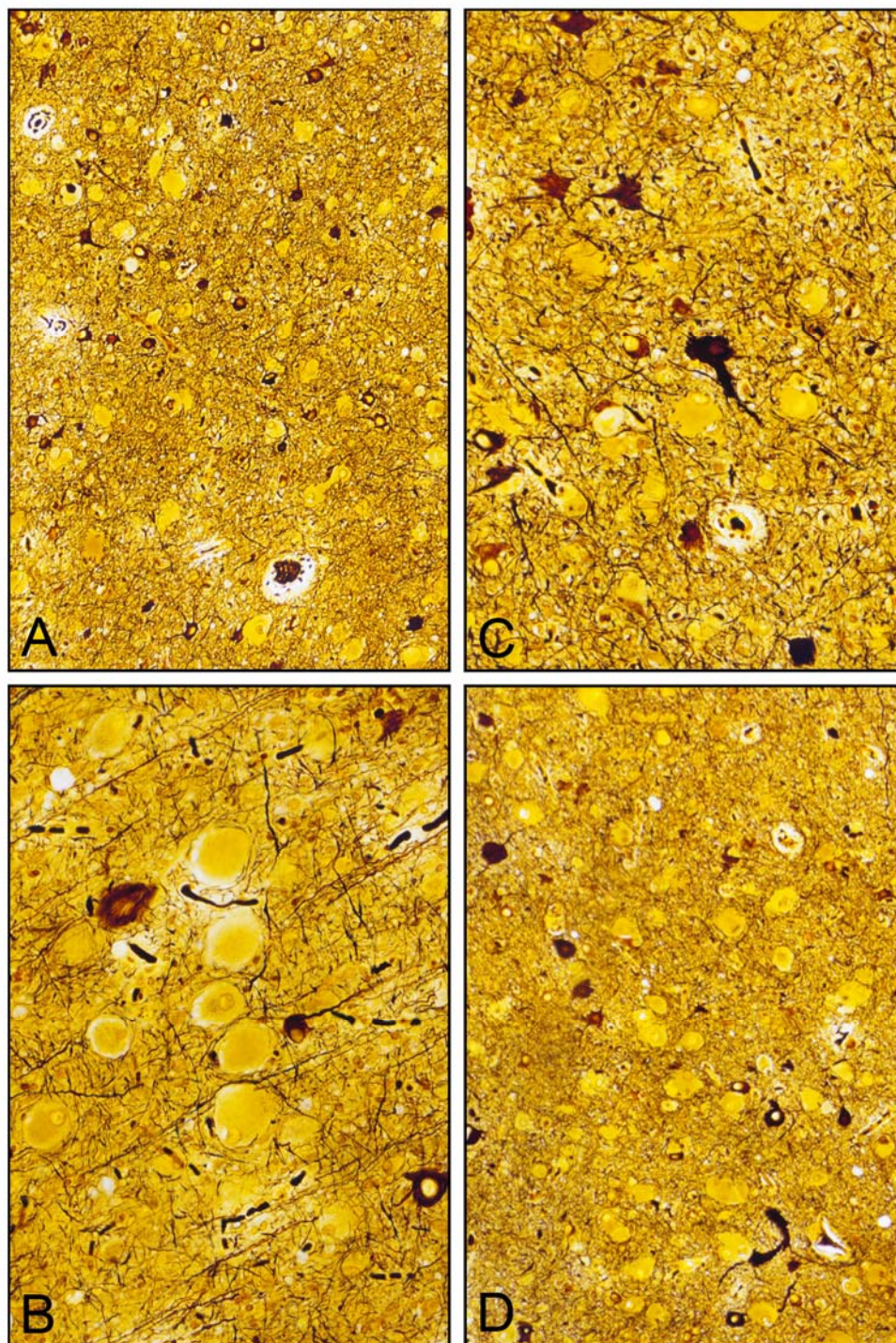


Figura 30. Diagnóstico diferencial entre *ballon cells*, *pale cells* e neurônios gigantes presentes em DCF IIB, corado pelo método de Bielschowsky. Caso 1. A: Observam-se alguns neurônios gigantes com os processos fortemente corados (33X). **B:** Notam-se *pale cells*, *balloon cells*, algumas células indeterminadas, e neurônios gigantes (33X). **C:** Um neurônio gigante típico com *ballon cells* ao redor (66X). **D:** Diversas *ballon cells* na profundidade do córtex (66X).

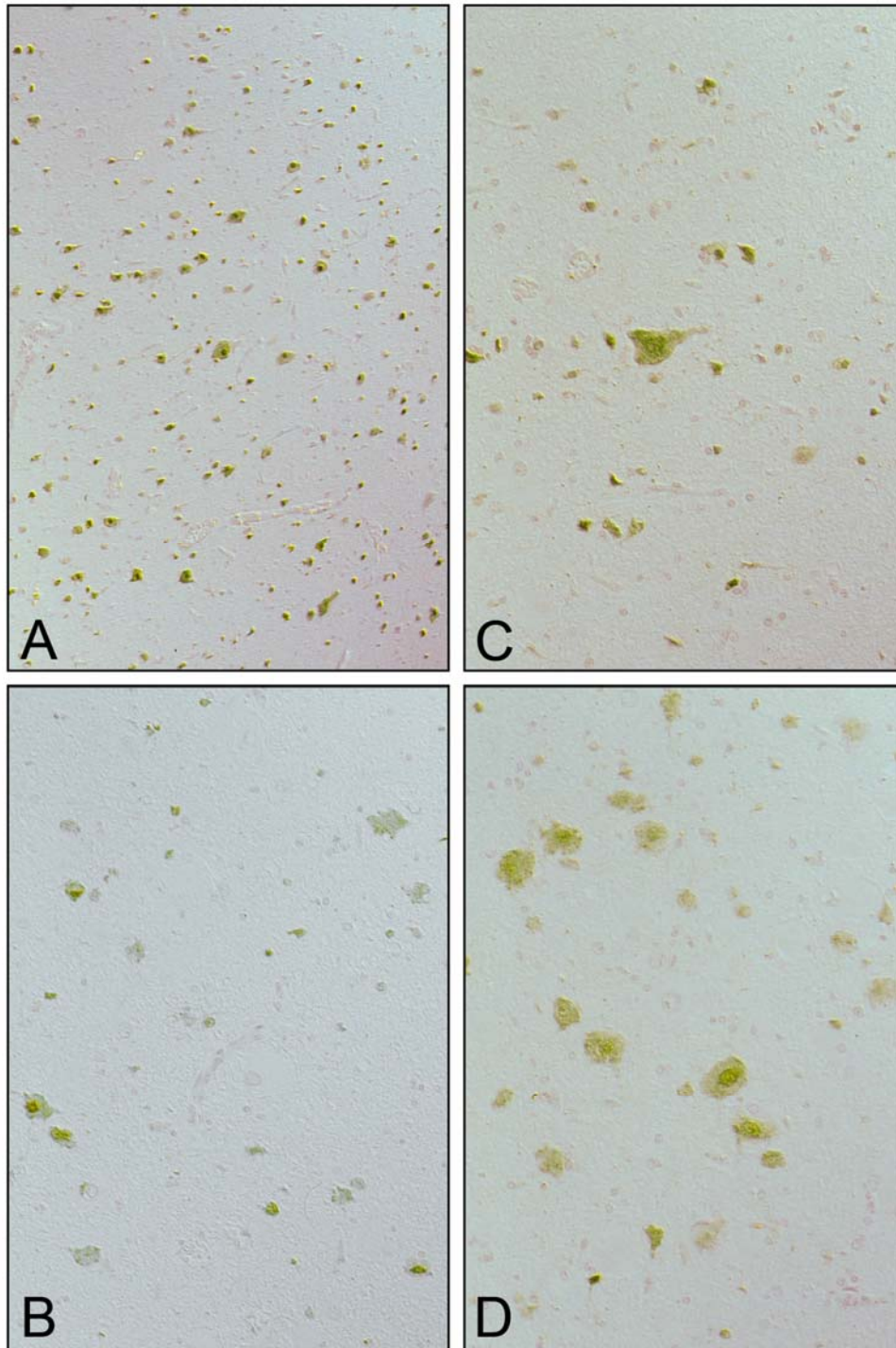


Figura 31. Expressão de Neu-N em DCF IIB. Caso 1. **A:** Observa-se marcação de alguns neurônios e a presença de *balloon cells* marcadas e não marcadas (33X). **B:** *Balloon cells* marcadas e não marcadas, e células indeterminadas não marcadas (66X). **C:** Neurônio gigante exibindo marcação positiva, ao centro (66X).

