Camila de Oliveira Freitas Machado

“Estudo do envolvimento da proteína
colibistina no controle do início da tradução”

*“Study of the involvement of collybistin in the
control of translation initiation”*

Instituto de Biociências

Universidade de São Paulo

São Paulo

2014

Camila de Oliveira Freitas Machado

“Estudo do envolvimento da proteína
colibistina no controle do início da tradução”

*“Study of the involvement of collybistin in the
control of translation initiation”*

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências da Universidade de
São Paulo, para a obtenção de Título
de Mestre em Ciências, na Área de
Biologia/Genética.

Orientador(a): Andréa Laurato Sertié

São Paulo

2014

Ficha Catalográfica

Machado, Camila

Estudo do envolvimento da proteína colibistina no controle da tradução.

Número de páginas: 57

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. Colibistina 2. Sinalização mTOR 3. Síntese proteica.

Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof.(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr.(a). Andréa Laurato Sertié

Orientadora

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, a Ele que muitas vezes recorri em oração nas dificuldades passadas nesses anos de trabalho longe da minha família.

Agradeço à minha família, em especial a minha mãe Rosa Maria por ter sido sempre a melhor mãe, amiga e exemplo de vida que qualquer filha poderia sonhar em ter. Obrigada mãe por ser essa mulher batalhadora e por sempre estar ao meu lado mesmo de longe, sempre torcendo por mim. Esses anos fora de casa e o pouco tempo que pude dispor para te visitar foram extremamente difíceis, mas sei que sempre pude contar com você. Ao meu avô Almiro e meu irmão Guilherme, que eu amo do fundo do meu coração, obrigada, não seria nada sem vocês.

Agradeço de todo meu coração à minha orientadora Dra. Andréa Sertie, pela confiança e oportunidade que me ofereceu de realizar meu sonho de fazer meu mestrado em um laboratório e em uma faculdade de excelência. Agradeço também por tudo que me ensinou por estar sempre próxima e aberta a discussões e a esclarecer a todas as dúvidas que surgiram. Sempre levarei como exemplo sua dedicação e entrega à pesquisa. Agradeço também a May Suzuki e à Karina Griesi por todo o apoio técnico.

Meus sinceros agradecimentos a todos as pessoas que estiveram ao meu lado durante esses anos de trabalho me apoiando e me dando forças para continuar quando a falta da minha família me abalava. Em especial deixo meus agradecimentos ao Paulo Bogiani, pois sempre foi e sempre será alguém especial na minha vida que sempre esteve ao meu lado, me dando apoio, carinho e conselhos. Assim como a Fernanda Quintino, uma irmã que Deus colocou em meu caminho, com quem eu sempre pude contar para todos os momentos. As amigas de longa data Carina Jank, Kethleen Mesquita e Letícia Moraes amigas que estiveram comigo desde o início de faculdade. Espero sempre ter a presença de cada um em minha vida.

Agradeço a todos do Laboratório de Pesquisa Experimental, pessoas que fizeram parte do meu dia a dia e que participaram de alguma forma do desenvolvimento desse trabalho. Em especial à Marta Diniz (Martinha) e Stephanie Martins pelo apoio técnico, pelas conversas e também pela amizade e carinho que sempre levarei comigo.

Por fim, agradeço a CAPES, FAPESP, UNIEMP e ao Autismo e Realidade pelo apoio financeiro.

Nota da Autora

Esta dissertação de Mestrado compreende um trabalho inédito desenvolvido durante os anos de 2012 a 2014 no Laboratório de Pesquisa Experimental do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa do Hospital Albert Einstein, em colaboração com o Laboratório de Genética do Desenvolvimento do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP).

A apresentação do trabalho seguiu o modelo de divisão em capítulos/artigos, modelo aceito atualmente pelos programas de pós-graduação do IB-USP. São apresentados apenas os estudos que resultaram na elaboração de um artigo científico original, que será em breve submetido para publicação em revista científica com seletiva política editorial. Por esse motivo, optei por redigi-lo em inglês. As seções referentes à introdução, metodologia, discussão geral e conclusões estão escritas em português, conforme especificado pelas regras do IB-USP.

As referências bibliográficas referentes ao artigo estão relacionadas ao final do mesmo. Já as referências bibliográficas que constam na introdução, metodologia e discussão encontram-se ao final da dissertação. A norma bibliográfica escolhida foi a estipulada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), exceto para o capítulo referente ao artigo científico.

Índice

CAPITULO I – Introdução Geral e Objetivos	1
1.1. Sistema nervoso central humano e sinapses.....	1
1.2. Proteína colibistina: características e funções	3
1.3. Controle de início de tradução em eucariotos	9
1.4. Via de sinalização mTORC1, controle da síntese proteica e transtornos neurológicos. ..	12
1.5. Geração de células-tronco pluripotentes induzidas, células neuroprogenitoras e neurônios a partir de fibroblastos do paciente K401	14
2. Objetivos	16
CAPITULO 2 – Material e Métodos	17
2.1. Paciente K401 e indivíduos controles	17
2.2. Cultura e transfeção das células HEK293T (<i>Human Embryonic Kidney Cells</i>).....	17
2.3. Cultura de células neuroprogenitoras (NPCs, <i>neural progenitor stem cells</i>) derivadas de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs, <i>induced pluripotent stem cells</i>)	19
2.4. Extração de proteínas totais e quantificação	21
2.5. Coimunoprecipitação	21
2.6. Imunoblot	22
2.7. Imunofluorescência	23
2.8. Análise estatística	24
CAPITULO 3 - <i>Collybistin binds and modulates mTORC1 signaling: a potential novel mechanism contributing to collybistin-related neuropathology</i>	25
CAPITULO 4 – Discussão Geral e Conclusões	40
RESUMO	43
ABSTRACT	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
ANEXO	51

CAPÍTULO I – Introdução Geral e Objetivos

1.1. Sistema nervoso central humano e sinapses

O Sistema Nervoso Central (SNC) humano é formado pelo encéfalo e medula espinhal. As células que compõem o SNC podem ser agrupadas em duas amplas categorias: células da glia e neurônios. As células da glia são elementos suporte, que protegem e nutrem os neurônios, mas podem possuir também um papel secundário no processamento de informações. Os neurônios são a unidade funcional do sistema nervoso, sendo responsáveis por transmitir as informações do encéfalo para os demais órgãos do corpo por meio de sinais nervosos.

Os neurônios são células altamente especializadas compostas por três partes principais: corpo celular constituído pelo núcleo, citoplasma e organelas celulares; os dendritos, ramificações do corpo celular responsáveis pela recepção dos estímulos transmitidos por outros neurônios; e o axônio, que também pode se ramificar e formar diversos terminais axônicos, que são responsáveis por transmitir os estímulos para outros neurônios.

Os neurônios comunicam-se por meio de uma sinalização que na maioria dos casos é química, algumas vezes elétrica, e ocasionalmente uma mistura de ambas, a qual ocorre em regiões denominadas de sinapses nervosas. As sinapses ocorrem geralmente entre o axônio de um neurônio e o dendrito de outro, mas também podem ocorrer em outras combinações menos frequentes como, por exemplo, entre axônios de dois neurônios. A região do terminal axônico onde ele contacta outro neurônio é denominada membrana pré-sináptica, e a superfície especializada do neurônio que recebe o terminal axônico é denominada membrana pós-sináptica. O contato físico direto entre as membranas pré e pós-sinápticas não existe realmente, mas há um espaço entre elas denominado fenda sináptica (Pereda, 2014).

As sinapses alteram o potencial de membrana de um neurônio, tornando-o mais propenso (sinapse excitatória) ou menos propenso (sinapse inibitória) a atingir um potencial de ação, desencadeando a transmissão do impulso nervoso (onda de descarga elétrica que percorre a membrana do axônio). A comunicação sináptica entre neurônios depende (no caso das sinapses químicas) da liberação de neurotransmissores da

membrana pré-sináptica e ligação desses neurotransmissores a receptores específicos na membrana pós-sináptica. Essa ligação e subsequente abertura de tais receptores permite que haja a entrada ou saída de íons específicos que alteram a carga da membrana (polarizando ou despolarizando) possibilitando que a célula responda ao estímulo e transmita a informação recebida.

O balanço entre sinapses excitatórias e sinapses inibitórias e a capacidade da célula de responder aos impulsos enviados, tanto pela quantidade de receptores acumulados em sua membrana quanto pela quantidade de neurotransmissores liberados, define a eficiência de resposta e transmissão de informação entre a rede de cerca de 86 bilhões de neurônios existentes no ser humano (Kennedy, 2013).

Diversos estudos mostram a importância entre o balanço entre sinapses excitatórias e inibitórias tanto para a formação inicial do SNC como para o funcionamento ideal desse sistema por toda a vida do indivíduo. Em alguns transtornos neurológicos, como por exemplo autismo e esquizofrenia, esse balanço encontra-se comprometido prejudicando diversos processos celulares, tais como aqueles ligados a ativação de vias de sinalização intracelulares que controlam a síntese de proteínas nos neurônios, descritos de forma mais detalhada mais adiante neste texto (Wondolowski e Dickman, 2013).

1.1.1. Sinapses inibitórias do sistema nervoso central

No SNC dos mamíferos a atividade neural normal depende, em grande parte, da neurotransmissão inibitória. As sinapses inibitórias são importantes para prevenir excitação prolongada e cancelar respostas a estímulos repetitivos. Ainda, recentemente Jasinska *et al.* (2013) mostraram a presença de complexos polissômicos (relacionados ao processo de tradução de RNAs mensageiros) em neurônios inibitórios após tratamento para indução de aprendizagem pelo medo, o que sugere que esse tipo de sinapse possa ser importante também na conversão de memória curta em memória permanente.

Nas sinapses inibitórias os neurotransmissores mais importantes são o ácido gama-aminobutírico (GABA) e a glicina. Os receptores ionotrópicos para GABA (ou receptores GABA_A) são responsáveis pela maior parte da transmissão sináptica inibitória rápida no encéfalo, pela maturação das sinapses inibitórias, e pelo aumento

da dinâmica dos axônios, o que permite maior e mais rápida formação e regressão de botões sinápticos em resposta a estímulos (Sigel e Steinmann, 2012, Schuemann *et al.*, 2013). Receptores de glicina mediam a neurotransmissão inibitória na espinha dorsal e tronco cerebral, e são responsáveis pelo controle de várias funções sensoriais e motoras, incluindo visão e audição (Lynch, 2004, Dutertre *et al.*, 2012).

Os receptores de GABA e glicina são formados por pentâmeros de subunidades proteicas: receptores GABA_A são compostos mais frequentemente por duas subunidades α , duas β e uma $\gamma 2$; receptores de glicina geralmente apresentam três subunidades $\alpha 1$ e duas β . Ainda, a maioria dessas subunidades se subdivide em várias isoformas polipeptídicas. Tais receptores atuam como canais permeáveis a íons cloro, cujo influxo produz potenciais pós-sinápticos hiperpolarizantes inibidores (Moss e Smart, 2001).

O acúmulo desses receptores na membrana pós-sináptica em justaposição aos terminais pré-sinápticos de liberação dos neurotransmissores é essencial para a transmissão sináptica inibitória eficiente. Duas proteínas envolvidas no agrupamento de receptores de glicina e GABA_A e, portanto, na formação e funcionamento das sinapses inibitórias do SNC são as proteínas gefirina e colibistina, esta última alvo de estudo do presente trabalho.