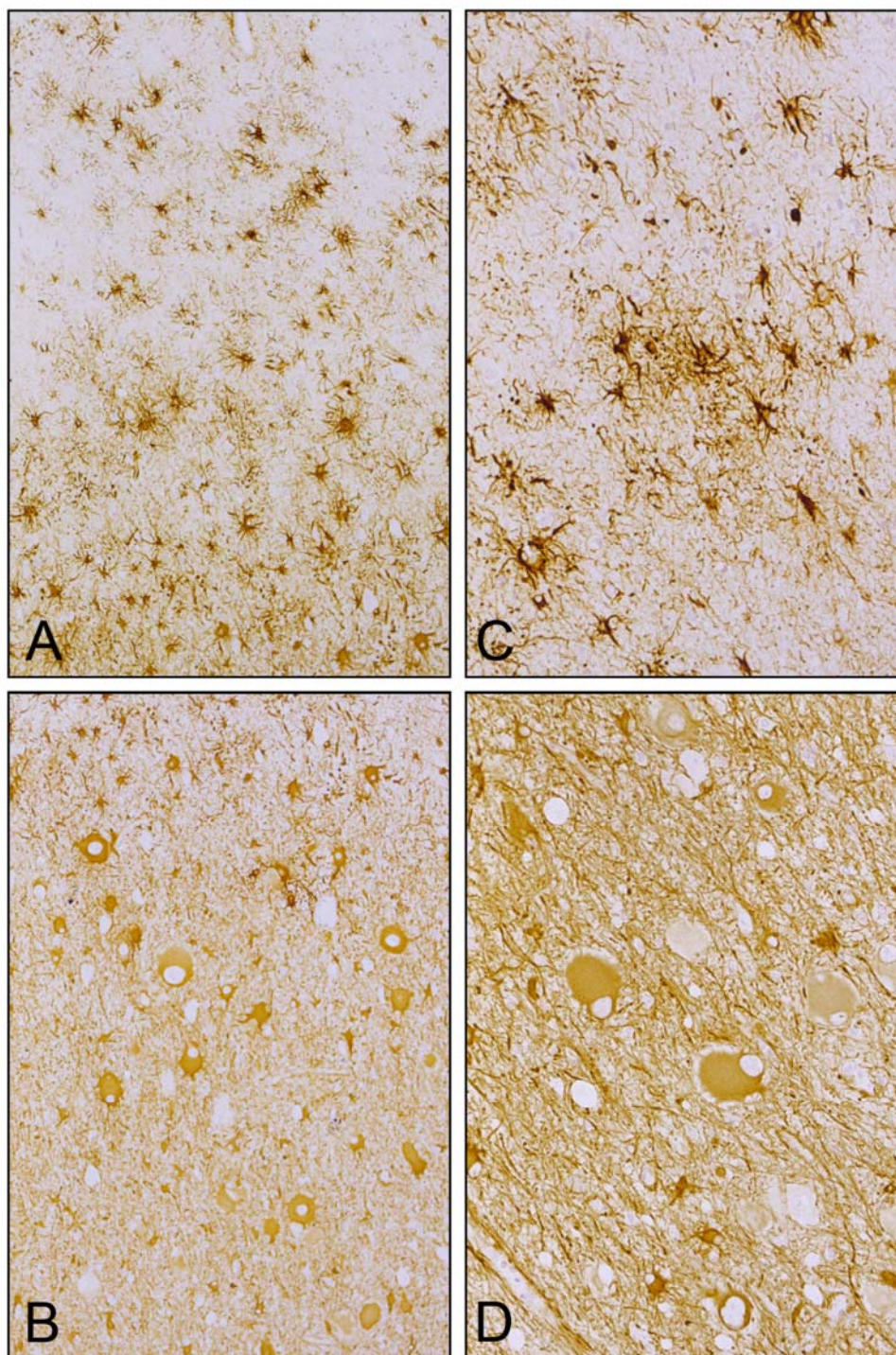


Figura 32. Expressão de GFAP em DCF IIB. Caso 1. **A:** Astrocitose subpial; observam-se diversos astrócitos e micróglia ativada fortemente marcados, próximos à superfície pial (33X). **B:** Região mais profunda e contínua à do painel A; notam-se *balloon cells*, células indeterminadas e astrócitos exibindo marcação de fraca a intensa (33X). **C:** Nota-se marcação intensa de astrócitos e fibras de Rosenthal (66X). **D:** *Ballon cells* GFAP-positivas exibindo marcação cuja intensidade varia de fraca a forte.

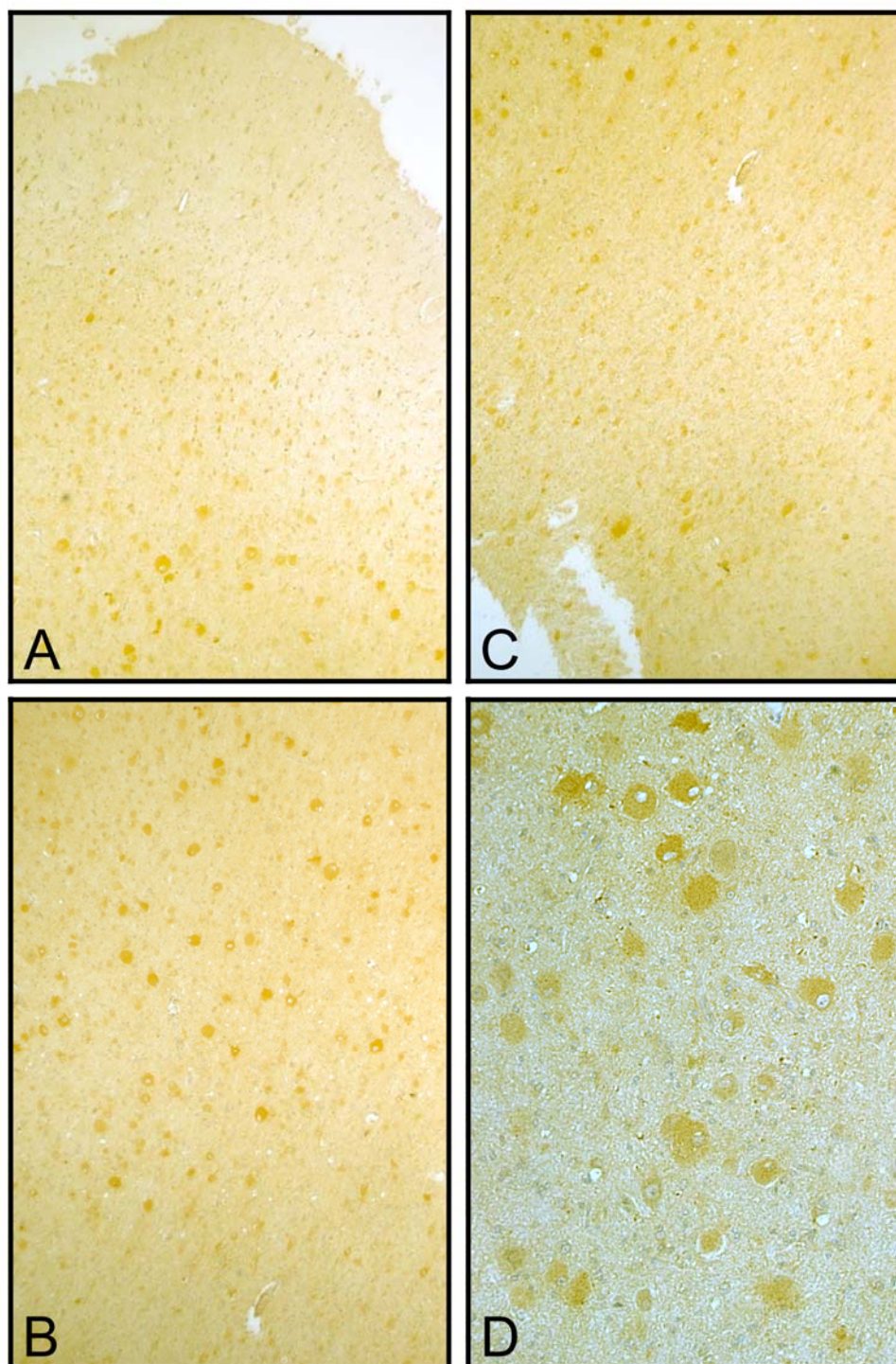


Figura 33. Expressão de drebrina em DCF IIB usando-se o anticorpo que reconhece as isoformas adulta e embrionária (M2F6). Caso 1. A, B, C e D: Notam-se células balonizadas da proximidade da superfície pial (A) até a substância branca (D), com intensidade de marcação variável (13,2X, 13,2X, 13,2X e 66X, respectivamente).

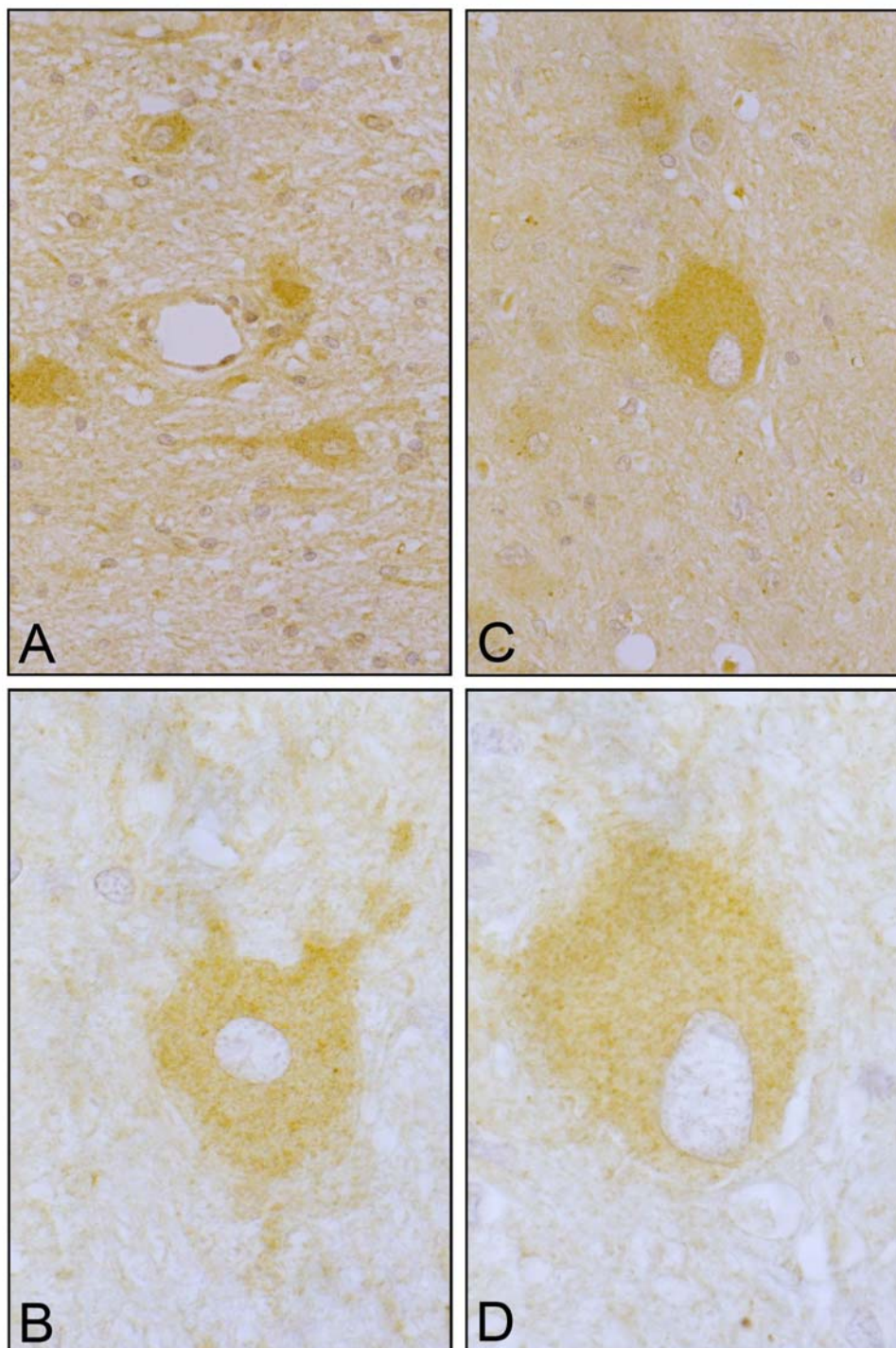


Figura 34. Expressão de drebrina em DCF IIB usando-se o anticorpo que reconhece as isoformas adulta e embrionária (M2F6). **Caso 1.** **A:** Observa-se um neurônio gigante ao redor de um vaso cujo endotélio também está marcado (132X). **B:** Uma célula indeterminada, exibindo marcação relativamente homogênea no citoplasma, e marcação nuclear (330X). **C:** Ao centro, uma *balloon cell* típica, exibindo marcação relativamente homogênea no citoplasma e marcação nuclear; ao redor dessa célula notam-se algumas outras *balloon cells* marcadas com maior e menor intensidade (132X). **D:** A membrana nuclear da *balloon cell* exibe marcação positiva (330X).

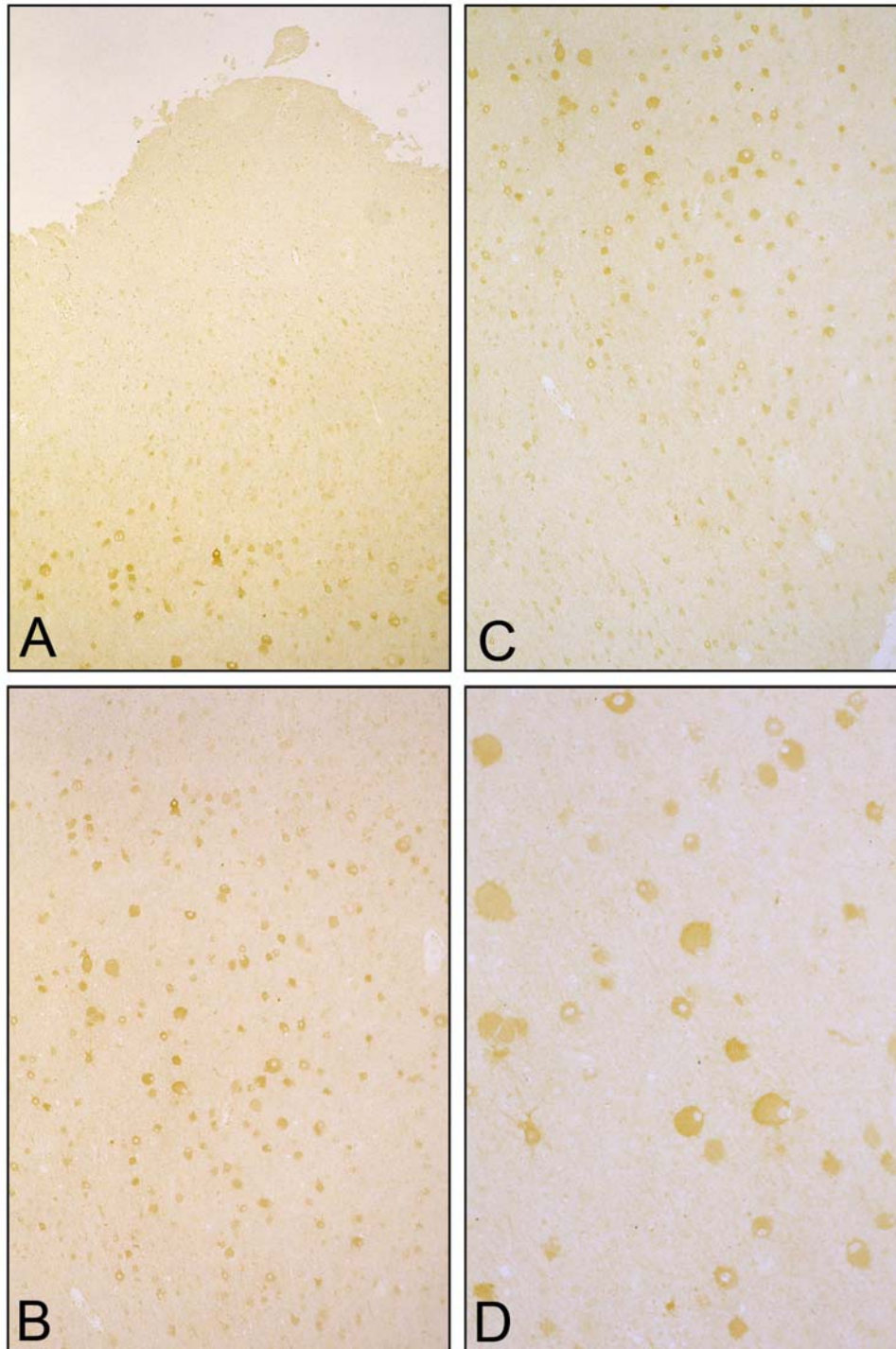


Figura 35. Expressão da isoforma adulta de drebrina em DCF IIB usando-se o anticorpo DAS2. Caso 1. A, B, C e D: Notam-se células balonizadas da proximidade da superfície pial (A) até a substância branca (D), com intensidade de marcação variável (13,2X, 13,2X, 13,2X e 66X, respectivamente).

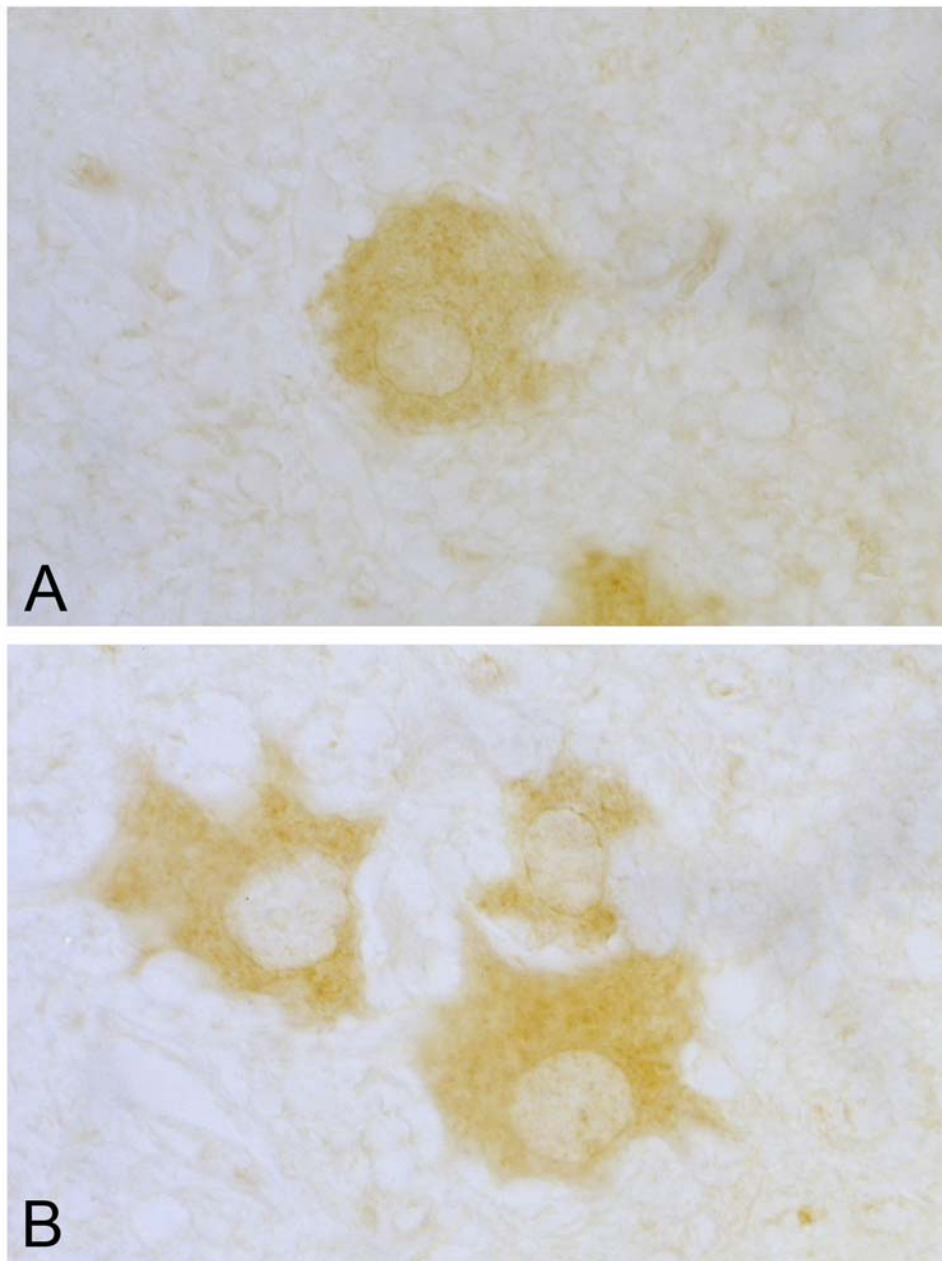


Figura 36. . Expressão da isoforma adulta de drebrina em DCF IIB usando-se o anticorpo DAS2. Caso 1. A: *Balloon cell* com citoplasma e núcleo marcados, exibindo marcação evidente da membrana nuclear (330X). **B:** Outras *balloon cells* evidenciando a marcação nuclear (330X).