1.2. Proteína colibistina: características e funções

1.2.1. Características gerais

A proteína colibistina (em inglês *collybistin*) humana foi inicialmente caracterizada e nomeada como hPEM-2 (Reid *et al.*, 1999). Colibistina é uma proteína GEF (*guanine nucleotide exchange factor*) e, portanto, apresenta como uma de suas funções a ativação de proteínas Rho-like GTPases como esquematizado no Box 1.

Quando ativadas, as proteínas Rho-like GTPases controlam a organização do citoesqueleto de actina e estão envolvidas em vários processos celulares que incluem migração, adesão e polarização celular, direcionamento de axônios e organização e funcionamento das sinapses (Luo *et al.*, 1997, Luo, 2000). Mutações deletérias em proteínas envolvidas na cascata de sinalização das Rho-like GTPases estão relacionadas com doenças neurológicas que podem incluir em seu quadro deficiência intelectual,

autismo, esquizofrenia e epilepsia (Ba *et al.*, 2013).

BOX 1. Proteínas Rho-like GTPases

As proteínas intracelulares Rho-like GTPases agem como interruptores moleculares por alternarem entre um estágio ativado (ligadas a uma molécula de GTP) e um estágio desativado (ligadas ao GDP). A desativação é regulada por proteínas GAPs (*GTPase-activating proteins*), que estimulam a atividade GTPase intrínseca das Rho-like GTPases, resultando na substituição de GTP por GDP. No estado desativado, proteínas GDI (*GDP dissociation inhibitors*) estabilizam a ligação das Rho-like GTPases ao GDP. Já a ativação requer a retirada da molécula de GDP e subsequente substituição por uma molécula de GTP, reação esta efetuada por proteínas GEFs (*guanine nucleotide exchange factor*) (Boguski e McCormick, 1993). Rho-like GTPases controlam diversos processos celulares como: expressão gênica, rearranjo do citoesqueleto de actina, polarização celular, transporte intracelular de vesículas e endocitose.

Estudos *in vitro* demonstraram que a proteína colibistina humana ativa especificamente a Rho-like GTPase Cdc42, e que quando superexpressa em fibroblastos provoca o rearranjo do citoesqueleto de actina, a formação de filopódios, e uma forma arredondada à célula (Reid *et al.*, 1999).

Colibistina, assim como todas as proteínas GEF, caracteriza-se pela presença dos domínios DH (*dbl homology*) e PH (*pleckestrin homology*). O domínio DH é responsável pela atividade catalítica da proteína, isto é, pela substituição GDP/GTP. O domínio PH liga-se ao fosfolípido PI3P (fosfatidilinositol 3-fosfato) na membrana plasmática e é importante para a localização da proteína junto à membrana. Além desses dois domínios, colibistina apresenta também o domínio SH3 (*src homology 3*) na região N-terminal, e uma sequência rica em resíduos de prolina (denominada *coiled-coil* ou CC) na porção C-terminal (Reid *et al.*, 1999).

Quatro diferentes isoformas de colibistina (ou CB) foram descritas em ratos e camundongos, as quais diferem quanto às regiões N- e C-terminais, mas

compartilham a região central com os domínios DH e PH. Essas isoformas foram nomeadas da seguinte forma: CB1 (apresenta os domínios SH3-DH-PH-CC), CB2SH3+ (o domínio CC está ausente), CB2SH3- (os domínios SH3 e CC estão ausentes), e CB3 (semelhante à CB1, porém o domínio CC é mais longo).

Experimentos de RT-PCR utilizando RNAs provenientes de encéfalo e espinha dorsal de ratos adultos demonstraram que as isoformas CB2SH3+ e CB3 são as mais abundantes (Kins *et al.*, 2000). Em humanos, apenas a isoforma CB3 foi identificada em encéfalo e espinha dorsal (Box 2) (Harvey *et al.*, 2004).

BOX 2. Estrutura da isoforma CB3

Esquema da proteína colibistina humana, a qual apresenta 516 resíduos de aminoácidos e 62kDa. Colibistina humana é composta pelos domínios SH3 (*src homology 3*), DH (*dbl homology*), PH (*pleckstrin homology*) e CC (*coiled-coil*). O primeiro e o último resíduo de aminoácido de cada domínio estão indicados.

Estudos de hibridização *in situ* no SNC de camundongo utilizando uma sonda comum a todas as isoformas de *colibistina* e uma sonda específica para as isoformas com o domínio SH3 demonstraram expressão do gene da colibistina em diversas regiões, incluindo hipocampo, córtex cerebral, cerebelo, bulbo olfatório e espinha dorsal, tanto durante o desenvolvimento (a partir de E13) como na fase adulta (Kneussel *et al.*, 2001).

1.2.2. Papel da colibistina no funcionamento das sinapses inibitórias do SNC

As funções da proteína colibistina começaram a ser mais bem entendidas quando foi descrita sua interação com gefirina (do inglês *gephyrin*) (Kins *et al.*, 2000), uma proteína *scaffold* presente em sítios pós-sinápticos inibitórios, que desempenha papel fundamental no agrupamento de receptores de glicina e de certos subtipos de

receptores GABA_A.

Kins *et al.* (2000) e Harvey *et al.* (2004) demonstraram, por meio de experimentos com células de mamíferos em cultura, que a isoforma de colibistina sem o domínio SH3 (CB2SH3-) era responsável por alterar a distribuição intracelular de agrupamentos de gefirina, promovendo o deslocamento de agregados intracelulares da proteína para junto da membrana plasmática. Ainda, esses agregados de CB2SH3-/gefirina eram capazes de recrutar receptores de glicina para a membrana. Estes resultados sugeriram que CB2SH3- desempenha papel importante nas cascatas de sinalização que promovem recrutamento de gefirina, e consequentemente de receptores de neurotransmissores inibitórios, para a membrana pós-sináptica. Por outro lado, foi mostrado que as variantes maiores que contém o domínio SH3 (CB1, CB2SH3+ e CB3) associam-se com agregados de gefirina no citoplasma das células em cultura analisadas, não sendo capazes de recrutar esses agregados para junto da membrana plasmática. Tais resultados sugeriram que o domínio SH3 tinha uma função inibitória.

Recentemente, foi demonstrado que o domínio SH3 de colibistina interage com as proteínas transmembrânicas de adesão celular neuroligina 2/4 e com a subunidade $\alpha 2$ de receptores GABA_A (Papadopoulos *et al.*, 2008, Hoon *et al.*, 2009, Pouloupoulos *et al.*, 2009; Saiepour *et al.*, 2010). Essas interações parecem atenuar o efeito inibitório do domínio SH3 sobre o recrutamento de agregados de colibistina/gefirina para junto da membrana plasmática, tornando as isoformas de colibistina que apresentam o domínio SH3 capazes de efetuar tal função. A ação inibitória do domínio SH3 sobre o agrupamento de gefirina e receptores GABA_A nos sítios pós-sinápticos inibitórios foi mais recentemente confirmada por Chiou *et al.* (2011). Ainda, Tyagarajan *et al.* (2012) observaram que a isoforma de colibistina sem o domínio SH3 (CB2SH3-) interage com gefirina e com a Rho-like GTPase Cdc42 formando um complexo ternário, e que Cdc42 coopera com CB2SH3- no transporte dos agrupamentos de gefirina e receptores GABA_A para a membrana pós-sináptica.

Além de interagir fisicamente com a proteína gefirina, colibistina também tem um papel indireto em sua fosforilação. Kuhse *et al.* (2012) mostraram que a fosforilação de gefirina no resíduo de serina S270 é dependente tanto da ativação de proteínas quinases como GSK3 β e CDK5 como da presença de colibistina. Ainda não se sabe ao certo os mecanismos pelos quais a fosforilação de gefirina no resíduo S270 contribuem para seu funcionamento em sinapses inibitórias, contudo os autores verificaram que

mutações em gefirina em resíduos próximos ao S270, que impedem sua fosforilação, provocam alteração no tamanho de seus agrupamentos proteicos.

Por fim, Mayer *et al.* (2013) mostraram mais recentemente que a Rho-like GTPase TC10, que é homóloga a Cdc42, se liga no domínio PH de colibistina e promove sua ativação, resultando no aumento da quantidade de agrupamentos de gefirina na membrana pós-sináptica. Os autores sugeriram que TC10 ativa colibistina por provocar alteração de sua conformação, em um mecanismo semelhante ao proposto previamente para as interações entre colibistina e GABA_A e neuroligina 2/4, o que resultaria na ligação de colibistina à membrana pós-sináptica e recrutamento dos agrupamentos de gefirina.

1.2.2. Modelos animais de perda de função da proteína colibistina

Camundongos nocautes para o gene da colibistina, em concordância com parte dos resultados obtidos com os experimentos *in vitro*, apresentam redução expressiva de agrupamentos de gefirina e de receptores GABA_A na membrana pós-sináptica de neurônios localizados em regiões específicas do SNC, incluindo hipocampo e amígdala basolateral. Por outro lado, a localização sináptica de receptores de glicina permaneceu inalterada, mostrando, ao contrário do que havia sido inicialmente sugerido nos experimentos iniciais com células em cultura, que colibistina não é essencial para o agrupamento desse tipo de receptor *in vivo*. Além disso, experimentos que verificaram a atividade de neurônios hipocampais mostraram diminuição da inibição GABAérgica (redução da frequência das *mIPSCs*, *miniature inhibitory postsynaptic currents*, de neurônios piramidais da região CA1 do hipocampo) e alteração da plasticidade do hipocampo. Ainda, testes comportamentais mostraram que os camundongos nocautes, embora sejam viáveis e tenham longevidade normal, apresentam níveis aumentados de ansiedade e aprendizado prejudicado da localização espacial (Papadopoulos *et al.*, 2007, Jedlicka *et al.*, 2009).

1.2.3. Mutações no gene da colibistina em humanos

O gene humano que codifica a proteína colibistina (gene *ARHGEF9*) está localizado em Xq11.2, apresenta 11 exons e abrange uma região de cerca de 190kb de DNA genômico. Em humanos já foram descritas na literatura cinco diferentes mutações patogênicas de perda de função no gene *ARHGEF9*, as quais estão associadas com alterações neurológicas como hiperecplexia (resposta de sobressalto excessiva a estímulos inesperados), retardo mental, epilepsia, hiperestimulação sensorial, ansiedade, e comportamento agressivo (Harvey *et al.* 2004, Marco *et al.*, 2009, Kalscheuer *et al.*, 2009, Shimojima *et al.*, 2011, Lesca *et al.*, 2011).

No ano de 2010, o Dr. Fernando Kok (médico neurologista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – USP) e a Profa. Carla Rosenberg (docente do Instituto de Ciências Biológicas da USP, IB-USP) identificaram, pela metodologia de array-CGH, um menino brasileiro que apresenta uma deleção *de novo* de 175 Kb do cromossomo Xq11. 2 que abrange todo o gene *ARHGEF9* (esta é a única mutação identificada no paciente). Este menino, nomeado K401, hoje está com 13 anos de idade e apresenta retardo mental bastante grave, ausência completa de fala, características autistas de comportamento e algumas crises epiléticas (dados ainda não publicados).

1.2.4. A proteína colibistina no cenário do controle de início da tradução

Há alguns anos, o grupo da Dra. Andréa Sertié iniciou um projeto de pesquisa que tinha como um de seus objetivos principais a identificação de outras proteínas que interagem com a colibistina. Foram realizados experimentos de duplo-híbrido de levedura utilizando toda a região codificadora de colibistina como “isca” e uma biblioteca de cDNA de cérebro humano fetal como “presa”. Após diversas etapas de triagens e confirmação das interações, foi identificada a subunidade p40 do complexo 3 de início da tradução em eucariotos (proteína eIF3H) como uma nova proteína que interage com a colibistina. Foi demonstrado também por experimentos de duplo-híbrido de levedura que o domínio SH3 de colibistina não é necessário para essa interação (Sertie *et al.*, 2010).