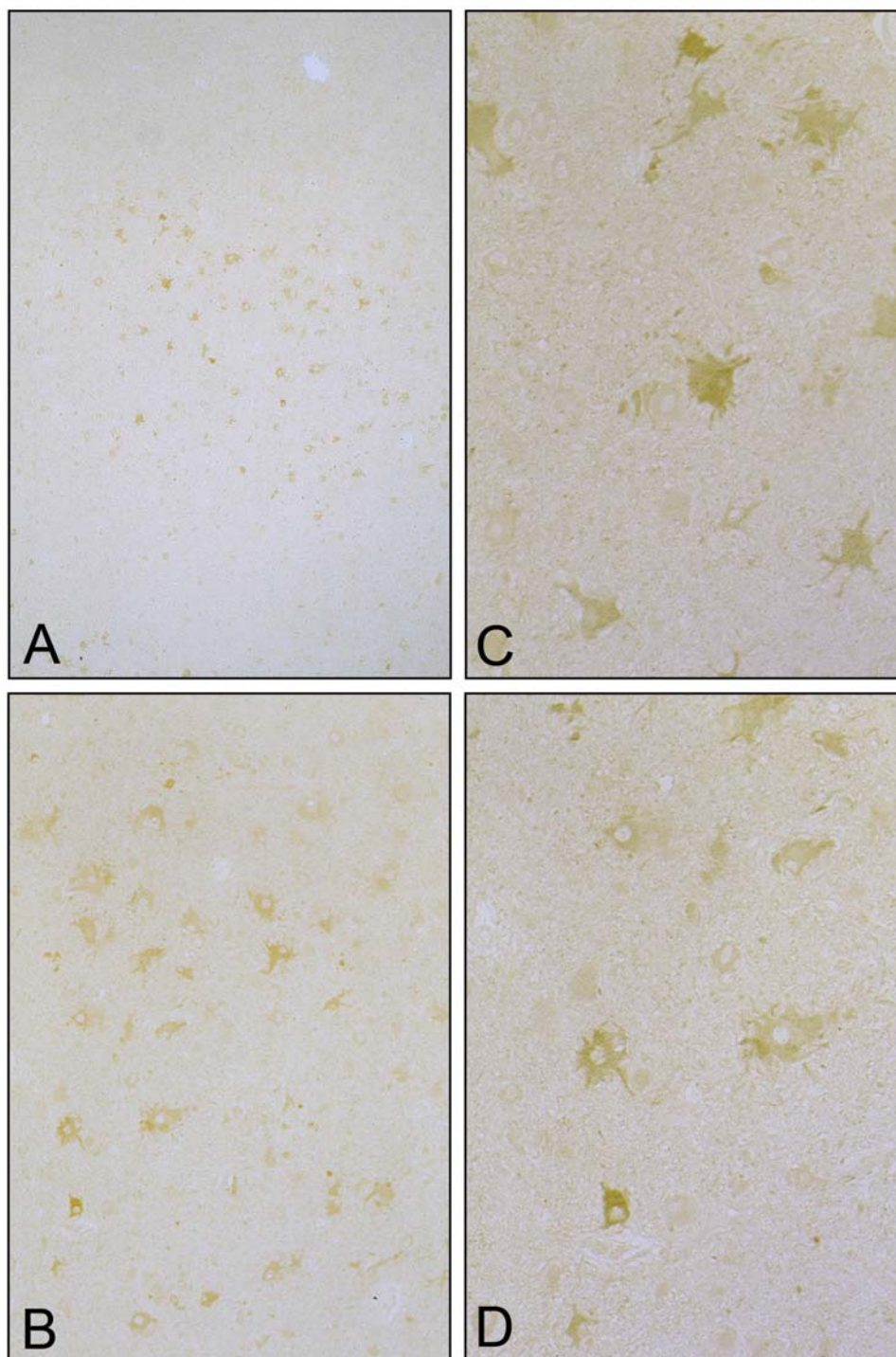


Figura 37. Expressão da isoforma adulta de drebrina em DCF IIB usando-se o anticorpo DAS2. Caso 1. A: Aglomerado de células displásicas exibindo marcação positiva (13,2X). **B:** A partir do campo acima (A) notam-se a diversidade e a forma bizarra dos tipos celulares (33X). **C:** A partir do campo acima (B) observa-se que a intensidade de marcação varia de uma célula para a outra, note-se que a forma destas células sugere astrócito ativado; pode-ser identificar também células displásicas não marcadas (66X). **D:** Observam-se marcação de *balloon cells* e de células com morfologia de glia ativada (66X).

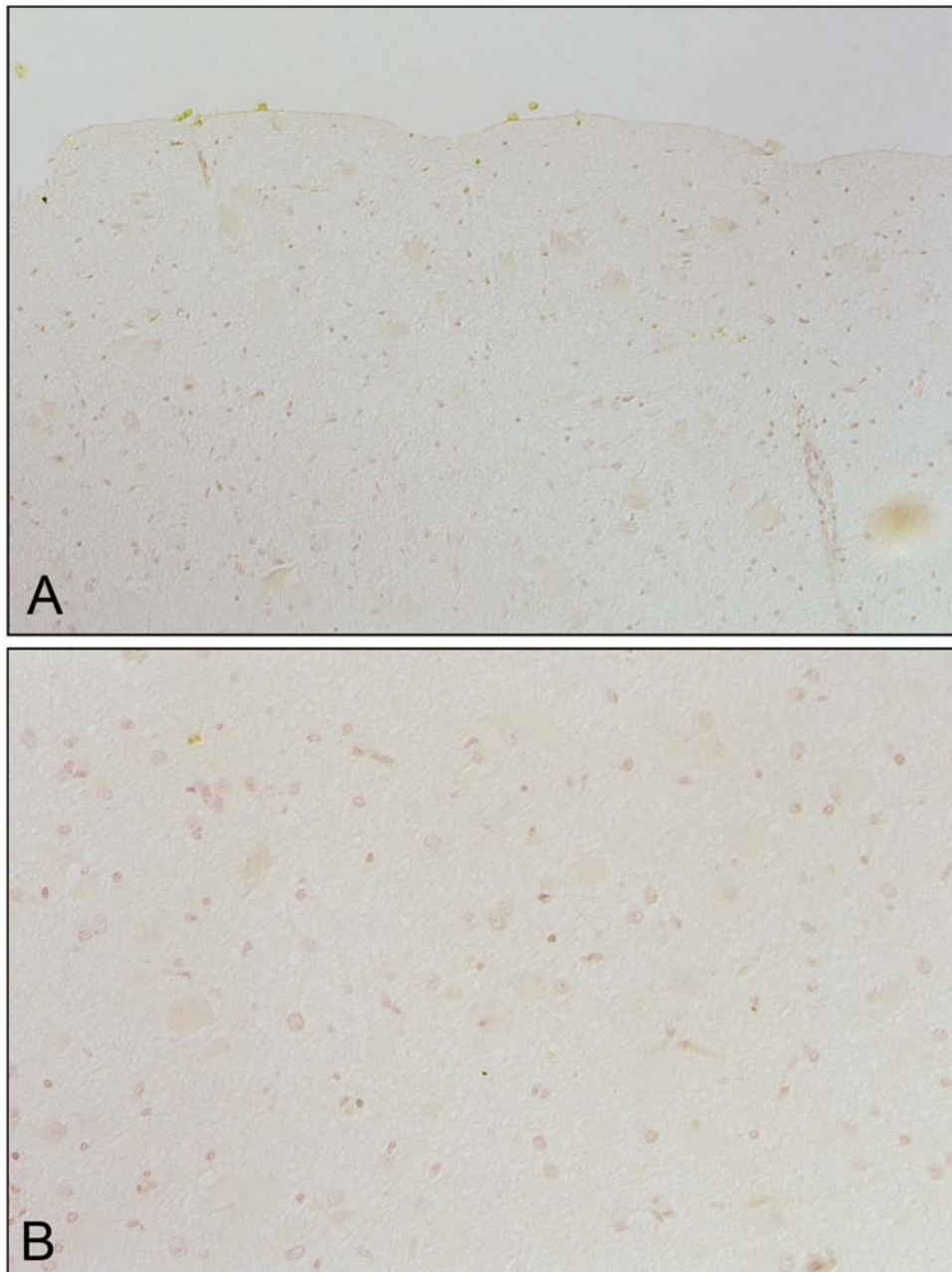


Figura 38. Controle negativo da expressão de drebrina-imunorreativa-símile em DCF IIB. Caso 1. A, nota-se ausência de marcação em vários tipos celulares, nas camadas mais superficiais do cortex (33X). B, observam-se *balloon cells* não marcadas na região subpial (33X).

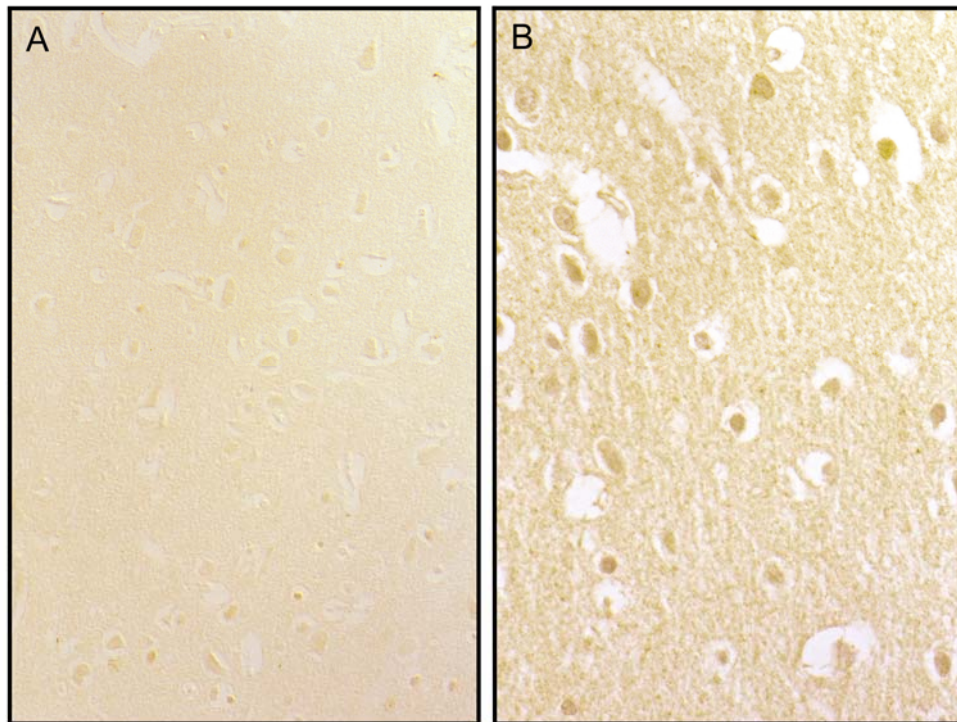


Figura 39. Expressão de drebrina em córtex temporal obtido em necrópsia. Caso 11. A: Imunodeteção usando-se o anticorpo M2F6 mostra marcação na neurópila e núcleos celulares (66X). **B:** Imunodeteção usando-se o anticorpo DAS-2 mostra marcação intensa na neurópila e núcleos celulares (132X). Óptica Nomarski.

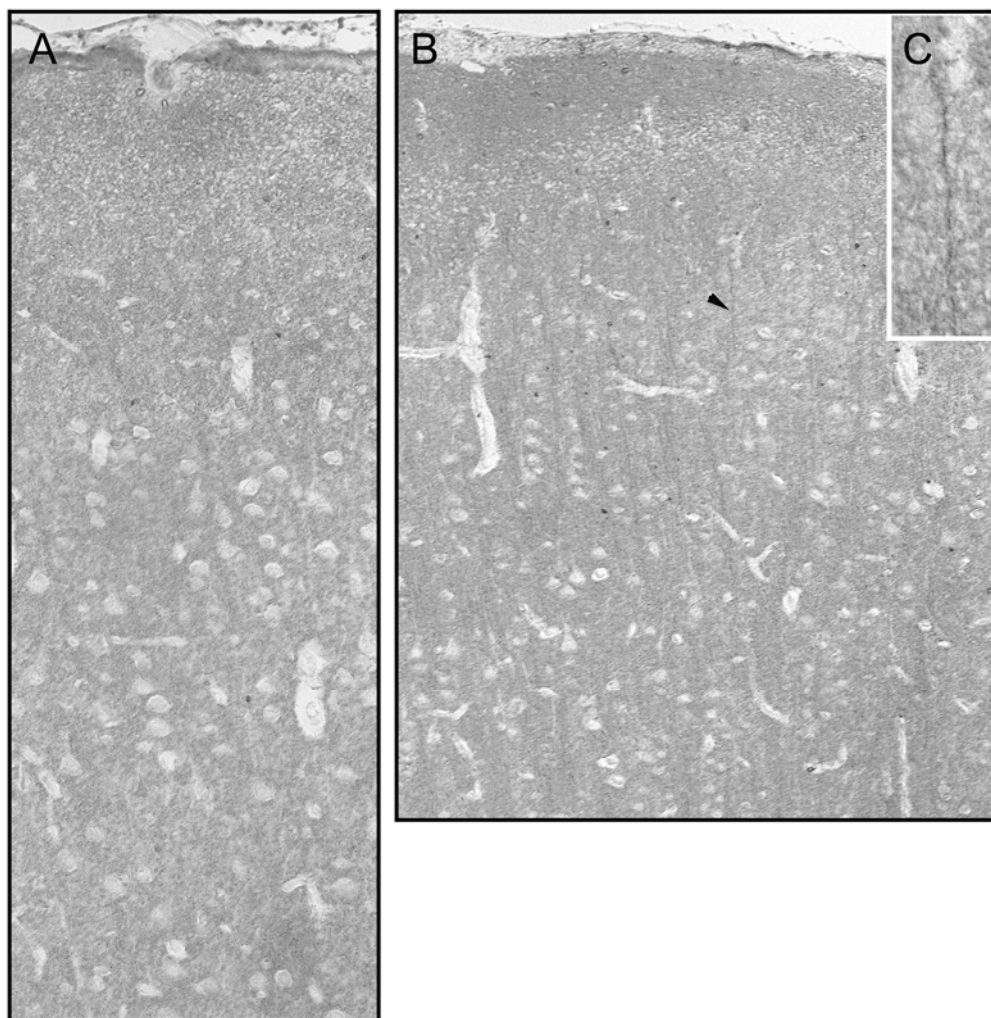


Figura 40. Expressão da isoforma adulta de drebrina em córtex temporal de paciente com epilepsia do lobo temporal/ esclerose mesial, usando-se o anticorpo DAS2. **A:** Nota-se a ausência de marcação de corpo celular, marcação punctata na camada I e na neurópila das demais lâminas corticais (66X). **B:** Observam-se fibras drebrinaA-imunorreativas nas camadas II e III, que não são visualizadas na camada I (66X); a cabeça de seta indica uma fibra que é mostrada com maior aumento no detalhe à direita, em **C** (198X).

***PARTE II - EXPRESSÃO DE DREBRINAS EM DISPLASIA CORTICAL FOCAL IIB
ASSOCIADA COM EPILEPSIA DE DIFÍCIL CONTROLE MEDICAMENTOSO***

5. CONCLUSÕES

Há expressão de drebrina-imunorreativa-símile no citoplasma e núcleo, inclusive na membrana nuclear, em *balloon cells*, células indeterminadas e neurônios citomegálicos displásicos, bem como em outras células presentes na região displásica dos tecidos DCF IIB. Esta expressão foi detectada pela imunorreatividade com os anticorpos M2F6, que reconhece as isoformas adulta e embrionária de drebrina, e DAS2, que reconhece apenas a isoforma adulta.

As marcações nuclear e justa-nuclear são mais evidentes usando-se o anticorpo M2F6, embora a presença e intensidade da marcação nuclear observada sejam variáveis. Aparentemente, maior número de *balloon cells* são imunopositivas para o M2F6, do que para o anticorpo DAS2.

Entretanto, a interpretação crítica dos resultados requer definição e obtenção de melhor tecido controle, bem como completar os dados clínicos dos casos utilizados, análise quantitativa da expressão das isoformas adulta e embrionária de drebrina e imunomarcação com a técnica do duplo anticorpo e microscopia confocal.

PARTE I - SCREENING DE UMA BIBLIOTECA DE EXPRESSÃO DE cDNA DE CEREBELO DE RATO USANDO-SE COMO SONDA O ANTICORPO ANTI-KM⁺

E

PARTE II - EXPRESSÃO DE DREBRINAS EM DISPLASIA CORTICAL FOCAL IIB ASSOCIADA COM EPILEPSIA DE DIFÍCIL CONTROLE MEDICAMENTOSO

6. REFERÊNCIAS

- ALTMAN, J. (1972a) Postnatal development of the cerebellar cortex in rat. I. The external germinal layer and transitional molecular layer. *J. Comp. Neurol.*, 145: 353-398.
- ALTMAN, J. (1972b) Postnatal development of the cerebellar cortex in rat. II. Phases in the maturation of Purkinje cells and of the molecular layer. *J. Comp. Neurol.*, 145: 399-464.
- ALTMAN, J. (1972c) Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. III. Maturation of the components of the granular layer. *J. Comp. Neurol.*, 145: 465-514.
- ALTMAN, J. (1978) Prenatal development of the cerebellar system in the rat. II. Ontogenesis and histogenesis of the inferior olive, pontine gray, and the precerebellar reticular nuclei. *J. Comp. Neurol.*, 179: 49-76.
- ALTMAN, J. (1982) Morphological development of the rat cerebellum and some of its mechanisms. In: *The Cerebellum: New vistas*, (Palay, S.L. and Chan-Palay, Eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 8-49.
- ALTMAN, J.; BAYER, S.A. (1978) Prenatal development of the cerebellar system in the rat. I. Cytogenesis and histogenesis of the deep nuclei and the cortex of the cerebellum. *J. Comp. Neurol.*, 179: 23-48.
- ALTMAN, J.; BAYER, S.A. (1997) *Development of the cerebellar system*. (J. Altman and S. Bayer, Eds.), CRC Presss, Boca Raton, USA.
- AOKI, C.; SEKINO, Y.; HANAMURA, K.; FUJISAWA, S.; MAHADOMRONGKUL, V.; REN, Y. & SHIRAO, T. (2005) Drebrin A is a postsynaptic protein that localizes in vivo to the submembranous surface of dendritic sites forming excitatory synapses. *J. Comp. Neurol.*, 483(4): 383-402.
- ASADA, H.; UYEMURA, K. & SHIRAO, T. (1994) Actin-binding protein, drebrin, accumulates in submembranous regions in parallel with neuronal differentiation. *J. Neurosci. Res.*, 38(2): 149-159.
- BABB, T.L.; YING, Z.; HADAM, J.; PENROD, C. (1998) Glutamate receptor mechanisms in human epileptic dysplastic cortex. *Epilepsy Res.*, 32(1-2): 24-33.
- BAIRD, D.H.; HATTEN, M.E.; MASON, C.A. (1992) Cerebellar target neurons provide a stop signal for afferent neurite extension in vitro. *J. Neurosci.*, 12: 619-634.
- BARKOVICH, A.J.; KUZNIECKY, R.I.; DOBYNS, W.B. (2001a) Radiologic classification system for malformations of cortical development. *Curr. Opin. Neurol.*, 14: 145-149.
- BARKOVICH, A.J.; KUZNIECKY, R.I.; JACKSON G.D.; GUERRINI, R.; DOBYNS W.B. (2001b) Classification system for malformations of cortical development: update 2001. *Neurology*, 57: 2168-2178.
- BARTH, P.G. (1987) Disorders of neuronal migration. *Can. J. Neurol. Sci.*, 14: -16.

- BENTIVOGLIO, M.; TASSI, L.; PECH, E.; COSTA, C.; FABENE, P.F.; SPREAFICO, R. (2003) Cortical development and focal cortical dysplasia. *Epileptic. Disord.*, 5 (suppl 2): S27-S34.
- BOEHRINGER MANNHEIM BIOCHEMICALS DE (2000) *Nonradioactive In Situ Hybridization Application Manual*.
- BRONSTEIN, I.; VOYTA, J.C.; MURPHY, O.J.; BRESNICK, L.; KRICKA, L.J. (1992) Improved chemiluminescent western blotting procedure. *Biothechniques*, 12(5): 748-753.
- BURKE, S.N.; BARNES, C.A. (2006) Neural plasticity in the ageing brain. *Nat. Rev. Neurosci.*, 7(1): 30-40.
- BURNETTE, W.N. (1981) "Western blotting": eletrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.*, 112(2): 195-203.
- BUTKEVICH, E.; HÜLSMANN, S.; WENZEL, D.; SHIRAO, T.; DUDEN, R.; MAJOUL, I. (2004) Drebrin is a novel connexin-43 binding partner that links gap junctions to the submembrane cytoskeleton. *Curr. Biol.*, 14(8): 650-658.
- CALON, F.; LIM, G.P.; YANG, F.; MORIHARA, T.; TETER, B.; UBEDA, O.; ROSTAING, P.; TRILLER, A.; SALEM, N. JR; ASHE, K.H.; FRAUTSCHY, S.A.; COLE, G.M. (2004) Docosahexaenoic acid protects from dendritic pathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Neuron*, 43(5): 633-645.
- CAMERON, R.S.; RAKIC, P. (1994) Identification of membrane proteins that comprise the plasmalemmal junction between migrating neurons and radial glial cells. *J. Neurosci.*, 14: 3139-3155.
- CAVINESS JR, V.S.; RAKIC, P. (1978) Mechanisms of cortical development: A view from mutatiois in mice. *Annu. Rev. Neurosci.*, 1: 297-326.
- CHENG, X.T.; HAYASHI, K.; SHIRAO, T. (2000) Non-muscle myosin IIB-like immunoreactivity is present at the drebrin-binding cytoskeleton in neurons. *Neurosci. Res.*, 36(2): 167-73
- CHEUNG, V.G.; MICHAEL, M.; AGUILAR, F.; MASSIMI, A.; KUCHERLAPATI, R.; CHILDS, G. (1999) Making and reading microarrays. *Nature*, 21: 15-19.
- CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. (1987) Single-step method pf RNA isolation by guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162: 156-159.
- CLARK, E.B.; SCHWARZ, E.; RUDOLPH, R. (1999) *Methods in Enzymology*, 309: 217.