Experimentos de coimunoprecipitação das proteínas colibistina, gefirina e

eIF3H, tanto superexpressas em células HEK293T como expressas endogenamente em encéfalo de camundongo, permitiram confirmar a interação entre colibistina/gefirina e eIF3H. Por fim, verificou-se também que colibistina e sua parceira gefirina interagem em encéfalo de camundongo com outra proteína do complexo 3 de início da tradução, a proteína eIF3B (Sertie *et al.*, 2010).

Esses resultados inseriram, pela primeira vez, as proteínas colibistina e gefirina no cenário de início da tradução.

1.3. Controle de início de tradução em eucariotos

Em eucariotos, o início da tradução dos RNA mensageiros (RNAm) requer a participação de várias proteínas, as eIFs (em inglês, *eukaryotic initiation factors*), e compreende diversas etapas. Na fase inicial, o fator de iniciação eIF4E se liga à porção 5'-CAP do RNAm e permite a montagem de um complexo de fatores de iniciação, incluindo eIF4G, eIF4A e eIF4B. Esse complexo, por sua vez, se liga ao complexo 43S, formado pelo RNA transportador de iniciação (Met-tRNA_i), eIF3, outros eIFs, e a subunidade ribossomal 40S. Uma vez montado, esse complexo de iniciação é capaz de progredir pela região 5' não traduzida do RNAm (5'-UTR) até encontrar o códon de início da síntese protéica AUG, iniciando a síntese de polipeptídeos (Pestova *et al.*, 2001) (Box 3).

O eIF3 é o maior e um dos mais complexos eIFs, formado por 13 subunidades (designadas eIF3A a eIF3M) em células de mamíferos. eIF3 desempenha um papel fundamental no controle do início da tradução, pois atua como uma proteína *scaffold*, ou seja, interage com diferentes proteínas que atuam na regulação do início da tradução, permitindo a montagem do complexo de iniciação (Hinnebusch, 2006, Masutani *et al.*, 2007). Assim, eIF3 está envolvido na formação do complexo 43S, na ligação desse complexo à região 5'-CAP dos RNAm (uma vez que se liga a eIF4G), e na regulação da tradução em resposta a estímulos externos (como nutrientes, hormônios e mitógenos), conforme abaixo descrito em maior detalhe.

BOX 3. Início da síntese proteica em eucariotos

Ao CAP se liga o fator de iniciação eIF4E, que então permite a montagem de um complexo de fatores de iniciação (eIF4G, eIF4A, eIF4B). A este complexo, por sua vez, se liga o complexo 43S, formado por eIF2-GTP-Met-tRNA_i, eIF3, eIF1, eIF1A, eIF5, e a subunidade 40S do ribossomo. Assim montado esse complexo de iniciação é capaz de se deslocar pela região 5'-UTR até encontrar o códon de início da tradução.

Uma das vias de sinalização envolvidas na formação do complexo de início da tradução em resposta a estímulos externos é a via de sinalização mTOR (*mammalian target of rapamycin*). eIF3 interage fisicamente com duas proteínas quinases chaves dessa via: S6K1 e a própria mTOR. Na ausência de nutrientes ou outros estímulos, a síntese proteica é inibida e eIF3 está associado com S6K1, mas não com mTOR. Quando as células são estimuladas (com insulina ou aminoácidos, por exemplo), mTOR é ativada e se associa nesse complexo, promovendo então a fosforilação, ativação e liberação de S6K1 do complexo eIF3. S6K1 uma vez ativado, fosforila e ativa seus alvos, como a proteína S6 que compõe a subunidade ribossômica 40S. mTOR, por sua vez, fosforila a proteína 4E-BP1 propiciando a ativação de eIF4E, sua subsequente ligação à região 5'-CAP e a reunião do complexo de início da tradução (Harris *et al.*, 2006) (Box 4).

BOX 4. Mecanismo de indução de tradução pela quinase mTOR

A quinase mTOR é encontrada associada a dois complexos multiprotéicos na célula, mTORC1 e mTORC2. O complexo mTORC2 ainda não é muito conhecido, mas está relacionado ao controle de citoesqueleto e, além disso, participa do controle da ativação de mTORC1 (Anglikier e Rugg, 2013, Moschella *et al.*, 2013). A ativação de mTORC1 se dá pela ligação de nutrientes e fatores de crescimento, como por exemplo insulina, a receptores de membrana. A ativação desses receptores (tipo tirosina-quinase) leva a ativação da quinase PI3K, que por sua vez fosforila e ativa a quinase Akt. Akt também é fosforilada por mTORC2, e quando ocorre a dupla fosforilação de Akt (pelos complexos mTORC1 e mTORC2), ela fosforila a proteína TSC2 que então é liberada do complexo TSC1/TSC2. A inativação desse complexo leva a ativação de mTORC1. mTORC1 regula a atividade de duas proteínas que controlam a tradução: 4E-BP1 e S6K1. Quando hipofosforilada 4E-BP1 se liga fortemente a eIF4E e impede a ligação dessa proteína à região 5'-CAP, impedindo assim o início da tradução. Quando fosforilada por mTOR, 4E-BP1 se dissocia de eIF4E, permitindo a montagem do complexo de início da tradução. Ainda, mTOR fosforila e ativa a quinase S6K1, a qual irá por sua vez fosforilar a proteína S6 constituinte da subunidade 40S do ribossomo. O aumento da fosforilação de S6 governa a tradução de um grupo específico de RNAm que contém na região 5' sequências de oligopirimidinas e que codifica componentes do ribossomo e fatores elongadores da tradução (Holz *et al.*, 2005). Ainda, a via mTORC1 é regulada em diversos pontos por proteínas estimulatórias e inibitórias, como por exemplo PTEN (uma fosfatase que antagoniza a sinalização da quinase PI3K) e FMRP (uma proteína que se liga a RNAs mensageiros específicos e reprime sua tradução; alguns dos RNAs alvos de FMRP incluem os que codificam a quinase PI3K e a proteína PIKE, a qual ativa PI3K). Linhas pontilhadas: Interação física; Linhas contínuas: fosforilação.

O papel das proteínas colibistina e gefirina nesse cenário de controle de início da tradução ainda é desconhecido. Contudo, é importante ressaltar que Sabatini *et al.* (1999), utilizando a metodologia de duplo híbrido de levedura, descreveram pela primeira vez interação física entre gefirina e mTOR, e que essa interação parece ser necessária para a sinalização *downstream* a mTOR, uma vez que proteínas mTOR mutantes que são incapazes de interagir com gefirina são também incapazes de ativar seus alvos S6K1 e 4E-BP1 no modelo de expressão heteróloga em células HEK293. Mais recentemente, Wuchter *et al* (2012) confirmaram essa interação em neurônios corticais de ratos no período embrionário E17 e, utilizando um antibiótico inibidor específico de mTOR (rapamicina), demonstraram que a interação ocorre mais fortemente quando mTOR encontra-se inativo.

Assim, em vista desses achados, é possível que colibistina, além de interagir com eIF3, também interaja com mTOR e tenha um papel regulatório no início da tradução em células neurais. Contudo, isto ainda é desconhecido.

Já está bem estabelecido que a síntese de proteínas perto das sinapses é essencial para diferentes formas de plasticidade sináptica e estabelecimento de memória de longo prazo (Kelleher *et al.*, 2004). Tem sido mostrado também que a sinalização mTOR está envolvida no controle da tradução em sinapses e na plasticidade sináptica. Alterações na via de sinalização mTOR têm sido descritas na patofisiologia de diversas doenças neurológicas (Costa-Mattioli e Monteggia, 2013), o que justifica a importância de estudos que objetivam o melhor entendimento da regulação dessa via no contexto neural.

1.4. Via de sinalização mTORC1, controle da síntese proteica e transtornos neurológicos.

A via de sinalização mTORC1 é uma via fundamental para o funcionamento da célula, especialmente pelo controle da síntese proteica e sua sensibilidade a alterações na disponibilidade de nutrientes no meio extracelular. Estudos mostram que essa via de sinalização tem um papel importante no desenvolvimento e funcionamento do sistema neurológico. Em células progenitoras neurais a via de sinalização mTORC1 está envolvida com a capacidade de auto-renovação, manutenção do estado multipotente e diferenciação em neurônios (Magri e Galli, 2013). Nos neurônios, a via mTORC1

desempenha papel importante no controle da tradução de proteínas, crescimento, formação de sinapses e na dinâmica dos neuritos (Takei e Nawa, 2014).

Mutações deletérias em genes que codificam proteínas chave na regulação dessa via estão associados a doenças neurológicas associadas com deficiência intelectual e transtorno do espectro autista. O complexo TSC1/TSC2 e a proteína PTEN são responsáveis pela inibição da via mTORC1 (Box 4) e mutações de perda de função nos genes que codificam essas proteínas causam esclerose tuberosa (MIM #191100 e #613254) e síndrome de Cowden (MIM #158350), respectivamente. Modelos animais dessas doenças apresentam consequentemente ativação da via mTOR (Meikle *et al.*, 2008, Huang *et al.*, 2010). Mutações de perda de função em *FMR1*, que codifica a proteína FMRP envolvida no controle de início de tradução (Box 4), causam síndrome do X-frágil (MIM #300624). Estudos envolvendo tanto pacientes (Hoeffler *et al.*, 2012) como modelos animais (Sharma *et al.*, 2010) também mostraram maior ativação da sinalização mTOR nessa síndrome (Busquets-Garcia *et al.*, 2014).

Além disso, recentemente foram descritas mutações potencialmente patogênicas em genes que codificam proteínas relacionadas com a via mTORC1 e com o controle da tradução em pacientes portadores de autismo não-sindrômico, como a descoberta de alterações no número de cópias (CNVs) de segmentos genômicos nos genes *PIK3CB* e *PIP5K3*, e de mutações no gene que codifica a proteína eIF4E constituinte do complexo de início de tradução (Cusco *et al.*, 2009, Neves-Pereira, *et al.* 2009). É interessante mencionar também que em trabalho publicado recentemente Gkogkas *et al.*, (2013) descreveram que a superexpressão de eIF4E em camundongos leva ao fenótipo de autismo e a alteração na tradução de RNAs mensageiros específicos.

Como descrito anteriormente, o paciente brasileiro com deleção no gene da colibistina apresenta autismo e retardo mental. Uma vez que a proteína colibistina pode estar envolvida no controle do início da tradução, é possível que a falta desta proteína possa levar a alterações na regulação da via mTORC1 e na tradução em células neurais, o que pode ser um potencial mecanismo patofisiológico contribuindo para o quadro clínico desse paciente. Contudo, isto ainda é desconhecido.

1.5. Geração de células-tronco pluripotentes induzidas, células neuroprogenitoras e neurônios a partir de fibroblastos do paciente K401

Com o objetivo de explorar as funções da proteína colibistina e os mecanismos moleculares e celulares que estão envolvidos na patofisiologia das alterações cognitivas e comportamentais presentes no paciente brasileiro com deleção no gene da colibistina (paciente K401), o grupo da Dra. Andréa Sertie, em colaboração com o grupo da Profa. Dra. Maria Rita Passos-Bueno do Instituto de Biociências da USP, gerou células-tronco pluripotentes induzidas (em inglês, *induced pluripotent stem cells*, iPSCs) (Takahashi *et al.*, 2007) a partir de fibroblastos de pele deste paciente e de indivíduos controles. Após confirmação do sucesso da geração de diferentes clones de iPSCs de cada um desses indivíduos, estas células foram diferenciadas em células neuroprogenitoras (NPCs) e depois em neurônios (Box 5).

Essas células constituem um material muito interessante para explorar se a proteína colibistina interage fisicamente com mTOR em células neurais, e se a falta desta proteína pode levar a alterações no perfil de ativação da via mTORC1 e no controle da síntese proteica.

BOX 5. Mecanismo de obtenção de iPSCs (*Induced Pluripotent Stem Cells*), NPCs (Células Neuroprogenitoras) e neurônios *in vitro*.

As células iPSCs foram originalmente obtidas pela metodologia de transdução de células adultas (fibroblastos) com vetores retrovirais contendo a região codificadora dos fatores de transcrição Sox-2, c-myc, Oct-4, Klf-4 (Takahashi *et al.*, 2007). Após a transdução e cultivo em condições especiais, as células adultas são reprogramadas e passam a apresentar características de células-tronco embrionárias. Estas células quando estimuladas podem se diferenciar em tipos celulares provenientes dos três folhetos embrionários. Para a realização deste trabalho, as iPSCs tanto de indivíduos controles como do paciente K401 com deleção no gene da colibistina foram estimuladas a se diferenciar em células progenitoras neurais e depois em neurônios. Esta técnica tem sido utilizada com sucesso para a obtenção de modelos experimentais de células humanas para estudos de diversos transtornos neuronais, como por exemplo síndrome do X-frágil, síndrome de Rett e transtornos do espectro autista (do inglês *Autism Spectrum Disorders*, ASD) (Marchetto *et al.*, 2010, Farra *et al.*, 2012, Liu *et al.*, 2012, Kim *et al.*, 2014, Srikanth e Young-Pearse, 2014).

2. Objetivos

Constitui objetivo principal do presente trabalho verificar se a proteína colibistina está envolvida no controle do início da tradução mediada pela via de sinalização mTORC1.

Constituem objetivos específicos deste projeto:

- a) Verificar se colibistina interage fisicamente com mTOR;
- b) Verificar se colibistina influencia no perfil de ativação da via mTORC1;
- c) Verificar se disfunções na via mTORC1 e no controle do início da tradução estão presentes em células neuroprogenitoras derivadas de células iPSCs provenientes do paciente brasileiro com deleção no gene da colibistina.

CAPITULO 2 – Material e Métodos

2.1. Paciente K401 e indivíduos controles

O paciente K401 incluído neste estudo foi averiguado no Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP) pelo Prof. Dr. Fernando Kok. Este paciente, com 10 anos de idade na época da primeira consulta, é o único filho de pais saudáveis e não aparentados e apresenta retardo mental grave, epilepsia e comportamento autista. Amostras de DNA do paciente e seus pais foram obtidas a partir de sangue periférico após consentimento esclarecido. Teste molecular PCR do gene *FMRI* seguindo o protocolo sugerido por Haddad *et al.*, (1999) para fins diagnósticos e de exclusão da Síndrome do X-frágil foi realizado no CEGH. Análise de variações no número de cópias (CNVs) de segmentos genômicos foi realizada pela metodologia de array-CGH (Plataforma 44K, Agilent) pelo grupo da Profa. Dra. Carla Rosenberg do IB-USP.

Para obtenção de fibroblastos do paciente K401 e de dois indivíduos controles de mesmo sexo e idade aproximada, biópsias de pele com *punch* foram realizadas da região do antebraço. Linhagens de células-tronco mesenquimais provenientes de dente decíduo de três indivíduos controles (pareados por sexo e idade com o paciente) foram obtidas conforme descrito anteriormente (Kerkis *et al.*, 2006; Bueno *et al.*, 2010).

2.2. Cultura e transfecção das células HEK293T (*Human Embryonic Kidney Cells*)

Foi utilizada para expressão heteróloga da proteína colibistina a linhagem celular imortalizada HEK293T. Para o descongelamento das células armazenadas em nitrogênio líquido, os tubos foram aquecidos a 37°C em banho-maria, e as células ressuspensas em meio de crescimento DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) *High-Glucose* suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de antibióticos estreptomicina/ampicilina (Invitrogen), centrifugadas e plaqueadas em garrafas de cultura.

Para expansão e subcultivo, as células foram cultivadas em meio de crescimento e mantidas a 37°C em atmosfera umedecida com 5% de CO₂. Ao atingir estado

semiconfluentes (cerca de 80%-90% da área de crescimento), as células foram dissociadas em solução de tripsina-EDTA (0,25% de tripsina; 1 mM EDTA) e repicadas para novas garrafas de cultura na proporção de 1:5.

Para os experimentos de transfecção, as células HEK293T, após atingirem uma confluência de 60-70%, foram transfectadas com o vetor de superexpressão em células de mamíferos pcDNA3.1 (Invitrogen) contendo a região codificadora da proteína colibistina (*GenBank*: NM_015185) (pcDNA-CB) ou com o mesmo vetor vazio (pcDNA-Φ), previamente desenvolvidos pela Dra. Andréa Sertié (Sertié *et al.*, 2010). As transfecções foram realizadas com o auxílio do reagente Superfect (QIAGEN) seguindo protocolo sugerido pela empresa. Após a transfecção, as células foram mantidas em cultura por 48 horas e então foram lisadas com tampão HEPES-CHAPS para obtenção das proteínas totais (item 2.4). Pequena modificação deste protocolo foi realizada para os experimentos de análise da via mTORC1, conforme descrito mais adiante.

As células plaqueadas que não foram utilizadas nos experimentos foram congeladas novamente em meio contendo 90% de SFB e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO - LGC) e acondicionadas em criotubos. A temperatura foi então reduzida gradualmente, em uma taxa de -1°C por minuto até atingir a temperatura final de -80°C, na qual foram mantidas durante 24 horas (MrFrost, Sigma). Após este período, os tubos foram transferidos e armazenados em nitrogênio líquido.

2.2.1. Tratamento das células HEK293T para análise da via mTORC1

Após 24 horas de transfecção, as células HEK293T foram submetidas a um período de carenciamento (cultivo em meio sem SFB) durante 24 horas previamente à extração de proteínas totais, como uma forma de inibir a ativação da via mTORC1 tornando mais visível as diferenças na ativação desta via entre as amostras, e reduzir variações individuais devido à dessincronização do ciclo celular.

2.3. Cultura de células neuroprogenitoras (NPCs, *neural progenitor stem cells*) derivadas de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs, *induced pluripotent stem cells*)

As NPCs utilizadas neste trabalho foram obtidas a partir de células iPSCs. Seguindo o protocolo descrito por Takahashi *et al* (2007), o grupo de pesquisa da Dra Andréa Sertié, em colaboração com o grupo de pesquisa da Profa. Dra. Maria Rita Passos Bueno do IB-USP, já havia realizado os experimentos necessários para a reprogramação dos seguintes tipos celulares: i) fibroblastos de pele do paciente K401, ii) fibroblastos de pele de dois indivíduos controles (C1-2); iii) células-tronco de polpa de dente decíduo de três indivíduos controles (C3-5). Após obtenção com sucesso das células iPSC, foi realizado protocolo de diferenciação destas células em iNPCs e iNeurônios, segundo protocolo descrito em Marchetto *et al.* (2010). Cabe ressaltar que foram obtidos pelos menos dois clones de iPSCs do paciente K401 e de cada um dos cinco controles, e que esses clones foram utilizados para a obtenção das iNPCs e iNeurônios.

Além da análise morfológica, as iPSCs, as iNPCs e os iNeurônios foram caracterizados neste trabalho pela expressão de marcadores específicos destas células por imunofluorescência (item 2.7). Como os anticorpos contra a proteína colibistina disponíveis comercialmente não funcionam adequadamente para imunofluorescência, a expressão dessa proteína foi analisada por imunoblot (item 2.6).

Para expansão das iNPCs para os experimentos de coimunoprecipitação e análise da via mTORC1, as células, que encontravam-se armazenadas em nitrogênio líquido, foram descongeladas (pelo aquecimento dos tubos a 37°C em banho-maria), ressuspensas em meio neurobasal (DMEM-F12 suplementado com 0,5X N2; 1X B27; 20ng/mL FGF2 (Invitrogen); 20ng/mL EGF (Peprotech); 1:500 normocin), centrifugadas e plaqueadas em placas previamente preparadas com poliornitina (10µg/mL) / laminina (5µg/mL) (Invitrogen). Ao atingirem 80-90% de confluência, as células, cultivadas em meio neurobasal, foram dissociadas em solução de tripsina-EDTA (0,25% de tripsina; 1 mM EDTA) e repicadas na proporção de 1:3 para novas placas para posterior obtenção de proteínas totais. As células não utilizadas foram congeladas novamente. Para o congelamento, as células foram ressuspensas em meio de congelamento CryoStor™CS10 (SciencePro) e acondicionadas em criotubos. A

temperatura foi então reduzida gradualmente, em uma taxa de -1°C por minuto até atingir a temperatura final de -80°C , na qual foram mantidas durante 24 horas (MrFrost, Sigma). Após este período, os tubos foram transferidos e armazenados em nitrogênio líquido.

2.3.1. Tratamento das iNPCs para análise da via mTORC1

Após atingirem confluência de 60-70%, as iNPCs provenientes do paciente K401 e dos cinco indivíduos controles foram submetidas a um período de carenciamento (cultivo em meio DMEM-F12 sem suplementos) durante 24 horas previamente à extração de proteínas totais (item 2.4), como uma forma de inibir a ativação da via mTORC1 e de reduzir variações individuais devido à dessincronização do ciclo celular.

2.3.2. Tratamento das iNPCs para análise da síntese proteica (SUnSet)

Para quantificar neo-síntese proteica foi utilizada a metodologia SUnSet (*SURface SEnsing of Translation*; Schimidt *et al.* 2009). De forma sucinta, esta metodologia utiliza o antibiótico puromicina, o qual tem similaridade estrutural com a molécula de RNA-transportador ligada ao aminoácido, e que quando utilizado em baixas concentrações se incorpora a cadeia polipeptídica crescente. A detecção das proteínas recém-sintetizadas (que incorporaram a puromicina) é feita por imunoblot utilizando um anticorpo contra a puromicina.

Inicialmente, foi realizado um experimento piloto para verificar se alterações na atividade da via mTOR poderiam resultar em alterações na taxa de neo-síntese proteica que seriam detectadas pela metodologia *SUnSet*. Para isto, as iNPCs de um indivíduo controle foram cultivadas por um período de 24 horas em meio DMEN-F12 sem suplementos e então foram tratadas por 1 ou 2 horas em meios contendo 250nM rapamicina (para inibição da via mTOR) ou 150nM insulina + 20ng/mL EGF e FGF (para ativação da via mTOR) e, em seguida, incubadas por 10 minutos com puromicina 10ug/mL (Sigma). Este experimento piloto foi bem sucedido no sentido de detectar que

alterações na ativação da via mTOR estimulam alterações nos níveis de tradução de proteínas totais das células (dados não apresentados).

Em seguida, para avaliar se as iNPCs provenientes do paciente K401 apresentam alterações na taxa de síntese proteica total, seguiu-se o mesmo procedimento anterior, e as células do paciente K401 (provenientes de dois clones de iPSCs) e de dois indivíduos controles (C1 e C2), após o período de carenciamento por 24 horas, foram tratadas ou não por um período de 2 horas com 250nM rapamicina e então foram incubadas por 10 minutos com puromicina. A detecção das proteínas recém-sintetizadas (que incorporaram a puromicina) foi feita por imunoblot utilizando um anticorpo contra a puromicina (item 2.6).