- DUBITSKY, A.; DECOLLIBUS, D.; ORTOLANO, G.A. (2002) Sensitive fluorescent detection of protein on nylon membranes. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 51: 47-56.
- DUNAH, A.W.; WYSZYNSKI, M.; MARTIN, D.M.; SHENG, M.; STANDAERT, D.G. (2000) Alpha-actinin-2 in rat striatum: localization and interaction with NMDA glutamate receptor subunits. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 79: 77-87.
- EDELMAN, G.M. (1986) Cell adhesion molecules in the regulation of form and tissue pattern. *Ann. Rev. Cell. Biol.*, 2: 81-116.
- EDMONSON, J.C.; LIEM, R.K.; KUSTER, J.C.; HATTEN, M.E. (1988) Astrotactin: A novel neuronal cell surface antigen that mediates neuron-astroglial interaction in cerebellar microcultures. *J. Cell Biol.* 106: 505-517.
- ENGEL, M.; MAUREL, P.; MARGOLIS, R.U.; MARGOLIS, R.K. (1996) Chondroitin sulfate proteoglycans in the developing central nervous system. I. Cellular sites of synthesis of neurocan and phosphacan. *J. Comp. Neur.*, 366: 34-43.
- ESPÍNDOLA, F.C.; SUTER, D.M.; PARTATA, L.B.; CAO, T.; WOLENSKI, J.S.; CHENEY, R.E.; KING, S.M.; MOOSEKER, M.S. (2000) The light chain composition of chicken brain myosin-Va: Calmodulin, myosin-II essential light chains, and 8 kDa dynein light chain/PIN. *Cell Motil. Cytoskeleton*, 47(4): 269-281.
- FEINBERG, A.P.; VOGESTEIN, B. (1984) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Addendum. *Anal. Biochem.*, 137(1): 266-267.
- FINK, J.M.; HIRSCH, B.A.; ZHENG, C.; DIETZ, G.; HATTEN, M.E.; ROSS, M.E. (1997) Astrotactin (ASTN) a gene for glial-guided neuronal migration, maps to human chromosome 1q25.2. *Genomics*, 40: 202-205.
- FISHER, W.; HELLER, T.; HERRMANN, E.; SCHREIBOR, D. (1989) A simple method for isolation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and its use for investigation of brain tumors. *Zentralbl. Allg. Pathol.*, 135: 33.
- FUJISAWA, S.; SHIRAO, T.; AOKI, C. (2006) In vivo, competitive blockade of N-methyl-D-aspartate receptors induces rapid changes in filamentous actin and drebrin A distributions within dendritic spines of adult rat cortex. *Neuroscience*, 140(4): 1177-1187.
- FUKUYAMA, R. (1991) Purification of glial acidic protein (GFAP) from normal bovine brain. *J. Neurosci. Methods*, 40: 133-137.
- GANIKO, L.; MARTINS, A.R.; ESPREÁFICO, E.M.; ROQUE-BARREIRA, M.C. (1998) Neutrophil haptotaxis induced by the lectin KM⁺. *Glycoconjugate J.*, 15: 527-530.

- GANIKO, L.; MARTINS, A.R.; FREYMÜLLER, E.; MORTARA, R.A.; ROQUE-BARREIRA, M.C. (2005) Lectin KM+-induced neutrophil haptotaxis involves binding to laminin. *Biochim. Biophys. Acta*, 1721(1-3): 152-163.
- GAO, W.Q.; HATTEN, M.E. (1993) Neuronal differentiation rescued by implantation of weaver granule cell precursors into wild-type cerebellar cortex. *Science*, 260: 367-369.
- GARBELLI, R.; PASQUIER, B.; MINOTTI, L.; TASSI, L.; DE BIASI, S.; BENABID, A.L.; BATTGLIA, G.; MUNARI, C.; SPREAFICO, R. (1999) *Abnormal cortical development and epilepsy*. London: John Libbey and Company Ltd.
- GENETIX (1999) *Technical Support & User Guide The 'Q' Bot*.
- GOEL, M.; SINKINS, W.; KEIGHTLEY, A.; KINTER, M.; SCHILLING, W.P. (2005) Proteomic analysis of TRPC5- and TRPC6- binding partners reveals interaction with the plasmalemmal Na⁺/K⁺-ATPase. *Eur. J. Physiol.*, 451(1): 87-98.
- GOLDFINGER, L.E.; STACK, M.S.; JONES, J.C.R. (1998) Processing of Laminin-5 and its functional consequences: Role of plasmin and tissue-type plasminogen activator. *J. Cell Biol.*, 141: 256-265.
- GRANER, E.; MERCADANTE, A.F.; ZANATA, S.M.; FORLENZA, O.V.; CABRAL, A.L.; VEIGA, S.S.; JULIANO, M.A.; ROESLER, R.; WALZ, R.; MINETTI, A.; IZQUIERDO, I.; MARTINS, V.R.; BRENTANI, R.R. (2000) Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. *Mol. Brain Res.*, 76: 85-92.
- HAGEL, P.; GERDING, J.J.T.; FIEGGEN, W.; BLOEMENDAL, H. (1971) Over a 8-hr period, more than 0.1 mM cyanate accumulates in an aqueous solution of 8 M urea at 25°C at pH values above pH 5.0, which increases to 20 mM at equilibrium. *Biochim. Biophys. Acta*, 243: 366.
- HALLONET, M.E.R.; TEILLET, M.-A.; LEDOUARIN, N.M. (1990) A new approach to the development of the cerebellum provided by the quail-chick marker system. *Development*, 108: 19-31.
- HAMASHIMA, H.; TAMARU, T.; NOGUCHI, H.; KOBAYASHI, M.; TAKAMATSU, K. (2001) Immunochemical assessment of neural visinin-like calcium-binding protein 3 expression in rat brain. *Neurosci. Res.*, 39(1): 133-143.
- HARLOW E.; LANE D. (1999) *Using antibodies: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- HATANPÄÄ, K.; ISAACS, K.R.; SHIRAO, T.; BRADY, D.R.; RAPOPORT, S.I. (1999) Loss of proteins regulating synaptic plasticity in normal aging of the human brain and in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 58(6): 637-643.

- HATTEN, M.E. (1990) Riding the glial monorail: a common mechanism for glial-guided neuronal migration in different regions of the developing mammalian brain. *Trends Neurosci.*, 13: 179-184.
- HATTEN, M.E. (1999) Central nervous system neuronal migration. *Annu. Rev. Neurosci.*, 22: 511-539.
- HATTEN, M.E.; ALDER, J.; ZIMMERMAN, K.; HEINTZ, N. (1997) Genes involved in cerebellar cell specification and differentiation. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 7(1): 40-47.
- HATTEN, M.E.; LIEM, R.K.H. (1981) Astroglial cells provide a template for the positioning of developing cerebellar neurons in vitro. *J. Cell. Biol.*, 90: 622-630.
- HAYASHI, K.; SHIRAO, T. (1999) Change in the shape of dendritic spines caused by overexpression of drebrin in cultured cortical neurons. *J. Neurosci.*, 19(10): 3918-3925.
- HAYASHI, K.; ISHIKAWA, R.; KAWAI-HIRAI, R.; TAKAGI, T.; TAKETOMI, A.; SHIRAO, T. (1999) Domain analysis of the actin-binding and actin-remodeling activities of drebrin. *Exp. Cell Res.*, 253(2): 673-680.
- HAYASHI, K.; SUZUKI, K.; SHIRAO, T. (1998) Rapid Conversion of drebrin isoforms during synapse formation in primary culture of cortical neurons. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 111: 137-141.
- HAYASHI, K.; ISHIKAWA, R.; YE, L.H.; HE, X.L.; TAKATA, K.; KOHAMA, K.; SHIRAO, T. (1996) Modulatory role of drebrin on the cytoskeleton within dendritic spines in the rat cerebral cortex. *J. Neurosci.*, 16(22): 7161-7170.
- HARIGAYA, Y.; SHOJI, M.; SHIRAO, T.; HIRAI, S. (1996) Disappearance of actin-binding protein, drebrin, from hippocampal synapses in Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.*, 43: 937-992.
- HERING, H.; SHENG, M. (2001) Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2(12): 880-888.
- HUGHES, J.H.; MACK, K.; HAMPARIAN, V.V. (1988) India ink staining on nylon and hydrophobic membranes. *Anal. Biochem.*, 173(1): 18-25.
- HUSTON, J.S.; BIGNAMI, A. (1977) Structural properties of the glial fibrillary acidic protein. Evidence for intermolecular disulfide bonds. *Biochim. Biophys. Acta*, 493: 93-103.
- HYNES, R.O. (1987) Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell*, 48: 549-554.
- IKEDA, K.; SHIRAO, T.; TODA, M.; ASADA, H.; TOYA, S. & UYEMURA, K. (1995) Effect of a neuron-specific actin-binding protein, drebrin A, on cell-substratum adhesion. *Neurosci. Lett.*, 194(3): 197-200.

- IMAMURA, K.; SHIRAO, T.; MORI, K.; OBATA, K. (1992) Changes of drebrin expression in the visual cortex of the cat during development. *Neurosci. Res.*, 13(1): 33-41.
- ISHIKAWA R., HAYASHI
- JIN, M.; TANAKA, S.; SEKINO, Y.; REN, Y.; YAMAZAKI, H.; KAWAI-HIRAI, R.; KOJIMA, N.; SHIRAO, T. (2002) A novel, brain-specific mouse drebrin: cDNA cloning, chromosomal mapping, genomic structure, expression, and functional characterization. *Genomics*, 79(5): 686-692.
- KAREY, K.P.; SIRASKU, D.A. (1989) Glutaraldehyde fixation increases retention of low molecular weight proteins (growth factors) transferred to nylon membranes for western blot analysis. *Anal. Biochem.*, 178(2): 255-259.
- KIBBEY, M.C.; JUCKER, M.; WEEKS, B.S.; NEVE, R.L.; NOSTRAND, E.V.; KLEINMAN, H.K. (1993) β -Amyloid precursor protein binds to the neurite-promoting IKVAV site of laminin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 10150–10153.
- KIM, H.R.; KANG, K.I.; KANG, H.S.; KIM, H.D. (1999) Identification of Heat Shock Protein 90-Associated 84-kDa Phosphoprotein. *J. Biochem.*, 126: 1025.
- KOBAYASHI, R.; SEKINO, Y.; SHIRAO, T.; TANAKA, S.; OGURA, T.; INADA, K.; SAJI, M. (2004) Antisense knockdown of drebrin A, a dendritic spine protein, causes stronger preference, impaired pre-pulse inhibition, and an increased sensitivity to psychostimulant. *Neurosci. Res.*, 49(2): 205-217.
- KOJIMA, N.; SHIRAO, T.; OBATA, K. (1993) Molecular cloning of developmentally regulated brain protein, chicken drebrin A and its expression by alternative splicing of the drebrin gene. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 19: 101-114.
- KOJIMA, N.; KATO, Y.; SHIRAO, T.; OBATA, K. (1988) Nucleotide sequences of two embryonic drebrins, developmentally regulated brain proteins, and developmental change in their mRNAs. *Brain Res.*, 464(3): 207-215.
- KOMURO, H.; YACUBOVA, E.; RAKIC, P. (2001) Mode and tempo of tangential cell migration in the cerebellar external granular layer. *J. Neurosci.*, 21(2): 527-540.
- KONDOH, Y.; FUJITA, S.; KAGIYAMA, N.; YOSHIDA, M.C. (1998) A simple, two-color fluorescence detection method for membrane blotting analysis using alkaline phosphatase and horseradish peroxidase. *DNA Research*, 5: 217-220.
- KOO, E.H.; PARK, L.; SELKOE, D.J. (1993) Amyloid β -protein as a substrate interacts with extracellular matrix to promote neurite outgrowth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 4748–4752.