2.4. Extração de proteínas totais e quantificação

Para extração de proteínas totais das células HEK293T e iNPCs, as células foram lavadas com 1x PBS e lisadas em tampão de lise HEPES-CHAPS (40mM HEPES pH 7,5; 120mM NaCl; 1mM EDTA; 0,3% CHAPS) suplementado com inibidores de proteases e fosfatases (1:100, Sigma). Os lisados foram então homogeneizados com o auxílio de uma seringa com agulha de calibre 21G, incubados durante 15 minutos no gelo e centrifugados a 14000 RPM durante 15 minutos a 4°C para coleta do sobrenadante e posterior estocagem a -80°C. A quantificação das proteínas totais dos lisados foi feita com o auxílio do kit *BCA (Bicinchoninic acid assay*, BioAgency) seguindo recomendação do fabricante.

2.5. Coimunoprecipitação

Cerca de aproximadamente 250ug de proteína totais obtidas das células HEK293T (transfectadas com os vetores pcDNA-CB ou pcDNA-Φ) ou 500ug de proteínas totais das iNPCs dos indivíduos controles foram utilizados para cada experimento de coimunoprecipitação. Inicialmente, os lisados proteicos foram incubados com *beads* de agarose (*Protein G Sepharose*TM, *GE Healthcare*), em uma proporção de 50μL para cada 1000mL de lisado, para *pre-cleaning*. Em seguida, as *beads* foram retiradas e os lisados foram incubados com os seguintes anticorpos contra a proteína mTOR: 1:50 *rabbit anti-mTOR #2972* (Cell Signaling Technologies) ou 10μg

goat anti-mTOR FRAP-N19 (Santa Cruz Biotechnology). As reações foram incubadas *overnight* a 4°C em agitação para formação dos complexos anticorpo-proteínas. Após este período, as *beads* de agarose (*Protein G Sepharose*TM) foram adicionadas aos lisados, na proporção de 50µL para cada 500mL de lisado, que foram incubados por mais 6 horas sob leve agitação a 4°C. Em seguida, os lisados foram centrifugados, os sobrenadantes descartados e as *beads* de agarose lavadas por 7 vezes em tampão de lise. A presença no imunoprecipitado de mTOR das proteínas de interesse foi verificada por *western blot* e marcação das membranas de nitrocelulose com anticorpos específicos contra estas proteínas. Cabe ressaltar que não foram utilizados anticorpos contra a proteína colibistina para imunoprecipitação pois os anticorpos comerciais disponíveis anti-colibistina não funcionam adequadamente para esta finalidade.

2.6. Imunoblot

Os lisados celulares (contendo cerca de 10-20µg de proteínas totais) e os imunoprecipitados resultantes dos experimentos de coimunoprecipitação foram misturados a solução de SDS-loading buffer (2M Tris-HCl pH 6,8; 0,6% glicerol; 0,06% SDS; 0,015% azul de bromofenol; 0,01MDTT), pré-aquecidas a 98°C durante 4 minutos para desnaturação, e separados por SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*) em condições redutoras. Em seguida, as proteínas foram transferidas eletroforéticamente para membranas de nitrocelulose de 0,45µM (GE Healthcare) a 275 mÅ durante 1 hora. As membranas foram então bloqueadas com uma solução de 5% de leite (desnatado) em 1X TBST (137 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,1% Tween-20) para impedir ligações inespecíficas do anticorpo, e subsequentemente incubadas *overnight* a 4°C com os seguintes anticorpos primários: anti-colibistina (1:5000, #261003 Synaptic Systems), anti-eIF3H (1:1000, #3413 Cell Signaling Technology), anti-prpS6^{S240/244} (1:5000, #5364 Cell Signaling Technology), anti-mTOR (1:1000, #2972 Cell Signaling Technology), anti-gefirina (1:200, sc-25311 Santa Cruz Biotechnology), anti-puromicina (1:25000, 12D10 Millipore), e anti-βactina (1:15000, A2228 Sigma), que foi utilizada como normalizador da quantidade de proteína utilizada em cada amostra. Após a incubação com os anticorpos primários, as membranas foram lavadas 3 vezes com 1x TBST e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente com anticorpos secundários específicos conjugados a enzima peroxidase HRP

(1:2000, Cell Signaling Technology). As membranas foram então novamente lavadas por 3 vezes com 1x TBST, e as proteínas foram detectadas por exposição a filmes de raios-X utilizando-se o substrato de quimioluminescência *ECL Plus Western Blotting Detection Reagent* (Amersham). Os níveis de expressão de cada proteína foram analisados por densitometria das bandas obtidas utilizando o software ImageJ (NIH) (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

2.7. Imunofluorescência

As células iPSCs, iNPCs e os iNeurônios analisados neste estudo foram cultivados em meios de cultura apropriados em *chamber* slides de 8 poços para imunofluorescência (LabTek II chamber slides, Nalgene). Após atingirem confluência adequada, as células foram lavadas com 1x PBS e fixadas com uma solução de paraformaldeído 4% durante 10 minutos à temperatura ambiente. Após este período, as células foram lavadas novamente com 1x PBS e então foram incubadas por 30 minutos em solução permeabilizante/bloqueio (5% soro de burro (Sigma); 0,1% triton em PBS). Em seguida, as células foram incubadas com os seguintes anticorpos primários diluídos na solução de bloqueio *overnight* à 4°C: anti-Lin28 (1:200, #8706), anti-Oct4 (1:50, #5177), anti-Nanog (1:50, #8750), anti-Sox2 (1:200, #5067) (Cell Signaling Technology) para caracterização das iPSCs; anti-Nestina (1:200, #MAB5326 Millipore) e anti-Musashi (1:250, ab52865 Abcam) para caracterização das iNPCs; anti- β III-tubulina (1:2000, MMS-435P Covance) e anti-MAP2 (1:500, M9942 Sigma) para caracterização dos iNeurônios. Para verificar ativação da via mTORC1 nas iNPCs, foi utilizado o anticorpo anti-prpS6^{S240/244} (1:800, #5364 Cell Signaling Technology). Após período de incubação com os anticorpos primários, as células foram lavadas com 1x PBS e incubadas, quando necessário, com anticorpos secundários específicos conjugados à moléculas fluorescentes Alexa fluor 488 dye (verde) ou Alexa fluor 594 dye (vermelho) (1:250, Invitrogen) diluídos na mesma solução de bloqueio durante 1 hora à temperatura ambiente. Após esta incubação, as células foram lavadas com 1 x PBS e as lâminas montadas adicionando 2 gotas do meio de montagem contendo DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) (Vector laboratories). As células foram então analisadas em microscópio de fluorescência equipado com filtros para visualização do

FITC (emissão de 520nm, verde), DAPI (emissão 460nm, azul) e Rodamina (emissão 595nm, vermelha).

2.8. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad InStat®. O teste aplicado foi o Teste t de Student, duas caudas, não pareado. As diferenças consideradas significativas ($p < 0,05$) estão representadas por (*).

CAPITULO 3

Collybistin binds and modulates mTORC1 signaling: a potential novel mechanism contributing to collybistin-related neuropathology

Camila OF Machado¹; Karina Griesi-Oliveira²; Carla Rosenberg²; Fernando Kok^{2,3}; Stephanie Martins¹; Maria Rita Passos-Bueno²; Andrea Laurato Sertié¹.

1- Hospital Israelita Albert Einstein, Centro de Pesquisa Experimental, São Paulo, Brasil; 2- Centro de Estudos do Genoma Humano, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Brasil; 3- Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Brasil.

E-mail: sertiea@gmail.com; andrea.sertie@einstein.br

*Running title: Collybistin binds and modulates mTORC1 signaling.

Keywords: collybistin; mammalian target of rapamycin (mTOR); translation control; induced pluripotent stem cell; neural progenitor cell; neurological disease.

ABSTRACT

Protein synthesis regulation via mTORC1 signaling pathway plays key roles in neural development and function, and its dysregulation is involved in neurodevelopmental disorders associated with autism and intellectual disability. mTOR regulates assembly of the translation initiation machinery by interacting with the eukaryotic initiation factor eIF3 complex and controlling phosphorylation of key translational regulators. Collybistin (CB), a neuron-specific Rho-GEF responsible for X-linked mental retardation with epilepsy, also interacts with eIF3 and its binding partner gephyrin associates with mTOR. However, studies addressing whether CB also binds mTOR and affects mTORC1-signaling activity are not yet available. Here, by using heterologous expression system and induced pluripotent stem cells (iPSC)-derived neural progenitor cells from control individuals and from a male patient with a deletion

of the entire CB gene, we describe that CB physically interacts with mTOR and inhibits mTORC1-signaling pathway and protein synthesis. These findings suggest that disinhibited mTORC1 signaling may also contribute to the pathological process in patients with loss-of-function mutations in CB.

INTRODUCTION

The mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway regulates several essential cellular processes including cell growth, proliferation, autophagy, and protein synthesis (1). In the central nervous system, mTORC1 signaling is crucial since the early stages of neural development, controlling self-renewal and differentiation of neural progenitor stem cells (2-4) and, in neurons, mTORC1-dependent translation is involved in synapse formation and plasticity (5). Therefore, dysfunctional mTORC1 signaling and dysregulated protein synthesis in neuronal cells have been associated with several neurodevelopmental disorders with intellectual disability and autism (6-9).

mTORC1 signaling modulates assembly of the translation initiation machinery by interacting with the eukaryotic initiation factor eIF3, a scaffold complex that brings all components of the translation initiation process into close proximity, and coordinating the phosphorylation and activity of key translational regulators S6K1 and 4EBP1(10).

We have recently identified two novel binding partners for eIF3, the neural Rho-GEF collybistin (CB) and the synaptic scaffold protein gephyrin (11), which are known to be required for GABA_A receptors clustering and inhibitory synapse formation (12-15). Importantly, it has previously been shown that gephyrin associates with inactive mTOR in cortical neurons of rat embryos, and that mTOR signaling regulates gephyrin clustering (16, 17). Together, these findings suggest that CB might also interact with mTOR and modulate mTORC1 signaling and protein synthesis. Consequently, abnormal mTORC1 activity might contribute to some of the atypical neurological phenotypes observed in patients with CB mutations, such as mental retardation, epilepsy and autism (12, 18-21). However, to our knowledge, there are no published studies addressing these questions.

In this study, we examine these hypotheses using a heterologous expression system (HEK293T cells), as well as iPSC-derived neural progenitor cells from control individuals and a patient with a CB gene deletion.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Subjects and controls

The K401 patient, a boy presenting with severe mental retardation, epilepsy and autistic behavior, is the only child of healthy non-consanguineous parents. Fragile X Syndrome was excluded molecularly and conventional karyotyping analysis showed no alterations. A BAC-based array CGH (Agilent's 44K microarray platform) was used to analyze genomic DNA from peripheral blood leukocytes after signed informed consent by the parents. Patient-derived-fibroblasts were obtained from skin by punch biopsy. Skin fibroblast from 2 age- and sex-matched control subjects and stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHEDs) from 3 additional age- and sex-matched controls were also obtained following informed consent by the parents or legal guardians.

HEK293T cells culture, transfection and Lysis

HEK293T cells were cultured and transfected with either pcDNA-CB (full length human CB) or empty pcDNA plasmids as described previously (11). To analyze mTORC1 signaling activation, 24 h after transfection cells were starved in DMEM without fetal bovine serum (FBS) during additional 24 h and were then lysed in CHAPS-containing buffer (40mM HEPES pH 7.5; 120mM NaCl; 1mM EDTA; 0.3% CHAPS; supplemented with protease and phosphatase inhibitors).

Generation of induced pluripotent stem cells (iPSCs), iNPCs, and iNeurons

Control and K401 patient fibroblasts as well as control SHED samples were reprogrammed with retrovirus vectors containing the Oct4, c-Myc, Klf4 and Sox2 human cDNAs obtained from Addgene as previously described (22). iPSC colonies were propagated under feeder-free growth conditions on matrigel-coated dishes (BD) using mTeSR1 (StemCell Technologies). We generated at least 2 iPSC clones from each individual. To obtain iNPCs and iNeurons, we performed as previously described (23). Briefly, the iPSCs were suspended to generate embryoid bodies (EBs) and plated

to produce neural rosettes. The rosettes were manually isolated and cultured onto polyornithine/laminin-coated dishes in NPC medium [DMEM/F12, 0.5X N2, 1X B27, 20ng/mL FGF2 (Invitrogen), 20ng/mL EGF (Peprotech)]. For iNeuron differentiation, NPCs were plated at low density in neural differentiation medium [DMEM/F12, 0.5X N2, 1X B27 (Invitrogen), 20ng/mL GDNF (Peprotech), 200nM ascorbic acid, and 1 μ L retinoic acid (Sigma)] onto polyornithine/laminin-coated plates. To analyze mTORC1-signaling activation in K401 patient and control iNPCs, cells were cultured until 70-80% confluence in NPC medium and were starved in DMEM-F12 containing no supplements during 24 h prior to protein extraction in CHAPS-containing buffer.

Coimmunoprecipitation and Immunoblotting

For immunoprecipitation, 293T cell lysates (250 μ g) and iNPCs lysates (500 μ g) were pre-cleared with protein G-Sepharose (GE Healthcare) and then incubated with antibodies against mTOR protein (1:50 rabbit anti-mTOR antibody #2972 by Cell Signaling Technology or 10 μ g goat anti-mTOR antibody FRAP-N19 by Santa Cruz Biotechnology) or irrelevant isotype-matched control antibodies overnight with rotation at 4°C. Subsequently, 30 μ L of protein G-Sepharose (50% v/v) was added and lysates were incubated for at least 6 h at 4°C on a rotating device. The beads were then washed seven times with lysis buffer and bound proteins were eluted with SDS sample buffer, separated by SDS-PAGE, and transferred to nitrocellulose membranes by western blotting. Expression of either overexpressed CB or endogenous proteins was also analyzed by loading approximately 10-20 μ g of cell lysates into the gel. Membranes were then blocked and incubated with primary antibodies overnight at 4°C. Detection was performed using HRP-coupled anti-rabbit or anti-mouse secondary antibodies (1:2000, Cell Signaling Technology), ECL substrate (GE Healthcare), and conventional developing using x-ray films (Kodak). The same immunoblot procedures were carried out to analyze expression of endogenous CB and gephyrin in iPSCs, iNPCs, and iNeurons, as well as to analyze mTORC1-signaling activation in 293T cells overexpressing CB and in iNPCs. The following primary antibodies were used: anti-CB (1:5000, #261003 Synaptic Systems), anti-eIF3H (1:1000, #3413 Cell Signaling Technology), anti-prpS6^{S240/244} (1:5000, #5364 Cell Signaling Technology), anti-mTOR (1:1000, #2972 Cell Signaling Technology), anti-gephyrin (1:200, sc-25311 Santa Cruz Biotechnology), and anti- β actin (1:15000, A2228 Sigma) antibodies. When necessary,

the intensity of the bands was determined by densitometry using NIH ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Immunofluorescence

For immunofluorescence staining, cells were grown in eight-well LabTek II chamber slides (Nalgene) and fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min. After permeabilization and blocking (5% donkey serum, 0.1% Triton in PBS) for 30 min at room temperature, cells were incubated with primary antibodies diluted in blocking solution overnight at 4°C. Subsequently, cells were washed three times using PBS and incubated, when necessary, with secondary antibodies (1:250, Alexa 488/594-coated anti-mouse, anti-rabbit or anti-goat, Invitrogen) for 1 h at room temperature. Nuclei were stained using DAPI (1:500, Invitrogen). Fluorescence images were taken using a Zeiss FX-100 microscopy. The following primary antibodies were used: anti-Lin28 (1:200, #8706), anti-Oct4 (1:50, #5177), anti-Nanog (1:50, #8750), anti-Sox2 (1:200, #5067) (Cell Signaling Technology), anti-Nestin (1:200, #MAB5326 Millipore), anti-Musashi (1:250, ab52865 Abcam), anti- β III-tubulin (1:2000, MMS-435P Covance), anti-MAP2 (1:500, M9942 Sigma), and anti-prpS6^{S240/244} (1:800, #5364 Cell Signaling Technology).

SUnSet (SURface SENSing of Translation)

Analysis of de novo translation was carried out using SUNSET technique (24). To examine mTORC1-dependent alterations in protein synthesis, iNPCs were starved in DMEM-F12 containing no supplements during 24 h, incubated with rapamycin (250nM) for 2 h and subsequently with 10 μ g/mL of puromycin (Sigma) for 10 min. Detection of puromycin incorporation was carried out by immunoblotting with anti-puromycin antibody (1:25000, 12D10 Millipore).

Statistical analysis

Data were analyzed using Student's two-tailed t-test (Graph Pad Prism Software version 5.0). Differences were considered significant when p-value < 0.05.

RESULTS

CB interacts with mTOR in a heterologous expression system and modulates mTORC1 signaling

To determine whether CB physically interacts with mTOR, HEK293T cells were transfected with a plasmid expressing full-length human CB and lysed in CHAPS-containing buffer. We then immunoprecipitated endogenous mTOR and assayed for binding of overexpressed CB by immunoblotting. As depicted in Figure 1A, we found that CB interacts with mTOR in 293T cells. As expected, we also observed that endogenous eIF3H is detected in mTOR immunoprecipitates (positive control).

Next, we examined whether CB overexpression would affect endogenous mTORC1 signaling. To this end, we analyzed by immunoblotting the phosphorylation status of ribosomal rpS6 protein at Ser240/244 sites (p-rpS6^{S240/244}), downstream targets of mTORC1, in 293T cells overexpressing either CB or control empty vector. In order to reduce individual variations due to cell cycle desynchronization and make potential differences in signaling activation even more evident, cells were serum starved for 24 h prior to protein extraction. Under this condition, we observed that p-rpS6^{S240/244} levels were significantly enhanced in cells overexpressing CB compared to control cells (Figure 1B). This result suggests that CB can modulate mTORC1 downstream signaling.

FIGURE 1. CB interacts with mTOR in 293T cells and modulates mTORC1-signaling activation.

HEK293T cells were transfected with a plasmid expressing full-length human CB (pcDNA-CB) or empty pcDNA vector (pcDNA-Φ) as control and cell lysates were prepared. (A) Extracts from cells overexpressing CB were incubated with either anti-mTOR antibody (#2972) or normal rabbit IgG as negative control and overexpressed CB was detected in the immunoprecipitated sample by immunoblotting using a CB specific antibody. The presence of eIF3H in the mTOR immunoprecipitate

was analyzed using an anti-eIF3H antibody (positive control). Overexpression of exogenous CB and endogenous eIF3H expression in transfected cells is also shown (lysate lane). Results are representative of at least three independent experiments. IP = antibody used for immunoprecipitation; Blot =antibody used for immunoblot analysis. **(B)** 293T cells overexpressing CB or empty vector were serum starved for 24 h and cell extracts were analyzed for the phosphorylation status of p-rpS6^{S240/244} by immunoblotting. Overexpression of exogenous CB in cells transfected with pcDNA-CB was confirmed by immunoblotting. The graph shows quantification of phosphorylated p-rpS6^{S240/244} relative to loading control β -actin. Error bars represent means $\pm$ S.D (n=3 independent experiments); * p<0.05. Lane 1= extracts from 293T cells transfected with pcDNA-CB, Lane 2= extracts of 293T cells transfected with pcDNA- Φ . Cells overexpressing CB show greater levels of p-rpS6^{S240/244} compared to controls.

Generation of induced pluripotent stem cells and neural progenitor cells from a patient with a deletion of the entire CB gene

We report here a 10-years-old boy presenting with severe mental retardation, epilepsy, and autistic behavior (called as K401). Using an array-CGH platform we identified in this patient a *de novo* 175kb microdeletion of Xq11.1 (chrX: 62898700-63073627, Grch37/Hg19 UCSC Genome Browser) including the entire CB gene (*ARHGEF9*). This was the only pathogenic aberration detected in the patient (data not shown).

To verify whether endogenous CB and mTOR interact and whether CB modulates mTORC1-signaling activity in neuronal cells, we sought to generate iPSC-derived neural progenitor cells (hereinafter referred to as iNPCs) and neurons (iNeurons) from K401 patient and from control individuals. Primary fibroblasts and/or dental pulp stem cells from K401 and from 5 sex and age-matched controls were reprogrammed using standard retroviral reprogramming technology (22). We obtained at least 2 clones from each K401-iPSC and control-iPSC, which were subsequently differentiated into iNPCs and iNeurons. Expression of pluripotency-, NPC- and neuron-specific markers was determined by immunocytochemistry (Figure 2A-C). Expression of CB was analyzed by western blotting (Figure 2D) (our commercially available anti-CB antibodies are not suitable for immunocytochemistry studies of the endogenous protein). Interestingly, we observed that CB expression, which is not detected in normal fibroblasts, was reactivated in control- iPSCs, iNPCs and mature iNeurons (Figure 2D). As expected, none of the patient's cell lineages expressed CB. Importantly, we did not detect any significant differences between patient and control cells with respect to the reprogramming and differentiation capacities.

FIGURE 2. Representative images of iPSCs, iNPCs and iNeurons; expression of lineage-specific markers and expression of CB in these lineages. (A) Patient iPSC colonies showing expression of pluripotent markers: a) Lin28; b) Nanog; c) Sox2 and d) Oct4. (B) Patient iNPCs showing expression of neural progenitors markers: e) Musashi and f) Nestin. (C) Patient iNeurons showing expression of dendritic markers: g) MAP2 and h) β III-tubulin. (D) Immunoblot analysis of CB expression in K401 patient and control-derived cell lysates. The expression of gephyrin was also analyzed as loading control. Cell lysates were prepared from mouse brain tissue (lane 1); control human fibroblasts (lane 2); K401 fibroblasts (lane 3); control iPSCs (lane 4); K401 iPSCs (lane 5); control iNPCs (lane 6); K401 iNPCs (lane 7); control iNeurons (lane 8); and K401 iNeurons (lane 9). CB expression was observed in control iPSCs, iNPCs and iNeurons. No expression of CB was found in control and K401-fibroblasts, as well as in K401-derived cell lineages (note that one smaller nonspecific band is observed in control and patient iPSC lysates). Gephyrin was detected in all samples.

CB associates with mTOR in iPSC-derived neural progenitor cells and modulates the activation of mTORC1 pathway

Since we observe high levels of CB expression in control iNPCs and these cells exhibit high proliferative capacity and are easier to maintain and subculture, we next examined whether CB and mTOR associate in control iNPCs. Figure 3A shows that endogenous CB coimmunoprecipitated with endogenous mTOR. The inverse coimmunoprecipitation experiment was not carried out because our commercially

available anti-CB antibodies are not suitable for immunoprecipitation. Curiously, although we were able to observe that endogenous CB immunoprecipitates with endogenous gephyrin in iNPCs, we were not able to reproduce endogenous gephyrin-mTOR interaction in these cells despite several attempts (data not shown). These results suggest that gephyrin-mTOR association can be observed in a more restricted biological context than CB-mTOR interaction.