- KUCHLER, S.; ROUGON, G.; MARSCHAL, P.; LEHMANN, S.; REEBER, A.; VINCENDON, G.; ZANETTA, J.P. (1989) Location of a transiently expressed glycoprotein in developing cerebellum delineating its possible ontogenetic roles. *Neuroscience*, 33: 11-124.
- KUHAR, S.G.; FENG, L.; VIDAN, S.; ROSS, M.E.; HATTEN, M.E.; HEINTZ, N. (1993) Changing patterns of gene expression define four stages of cerebellar granule neuron differentiation. *Development*, 117: 97-104.
- LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- LAEMMLI, U.K.; FAVRE, M. (1973) Maturation of the head of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.*, 80: 575-599.
- LAPPALAINEN, P.; KESSELS, M.M.; COPE, M.J.; DRUBIN, D.G. (1998) The ADF homology (ADF-H) domain: a highly exploited actin-binding module. *Mol. Biol. Cell*, 9(8): 1951-1959.
- LARBOLETTE, O.; WOLLSCHIED, B.; SCHWEIKERT, J.; NIELSEN, P.J.; WIENANDS, J. (1999) SH3P7 is a cytoskeleton adapter protein and is coupled to signal transduction from lymphocyte antigen receptors. *Mol. Cell Biol.*, 19(2): 1539-1546.
- LETTORNEAU, P.C.; SHATTUCK, T.A. (1989) Distribution and possible interactions of actin-associated proteins and cell adhesion molecules on nerve growth cones. *Development*, 105: 505-519.
- LINDNER, J.; RATHJEN, F.G.; SCHACHNER, M. (1983) L1 mono- and poly-clonal antibodies modify cell migration in early postnatal mouse cerebellum. *Nature*, 305: 427-429.
- LOWRY, D.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. (1955) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- MACBEATH, G.; SHREIBER, S.L. (2000) Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science*, 289: 1760-1763.
- MAHADOMRONGKUL, V.; HUERTA, P.T.; SHIRAO, T.; AOKI, C. (2005) Stability of the distribution of spines containing drebrin A in the sensory cortex layer I of mice expressing mutated APP and PS1 genes. *Brain Res.*, 1064(1-2): 66-74.
- MAJOUL, I.; SHIRAO, T.; SEKINO, Y.; DUDEN, R. (2007) Many faces of drebrin: from building dendritic spines and stabilizing gap junctions to shaping neurite-like cell processes. *Histochem. Cell. Biol.* In press.

- MAMMOTO, A.; SASAKI, T.; ASAKURA, T.; HOTTA, I.; IMAMURA, H.; TAKAHASHI, K.; MATSUURA, Y.; SHIRAO, T.; TAKAI, Y. (1998) Interactions of drebrin and gephyrin with profilin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 243(1): 86-89.
- MARSTON, F.A.O.; HARTLEY, D.I. (1990) *Methods in Enzymology*, 182: 264.
- MARTINS, A.R.; DIAS, M.N.; VASCONCELOS, T.M.; CALDO, H.; COSTA, M.C.R.; CHIMELLI, L.; LARSON, R.L. (1999) Microwave-stimulated recovery of myosin-V immunoreactivity from formalin-fixed, paraffin-embedded human CNS. *J. Neur. Methods*, 92: 25-29.
- MARTINS, V.R.; GRANER, E.; GARCIA-ABREU, J.; DE SOUZA, S.J.; MERCADANTE, A.; VEIGA, S.S.; ZANATA, S.M.; NETO, V.M.; BRENTANI, R.R. (1997) Complementary hydrophathy identifies a cellular prion protein receptor. *Nat. Med.*, 3: 1376-1382.
- MARTINS, A.R.; TEIXEIRA, S.A.; VIAPIANO, M.S.; GANIKO, L.; ROQUE BARREIRA, M.C. (1998) KM^+ binding to the adult and KM^+ -immunoreactive-like expression in the developing rat cerebellum. Comunicação apresentada no V Brazilian Symposium on Extracellular Matrix, Angra dos Reis, RJ, 7 a 10 de setembro 1998.
- MASON, C.A.; CHRISTAKOS, S.; CATALANO, S.M. (1990) Early climbing fiber interaction with Purkinje cells in the postnatal mouse cerebellum. *J. Comp. Neurol.*, 297: 77-90.
- MCDONALD, R.L.; MOONEN, G.; NEALE, E.A.; NELSON, P.G. (1982) Cerebellar macroneurons in microexplant cell culture. Postsynaptic aminoacid pharmacology. *Dev. Brain Res.*, 5: 75-88.
- MERENMIES J.; PIHLASKARI R.; LAITINEN J.; WARTIOVAARA J.; RAUVALA H. (1991) 30-kDa heparin-binding protein of brain (amphoterin) involved in neurite outgrowth. Amino acid sequence and localization in the filopodia of the advancing plasma membrane. *J. Biol. Chem.*, 266(25): 16722-16729.
- MIALE, I.L.; SIDMAN, R.L. (1961) An autoradiographic analysis of histogenesis in the mouse cerebellum. *Exp. Neurol.*, 4: 277-296.
- MINGHAO, J.; TANAKA, S.; SEKINO, Y.; REN, Y.; YAMAZAKI, H.; KAWAI-HIRAI, R.; KOJIMA, N.; SHIRAO, T. (2002) A novel, brain-specific mouse drebrin: cDNA cloning, chromosomal mapping, genomic structure, expression, and functional characterization. *Genomics*, 79(5): 686-692.

- MISCHEL, P.S.; NGUYEN, L.P.; VINTERS, H.V. (1995) Cerebral cortical dysplasia associated with pediatric epilepsy. Review of neuropathologic features and proposal for a grading system. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 54: 137-153.
- MOONEN, G.; GRAU-WAGEMANS, M.P.; SELAK, I. (1982) Plasminogen activator-plasmin system and neuronal migration. *Nature*, 298: 753-755.
- NAKAGAWA, T.; ENGLER, J.A.; SHENG, M. (2004) The dynamic turnover and functional roles of alpha-actinin in dendritic spines. *Neuropharmacology*, 47: 734-745.
- NARINDRASORASAK, S.; LOWERY, D.E.; ALTMAN, R.A.; GONZALEZ-DE-WHITT, P.A.; GREENBERG, B.D.; KISILEVSKY, R. (1992) Characterization of high affinity binding between laminin and Alzheimer's disease amyloid precursor proteins. *Lab. Invest.*, 67: 643-652.
- NISHIO, S.; MORIOKA, T.; HAMADA, Y.; HISADA, K.; FUKUI, M. (1999) Immunohistochemical expression of trk receptor proteins in focal cortical dysplasia with intractable epilepsy. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 25: 188-195.
- OKABE, M.; NYAKAS, C.; BUWALDA, B.; LUITEN, P.G. (1993) In situ blotting: a novel method for direct transfer of native proteins from sectioned tissue to blotting membrane: procedure and some applications. *J. Histochem. Cytochem.*, 41(6): 927-934.
- OOE, N.; SAITO, K.; MIKAMI, N.; NAKATUKA, I.; KANEKO, H. (2004) Identification of a novel basic helix-loop-helix-PAS factor, NXF, reveals a Sim2 competitive, positive regulatory role in dendritic-cytoskeleton modulator drebrin gene expression. *Mol. Cell. Biol.*, 24(2): 608-616.
- PALMINI, A.; NAJM, I.; AVANZINI, G.; BABB, T.; GUERRINI, R.; FOLDVARY-SCHAEFER, N.; JACKSON, G.; LUDERS, H.O.; PRAYSON, R.; SPREAFICO, R.; VINTERS, H.V. (2004) Terminology and classification of the cortical dysplasias. *Neurology*, 62: S2-S8.
- PARKKINEN J.; RAUVALA H. (1991) Interactions of plasminogen and tissue plasminogen activator (t-PA) with amphotericin. Enhancement of t-PA-catalyzed plasminogen activation by amphotericin. *J. Biol. Chem.*, 266(25): 16730-16735.
- PEITSCH, W.K.; BULKESCHER, J.; SPRING, H.; HOFMAN, I.; GOERDT, S.; FRANKE, W.W. (2006) Dynamics of the actin-binding protein drebrin in motile cells and definition of a juxtannuclear drebrin-enriched zone. *Exp. Cell Res.*, 312: 2605-2618.
- PEITSCH, W.K.; GRUND, C.; KUHN, C.; SCHNOLZER, M.; SPRING, H.; SCHMELZ, M.; FRANKE, W.W. (1999) Drebrin is a widespread actin-associating protein enriched at

- junctional plaques, defining a specific microfilament anchorage system in polar epithelial cells. *Eur. J. Cell Biol.*, 78(11): 767-778.
- PIERCE (2000). Immobilized *E. coli* Lysate kit, Instruction Manual. Disposable Columns, Sample kit.
- POWELL, S.K.; WILLIAMS, C.C.; NOMIZU, M.; YAMADA, Y.; KLEINMAN, H.K. (1998) Laminin-like proteins are differentially regulated during cerebellar development and stimulate granule cell neurite outgrowth in vitro. *J. Neurosci. Res.*, 54: 233-247.
- RAKIC, P. (1971) Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electron microscopic study in *Macacus rhesus*. *J. Comp. Neurol.*, 141: 283-312.
- RAKIC, P. (1988) Specification of cerebral cortical areas. *Science*, 241: 170-176.
- RAKIC, P. (1990) Principles of neural cell migration. *Experientia*, 46: 882-891.
- RAKIC, P. (1995) A small step for the cell, a giant leap for mankind: a hypothesis of neocortical expansion during evolution. *Trends Neurosci.*, 18: 383-388.
- RAKIC, P.; CAMERON, R.; KOMURO, H. (1994) Recognition, adhesion, transmembrane signaling and cell motility in guided neuronal migration. *Curr. Op. Neurobiol.*, 4: 63-69.
- RAKIC, P.; CAVINESS JR, V.S. (1995) Cortical development: view from neurological mutants two decades later. *Neuron*, 14: 1101-1104.
- RIEGER, R.; EDENHOFER, F.; LASMEZAS, C.I.; WEISS, S. (1997) The human 37-kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells. *Nat. Med.*, 3: 1383-1393.
- ROSA, J.C.; LOPES DE OLIVEIRA, P.S.; GARRAT, R.; BELTRAMINI, L.; REISING, K.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; GREENE, L.J. (1999) KM⁺, a mannose binding lectin from *Artocarpus integrifolia*: amino acid sequence, predicted tertiary structures, carbohydrate recognition and analysis of the beta-prism fold. *Protein Sci.*, 8(11): 13-24.
- RUDOLPH, R.; BÖHM, G.; LILIE, H.; JAENICKE, R. (1997) Protein Function (T. E. Creighton Ed.), p. 57. Oxford Univ. Press, Oxford.
- RUTISHAUSER, U.; ACHESON, A.; HALL, A.; MANN, D.; SUNSHINE, J. (1988) The neural cell adhesion molecule (N-CAM) as a regulator of cell-cell interactions. *Science*, 245: 53-57.
- RYDER, E.F.; CEPKO, C.L. (1994) Migration patterns of clonally related granule cells and their progenitors in the developing chick cerebellum. *Neuron*, 12: 1011-1029.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York.