Because both overexpressed and endogenous CB form a complex with mTOR, and ectopic CB expression alters mTORC1 signaling activity in 293T cells, we next analyzed whether mTORC1 pathway was altered in K401-derived iNPCs. To this end, control iNPCs (n=5) and K401 iNPCs, at similar passage numbers, were starved for 24 h and total cell lysates were analyzed for p-rpS6^{240/244} levels by immunoblotting. As illustrated in Figure 3B, we observed significant hyperactivation of mTORC1 downstream signaling in K401 iNPCs. Double immunofluorescent staining for p-rpS6^{S240/244} and nestin (a specific NPC marker) revealed that p-rpS6^{S240/244} expression came from a homogeneous population of nestin-positive cells (Figure 3C).

Because mTORC1 signaling positively controls protein synthesis, we used SUnSET (24) to investigate whether protein synthesis was altered in K401 iNPCs. Patient and control cells (n=2) were serum starved for 24 h, then incubated with rapamycin for 2 h and subsequently monitored for mRNA translation by immunoblotting (Figure 3D). The results suggest increased de novo cap-dependent translation in patient cells.

FIGURE 3. CB interacts with mTOR in control iNPCs and its absence increases mTORC1 signaling activation and translation initiation in K401 iNPCs. (A) Control iNPCs extracts were incubated with two anti-mTOR antibodies or with the corresponding irrelevant IgG isotype controls. CB was detected in the mTOR-immunoprecipitates by immunoblotting. Endogenous expression CB and mTOR is shown (lysate lane). IP= antibodies used for immunoprecipitation; Blot= antibodies used for immunoblot analysis. Results are representative of at least three independent experiments. (B) K401 iNPCs (derived from two independent iPSC clones) and control iNPCs (C1-C5, n=5) were serum starved for 24 h and cell extracts were analyzed for the phosphorylation status of p-rpS6^{S240/244} by immunoblotting. The graph shows quantification of phosphorylated p-rpS6^{S240/244} relative to loading control β-actin. Error bars represent means ±S.D (n=2 for K401 iNPCs and n=5 for control iNPCs); * p<0.05. We observed that K401 iNPCs show greater levels of p-rpS6^{S240/244} compared to controls. Importantly, iNPCs from two independent iPSC clones from each of the 5 controls were also analyzed for p-rpS6^{S240/244} levels with similar results (data not shown). (C) Upper panel: representative images show immunofluorescence labeling for p-rpS6^{S240/244} in control and K401 iNPCs, indicating that p-rpS6^{S240/244} immunofluorescent signal is greater in patient cells. Bottom panel: representative images show double-immunofluorescence labeling for p-rpS6^{S240/244} (red) and nestin (green) in control and K401 iNPCs, indicating that p-rpS6^{S240/244} expression came from nestin-positive cells. (D) Effect of rapamycin on translation in K401 iNPCs (derived from two independent iPSC clones) and control iNPCs (C1 and C2, n=2) measured by SUnSET. The detection of puromycin-labelled peptides was carried out by immunoblotting using anti-puromycin antibody. The graph shows quantification of puromycin signals relative to loading control β-actin. Error bars represent means ±S.D (n=2 biological replicates). The results suggest that K401 iNPCs exhibit increased translation.

DISCUSSION

The previously established CB/gephyrin-eIF3 and gephyrin-mTOR interactions led us to hypothesize that CB also associates with mTOR and is involved in mTORC1-mediated protein translation. To test these hypotheses, we used two model systems: heterologous expression in 293T cells and iPSC-derived NPCs from a patient with a CB gene deletion (K401) and from normal subjects.

Herein, we provide evidence that CB forms a complex with mTOR both in 293T cells and in control iNPCs. We also show that CB overexpression increases mTORC1 signaling in 293T cells, suggesting that CB may modulate mTORC1 activity. Interestingly, the analysis of mTORC1 pathway in K401 iNPCs revealed that CB absence also increase mTORC1 pathway function in these neuronal cells compared to control iNPCs. Although it would be expected opposite directions in mTORC1 signaling in cells overexpressing and deleted for CB, this discrepancy may be due to biological and molecular heterogeneity between 293T cells, which do not express endogenous CB, and neuronal cells. Indeed, previous studies have shown that interactions between CB and other neuronal proteins are required for proper functioning of this protein (14, 15, 25, 26). Consistent with the enhanced mTORC1 signaling in K401 iNPCs, our results suggest exaggerated translation in these cells.

On the basis of our results, we suggest a model whereby CB forms a complex with mTOR and eIF3 and by sequestering these proteins down-regulates mTORC1 signaling and protein synthesis. The molecular details of these interactions have yet to be defined. Since CB is known to promote plasma membrane attachment of gephyrin complexes by binding membrane lipids (12, 13, 15), it would be interesting to analyze whether CB-mTOR complexes are also found in the plasma membrane of neuronal cells. In addition, although we did not observe gephyrin-mTOR interaction in our iNPCs model, it is possible that CB-gephyrin-mTOR form complexes within different cellular contexts and that these complexes are involved in mTORC1-mediated protein synthesis regulation.

Disinhibited mTORC1 signaling and upregulated translation have been linked to the pathophysiology of neurodevelopmental disorders such as Fragile X syndrome (9, 27) tuberous sclerosis (26), Pten-dependent autism (28) and, more recently, non-syndromic ASD (29). Loss-of-function mutations in CB, which are shown to reduce GABAergic transmission and alter synaptic plasticity, have been associated with

overlapping phenotypes, ie. mental retardation, epilepsy, anxiety and autism (12, 18-21), which is confirmed by the patient here described. Therefore, although further experimentations are needed, the data presented here suggest that mTORC1 pathway alterations in neuronal cells might be associated at least in part for the behavioral and cognitive abnormalities observed in these patients.

Elucidation of the signaling network regulating protein synthesis in neuronal cells is essential for understanding the pathological process of several neurological disorders and to develop targeted therapies, and further studies on the involvement of CB in translation control will likely prove highly fruitful.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to all of the subjects who participated in this work. We thank Marta Diniz and Andressa Morales for technical assistance. We thank Aline Moraes and Constância G. Urbani for secretarial assistance. This work was supported by grants from CNPq (National Counsel of Technological and Scientific Development), FAPESP (São Paulo Research Foundation), CAPES (Higher Education Co-Ordination Agency) and Autismo & Realidade.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict interest.

REFERENCES

1. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. *Journal of cell science*. 2009;122(Pt 20):3589-94.
2. Han J, Wang B, Xiao Z, Gao Y, Zhao Y, Zhang J, *et al*. Mammalian target of rapamycin (mTOR) is involved in the neuronal differentiation of neural progenitors induced by insulin. *Mol Cell Neurosci*. 2008;39(1):118-24.
3. Han J, Xiao Z, Chen L, Chen B, Li X, Han S, *et al*. Maintenance of the self-renewal properties of neural progenitor cells cultured in three-dimensional collagen scaffolds by the REDD1-mTOR signaling pathway. *Biomaterials*. 2013;34(8):1921-8.
4. Magri L, Cambiaghi M, Cominelli M, Alfaro-Cervello C, Cursi M, Pala M, *et al*. Sustained activation of mTOR pathway in embryonic neural stem cells leads to development of tuberous sclerosis complex-associated lesions. *Cell Stem Cell*. 2011;9(5):447-62.
5. Jaworski J, Sheng M. The growing role of mTOR in neuronal development and plasticity. *Molecular neurobiology*. 2006;34(3):205-19.
6. Costa-Mattioli M, Monteggia LM. mTOR complexes in neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci*. 2013;16(11):1537-43.
7. Kelleher RJ, 3rd, Bear MF. The autistic neuron: troubled translation? *Cell*. 2008;135(3):401-6.
8. Auerbach BD, Osterweil EK, Bear MF. Mutations causing syndromic autism define an axis of synaptic pathophysiology. *Nature*. 2011;480(7375):63-8.
9. Hoeffler CA, Sanchez E, Hagerman RJ, Mu Y, Nguyen DV, Wong H, *et al*. Altered mTOR signaling and enhanced CYFIP2 expression levels in subjects with fragile X syndrome. *Genes, brain, and behavior*. 2012;11(3):332-41.
10. Holz MK, Ballif BA, Gygi SP, Blenis J. mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell*. 2005;123(4):569-80.
11. Sertie AL, de Alencastro G, De Paula VJ, Passos-Bueno MR. Collybistin and gephyrin are novel components of the eukaryotic translation initiation factor 3 complex. *BMC Res Notes*. 2010;3:242.
12. Harvey K, Duguid IC, Alldred MJ, Beatty SE, Ward H, Keep NH, *et al*. The GDP-GTP exchange factor collybistin: an essential determinant of neuronal gephyrin clustering. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2004;24(25):5816-26.
13. Kins S, Betz H, Kirsch J. Collybistin, a newly identified brain-specific GEF, induces submembrane clustering of gephyrin. *Nat Neurosci*. 2000;3(1):22-9.
14. Saiepour L, Fuchs C, Patrizi A, Sassoe-Pognetto M, Harvey RJ, Harvey K. Complex role of collybistin and gephyrin in GABAA receptor clustering. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(38):29623-31.

15. Tyagarajan SK, Ghosh H, Harvey K, Fritschy JM. Collybistin splice variants differentially interact with gephyrin and Cdc42 to regulate gephyrin clustering at GABAergic synapses. *Journal of cell science*.2011;124(Pt 16):2786-96.
16. Sabatini DM, Barrow RK, Blackshaw S, Burnett PE, Lai MM, Field ME, *et al*. Interaction of RAFT1 with gephyrin required for rapamycin-sensitive signaling. *Science*. 1999;284(5417):1161-4.
17. Wuchter J, Beuter S, Treindl F, Herrmann T, Zeck G, Templin MF, *et al*. A comprehensive small interfering RNA screen identifies signaling pathways required for gephyrin clustering. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2012;32(42):14821-34.
18. Marco EJ, Abidi FE, Bristow J, Dean WB, Cotter P, Jeremy RJ, *et al*. ARHGEF9 disruption in a female patient is associated with X linked mental retardation and sensory hyperarousal. *J Med Genet*. 2008;45(2):100-5.
19. Kalscheuer VM, Musante L, Fang C, Hoffmann K, Fuchs C, Carta E, *et al*. A balanced chromosomal translocation disrupting ARHGEF9 is associated with epilepsy, anxiety, aggression, and mental retardation. *Hum Mutat*. 2009;30(1):61-8.
20. Shimojima K, Sugawara M, Shichiji M, Mukaida S, Takayama R, Imai K, *et al*. Loss-of-function mutation of collybistin is responsible for X-linked mental retardation associated with epilepsy. *J Hum Genet*.2011;56(8):561-5.
21. Lesca G, Till M, Labalme A, Vallee D, Hugonenq C, Philip N, *et al*. De novo Xq11.11 microdeletion including ARHGEF9 in a boy with mental retardation, epilepsy, macrosomia, and dysmorphic features. *Am J Med Genet A*.2011;155A(7):1706-11.
22. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, *et al*. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861-72.
23. Marchetto MC, Carromeu C, Acab A, Yu D, Yeo GW, Mu Y, *et al*. A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell*. 2010;143(4):527-39.
24. Schmidt EK, Clavarino G, Ceppi M, Pierre P. SUNSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis. *Nature methods*. 2009;6(4):275-7.
25. Sharma A, Hoeffler CA, Takayasu Y, Miyawaki T, McBride SM, Klann E, *et al*. Dysregulation of mTOR signaling in fragile X syndrome. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2010;30(2):694-702.
26. Meikle L, Talos DM, Onda H, Pollizzi K, Rotenberg A, Sahin M, *et al*. A mouse model of tuberous sclerosis: neuronal loss of Tsc1 causes dysplastic and ectopic neurons, reduced myelination, seizure activity, and limited survival. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2007;27(21):5546-58.
27. Gkogkas CG, Sonenberg N. Translational control and autism-like behaviors. *Cellular logistics*. 2013;3(1):e24551.
28. Zhou J, Blundell J, Ogawa S, Kwon CH, Zhang W, Sinton C, *et al*. Pharmacological inhibition of mTORC1 suppresses anatomical, cellular, and behavioral abnormalities in neural-

specific Pten knock-out mice. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 2009;29(6):1773-83.