- SANGER, F.; COULSON, A.R. (1975) A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.*, 94: 441.
- SANGER, F.; NICKLER, S.; COULSON, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 5463.
- SANTOS-DE-OLIVEIRA, R.; DIAS-BARUFFI, M.; THOMAZ, S.M.O.; BELTRAMINI, L.M.; ROQUE-BARREIRA, M.C. (1994) A neutrophil migration-inducing lectin from *Artocarpus integrifolia*. *J. Immunol.*, 153: 1798-1807.
- SARNAT, H.B. (1992) *Cerebral dysgenesis: embryology and clinical expression*. New York: Oxford University Press.
- SARNAT, H.B. (2005) CNS malformations: Gene locations of known human mutations. *Eur. J. Paediatr. Neurol.*, 9: 427-431.
- SARNAT, H.B.; FLORES-SARNAT, L. (2003) Etiological classification of CNS malformations: integration of molecular genetic and morphological criteria. *Epileptic Disord*, 5(Suppl 2): S35-S43.
- SASAKI, Y.; HAYASHI, K.; SHIRAO, T.; ISHIKAWA, R.; KOHAMA, K. (1996) Inhibition by drebrin of the actin bundling activity of brain facin, a protein localized in filopodia of growth cones. *J. Neurochem.*, 66(3): 980-988.
- SEKINO, Y.; TANAKA, S.; HANAMURA, K.; YAMAZAKI, H.; SASAGAWA, Y.; XUE, Y.; HAYASHI, K.; SHIRAO, T. (2006) Activation of N-methyl-D-aspartate receptor induces a shift of drebrin distribution: disappearance from dendritic spines and appearance in dendritic shafts. *Mol. Cell Neurosci.*, 31(3): 493-504.
- SHAPIRO, L.A.; WHITAKER-AZMITIA, P.M. (2004) Expression levels of cytoskeletal proteins indicate pathological aging of S100B transgenic mice: an immunohistochemical study of MAP-2, drebrin and GAP-43. *Brain Res.*, 1019(1-2): 39-46.
- SHIM, K.S.; LUBEC, G. (2002) Drebrin, a dendritic spine protein, is manifold decreased in brains of patients with Alzheimer's disease and Down syndrome. *Neurosci. Lett.*, 324(3): 209-212.
- SHIRAO, T. (1995) The roles of microfilament-associated proteins, drebrins, in brain morphogenesis: a review. *J. Biochem.*, 117(2): 231-236.
- SHIRAO, T.; INOUE, H.K.; KANO, Y.; OBATA, K. (1987) Localization of a developmentally regulated neuron-specific protein S54 in dendrites as revealed by immunoelectron microscopy. *Brain Res.*, 413(2): 374-378.

- SHIRAO, T.; HAYASHI, K.; ISHIKAWA, R.; ISA, K.; ASADA, H.; IKEDA, K.; UYEMURA, K. (1994) Formation of thick, curving bundles of actin by drebrin A expressed in fibroblasts. *Exp. Cell Res.*, 215(1): 145-153.
- SHIRAO, T.; KOJIMA, N.; KATO, Y.; OBATA, K. (1988) Molecular cloning of a cDNA for the developmentally regulated brain protein, drebrin. *Brain Res.*, 464(1): 71-74.
- SHIRAO, T.; KOJIMA, N.; NABETA, Y.; OBATA, K. (1989) Two forms of drebrins, developmentally regulated brain proteins, in rat. *Proc. Jpn. Acad.*, 65: 169-172.
- SHIRAO, T.; KOJIMA, N.; OBATA, K. (1992) Cloning of drebrin A and induction of neurite-like process in drebrin-transfected cells. *Neuroreport*, 3: 109-112.
- SHIRAO, T.; OBATA, K. (1985) Two acidic proteins associated with brain development in chick embryo. *J. Neurochem.*, 44: 1210-1216.
- SHIRAO, T.; OBATA, K. (1986) Immunochemical homology of 3 developmentally regulated brain proteins and their developmental change in neuronal distribution. *Dev. Brain Res.*, 29: 233-244.
- SONG, Y.; CARDOUNEL, A.J.; ZWEIER, J.L.; XIA, Y. (2002) Inhibition of Superoxide Generation from Neuronal Nitric Oxide Synthase by Heat Shock Protein 90: Implications in NOS Regulation. *Biochemistry*, 41: 10616.
- SOUTHERN, E.; MIR, K.; SHCHEPINOV, M. (1999) Molecular interactions on microarrays. *Nature*, 21: 5-9.
- SPARKS, A.B.; HOFFMAN, N.G.; MCCONNELL, S.J.; FOWLKES, D.M.; KAY, B.K. (1996) Cloning of ligand targets: systematic isolation of SH3 domain-containing proteins. *Nat. Biotechnol.*, 14(6): 741-744.
- SPREAFICO, R.; ANGELINI, L.; MASTRNGELO, M.; RIZZUTI, T.; BUGIANI, O.; AVANZINI, G. (1996) Impairment of neocortical ontogenetic program leading to severe infantile encephalopathy with burst suppression. *Epilepsy Res. Suppl.*, 12: 79-87.
- STRATAGENE (2000) Lambda ZAP II Library Instruction Manual. *picoBlue Immunoscreening Kit Instruction Manual*.
- TAKAHASHI, H.; MIZUI, T.; SHIRAO, T. (2006) Down-regulation of drebrin A expression suppresses synaptic targeting of NMDA receptors in developing hippocampal neurones. *J. Neurochem.*, 97(Suppl 1): 110-115.
- TAKAHASHI, H.; SEKINO, Y.; TANAKA, S.; MIZUI, T.; KISHI, S.; SHIRAO, T. (2003) Drebrin-dependent actin clustering in dendritic filopodia governs synaptic targeting of postsynaptic density-95 and dendritic spine morphogenesis. *J. Neurosci.*, 23(16): 6586-6595.

- TARABOULOS, A.; JEUDROSKA, K.; SERBAN, D.; YANG, S.L.; DEARMOND, S.J.; PRUSINER, S.B. (1992) Regional mapping of prion proteins in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 7620-7624.
- TAYLOR, D.C.; FALCONER, M.A.; BRUTON, C.J.; CORSELIS J.A. (1971) Focal dysplasia of the cerebral cortex in epilepsy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 34: 369-387.
- TEIXEIRA, S.A.; VIAPIANO, M.S.; GANIKO, L.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; MARTINS, A.R. (2004) The novel lectin KM+ detects a specific subset of mannosyl-glycoconjugates in the rat cerebellum. *Glycoconjug. J.*, 20: 501-508.
- TODA, M.; SHIRAO, T.; MINOSHIMA, S.; SHIMIZU, N.; TOYA, S.; UYEMURA, K. (1993) Molecular cloning of cDNA encoding human drebrin E and chromosomal mapping of its gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 196(1): 468-472.
- TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. (1979) Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 4350-4354.
- VOGT, L.; GIGER, R.J.; ZIEGLER, U.; KUNZ, B.; BUCHSTALLER, A.; HERMENS, W.T.; KAPLITT, M.G.; ROSENFELD, M.R.; PFAFF, D.W.; VERHAAGEN, J.; SONDEREGGER, P. (1996) Continuous renewal of the axonal pathway sensor apparatus by insertion of new sensor molecules into the growth cone membrane. *Curr. Biol.*, 6: 1153-1158.
- WANG, H.; BLOOM, O.; ZHANG, M.; VISHNUBHAKAT, J.M.; OMBRELLINO, M.; CHE, J.; FRAZIER, A.; YANG, H.; IVANOVA, S.; BOROVIKOVA, L.; MANOGUE, K.R.; FAIST, E.; ABRAHAM, E.; ANDERSSON, J.; ANDERSSON, U.; MOLINA, P.E.; ABUMRAD, N.N.; SAMA, A.; TRACEY, K.J. (1999) HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science*, 285: 248-251.
- WYSZYNSKI, M.; LIN, J.; RAO, A.; NIGH, E.; BEGGS, A.H.; CRAIG, A.M.; SHENG, M. (1997) Competitive binding of alpha-actin and calmodulin to the NMDA receptor. *Nature*, 385: 439-442.
- YAMANOUCHI, H.; JAY, V.; OTSUBO, H.; KAGA, M.; BECKER, L.E.; TAKASHIMA, S. (1998) Early forms of microtubule-associated protein are strongly expressed in cortical dysplasia. *Acta Neuropathol. (Berl)*, 95: 466-470.
- YAMASHIRO-MATSUMURA, S.; MATSUMURA, F. (1986) Intracellular localization of the 55-kD actin-bundling protein in cultured cells: spatial relationships with actin, alpha-actinin, tropomyosin, and fimbrin. *J. Cell Biol.*, 103(2): 631-640.

- YAMAZAKI, H.; TAKAHASHI, H.; AOKI, T.; SHIRAO, T. (2001) Molecular cloning and dendritic localization of rat SH3P7. *Eur. J. Neurosci.*, 14(6): 998-1008.
- ZHENG, C.; HEINTZ, N.; HATTEN, M.E. (1996) CNS gene encoding astrotactin, which supports neuronal migration along glial fibers. *Science*, 272: 417-419