29. Santini E, Huynh TN, MacAskill AF, Carter AG, Pierre P, Ruggero D, *et al.* Exaggerated translation causes synaptic and behavioural aberrations associated with autism. Nature. 2013;493(7432):411-5.

CAPITULO 4 – Discussão Geral e Conclusões

Neste trabalho utilizamos dois modelos experimentais para investigar se a proteína colibistina (CB) está envolvida no controle de início da síntese proteica mediada pela via de sinalização intracelular mTORC1.

Inicialmente, utilizando células HEK293T em um modelo heterólogo de expressão e experimentos de coimunoprecipitação, verificamos que CB interage fisicamente com a quinase mTOR. Ainda, verificamos que quando superexpressa nas células HEK293T, CB promove ativação da via mTORC1. Estes achados foram muito importantes e nos incentivaram investigar se CB apresenta a mesma função em células neurais, que expressam endogenamente esta proteína. Como revisado anteriormente, a interação entre CB e outras proteínas presentes em células neurais é essencial para sua ativação e funcionamento correto; assim, os resultados observados nas células HEK293T poderiam não refletir o que de fato ocorre em células neurais.

Assim sendo, em uma segunda etapa do trabalho, utilizamos como modelo experimental células neuroprogenitoras derivadas de células-tronco pluripotentes induzidas, aqui denominadas iNPCs, provenientes de um paciente com deleção em todo o gene da colibistina (paciente K401) e 5 indivíduos controles (pareados por sexo e idade com o paciente). É interessante comentar que no processo de obtenção das células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) a partir de fibroblastos de pele e/ou de células-tronco de polpa de dente decíduo dos sujeitos deste estudo, assim como no processo subsequente de diferenciação destas células em iNPCs e iNeurônios, observamos a ativação da expressão de CB nas células provenientes dos indivíduos controles. Como esperado, expressão de CB não foi observada em nenhuma das linhagens celulares provenientes do paciente K401. Ainda, a ausência de CB parece não interferir no processo de geração das iPSCs e na diferenciação destas células em iNPCs e iNeurônios.

Por meio de experimentos de coimunoprecipitação utilizando extratos de proteínas totais de iNPCs provenientes de indivíduos controles, comprovamos a interação física entre CB e mTOR. Estes resultados sugerem que esta interação de fato ocorre em um ambiente neural de expressão endógena de ambas as proteínas. Nos modelos aqui utilizados, apesar de tentarmos repetidas vezes, não conseguimos reproduzir a interação entre mTOR e gefirina previamente descrita. É possível que essa

interação ocorra em um determinado estágio no desenvolvimento ou que seja mais fraca e de mais difícil detecção.

Posteriormente, utilizamos as iNPCs provenientes de dois clones de iPSCs do paciente K401 e de cada um dos 5 controles para análise da ativação da via mTORC1. Verificamos que esta via de sinalização está mais ativa nas iNPCs provenientes do paciente em comparação com as mesmas células dos controles. Estes resultados sugerem que, ao contrário do anteriormente observado nas células HEK293T, a proteína CB parece inibir a atividade da via mTORC1 em células neurais.

Em concordância com a maior atividade da via mTORC1 nas iNPCs provenientes do paciente K401, observamos maior taxa de neo-síntese protéica mediada pela via mTORC1 nestas células em relação as iNPCs provenientes de 2 indivíduos controles. Estes resultados sugerem que a hiperativação da via mTORC1 e o aumento da taxa de início de tradução possa ser um dos mecanismos moleculares relacionados ao quadro clínico do paciente K401, uma vez que ele apresenta autismo e retardo mental, ambos os transtornos neurológicos presentes em síndromes que já foram associadas a alterações na via mTORC1 (Meikle *et al.*, 2008, Huang *et al.*, 2010, Hoeffler *et al.*, 2012, Gokgas *et al.* 2013).

Juntos, nossos resultados confirmam e expandem os achados iniciais de nosso grupo sobre o envolvimento da proteína CB no controle de início da síntese de proteínas. Baseados nos resultados do presente trabalho e nos resultados de interação física entre CB e proteínas do complexo eIF3 (Sertie *et al.*, 2010), sugerimos o seguinte modelo funcional: CB, eIF3 e mTOR interagem em um complexo ternário e CB, por interagir com fosfolipídeos da membrana plasmática, sequestra eIF3 e mTOR inibindo a ativação da via mTORC1 e, consequentemente, inibindo início de síntese proteica. Salientamos que experimentos adicionais devem ser realizados para a confirmação deste modelo; é possível que outras proteínas estejam envolvidas neste processo e que CB contribua para o transporte e ligação de mTOR com essas outras proteínas em um ambiente neural.

Em resumo, nossos resultados nos permitiram concluir que:

1. CB interage fisicamente com mTOR;
2. CB é expressa em iPSCs, iNPCs e iNeurônios. A ausência de CB parece não comprometer a geração das iPSCs e a diferenciação delas em iNPCs e iNeurônios;
3. Deleção de CB leva a maior ativação da via mTORC1, observada nas células iNPCs provenientes do paciente K401;
4. Deleção de CB leva a maior taxa de neo-síntese de proteínas mediada pela via mTORC1, observada nas células iNPCs provenientes do paciente K401.

RESUMO

A proteína colibistina (CB), uma Rho GEF neuro-específica, apresenta papel importante na formação e funcionamento das sinapses inibitórias do sistema nervoso central por interagir com a proteína *scaffold* gefirina e com receptores GABA_A e promover o agrupamento e transporte dessas proteínas para a membrana pós-sináptica. Recentemente, nosso grupo de pesquisa identificou interação de CB com um complexo proteico que controla o início da tradução em eucariotos (complexo eIF3), o que sugeriu pela primeira vez que essa proteína pode estar envolvida também na regulação da tradução em células neurais. Ainda, já havia sido descrito que gefirina, parceira funcional de CB, interage com mTOR, uma quinase que desempenha papel fundamental no controle do início da tradução. Contudo, até o momento não havia estudos adicionais investigando o papel de CB neste cenário. Assim sendo, o presente trabalho teve como objetivo investigar o envolvimento da proteína CB no controle do início da síntese proteica mediada pela via de sinalização mTORC1. Foram utilizados dois modelos experimentais: i) um sistema de expressão heteróloga - superexpressão de CB em células HEK293T, e ii) um modelo endógeno de expressão - células neuroprogenitoras derivadas de células-tronco pluripotentes induzidas (iNPCs) provenientes de indivíduos controles e de um paciente com deleção no gene da CB. Por meio de experimentos de coimunoprecipitação nós verificamos que CB interage fisicamente com mTOR nos dois modelos experimentais utilizados. Ainda, nossos resultados mostraram que CB parece modular a atividade da via mTORC1, e nas iNPCs derivadas do paciente a ausência de CB leva a um aumento na ativação desta via de sinalização. Em concordância com esses resultados, nós observamos aumento em neo-síntese proteica nas iNPCs provenientes do paciente, o que pode ser um mecanismo patofisiológico contribuindo para as alterações cognitivas e comportamentais observadas no paciente. Embora estudos adicionais sejam necessários para melhor entender os mecanismos moleculares deste controle de início de tradução mediado por CB, nós sugerimos um modelo no qual CB, por interagir fisicamente com mTOR e eIF3, sequestra estas proteínas e impede que mTOR ative seus alvos e desencadeie a formação do complexo de início de tradução. Em conclusão, nossos resultados oferecem novas evidências do envolvimento de CB no controle da síntese proteica.

ABSTRACT

Collybistin (CB), a neural specific RhoGEF, plays key roles in inhibitory synapse formation and function that cluster and localize the scaffold protein gephyrin and GABA_A receptors to the neural postsynaptic membrane. We have recently reported that CB interacts with a protein complex that controls translation initiation in eukaryotic cells (eIF3 complex), which suggested for the first time that this protein may also act as regulator of protein synthesis in neural cells. Moreover, it has been previously described that gephyrin, the CB functional partner, interacts with mTOR, a kinase that plays a pivotal role in the control of translation initiation. However, until now there were no further studies investigating the role of CB in this scenario. The purpose of this study was to investigate if CB is involved in the control of translational initiation mediated by the mTORC1 signaling pathway. Two experimental models were used: i) a heterologous expression system – overexpression of CB in HEK293T cells, and ii) an endogenous expression model - neural progenitor cells derived from induced pluripotent stem cells (iNPCs) from control individuals and a patient with a deletion of the entire CB gene. We performed coimmunoprecipitation experiments and verified that CB physically interacts with mTOR both in 293T cells and in control iNPCs. In addition, our results show that CB appears to modulate the activity of mTORC1 pathway, and the absence of CB leads to increased mTORC1 signaling activation in patient' iNPCs. In agreement with these results, we observed increased de novo cap-dependent translation in patient cells, which could be a pathophysiological mechanism contributing to cognitive and behavioral abnormalities observed in the patient. Although further studies are needed to better understand the molecular details of CB-mediated translational control, we suggest a model whereby CB, by physically interacting with mTOR and eIF3, sequesters these proteins, thereby preventing both the ability of mTOR to activate its targets and the formation of the translational initiation complex. In conclusion, our results offer new insights into the role of CB in protein synthesis control.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen NJ, Barres BA (2009) Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature* 457:675-677.
- Angliker N, Ruegg MA (2013) In vivo evidence for mTORC2-mediated actin cytoskeleton rearrangement in neurons. *Bioarchitecture* 3:113-118.
- Ba W, van der Raadt J, Nadif Kasri N (2013) Rho GTPase signaling at the synapse: implications for intellectual disability. *Experimental cell research* 319:2368-2374.
- Boguski MS, McCormick F (1993) Proteins regulating Ras e its relatives. *Nature* 366:643-654.
- Busquets-Garcia A, Maldonado R, Ozaita A (2014) New insights into the molecular pathophysiology of fragile X syndrome e therapeutic perspectives from the animal model. *The international journal of biochemistry & cell biology* 53C:121-126.
- Chiou TT, Bonhomme B, Jin H, Miralles CP, Xiao H, Fu Z, Harvey RJ, Harvey K, Vicini S, De Blas AL (2011) Differential regulation of the postsynaptic clustering of gamma-aminobutyric acid type A (GABAA) receptors by collybistin isoforms. *The Journal of biological chemistry* 286:22456-22468.
- Costa-Mattioli M, Monteggia LM (2013) mTOR complexes in neurodevelopmental e neuropsychiatric disorders. *Nature neuroscience* 16:1537-1543.
- Cusco I, Medrano A, Gener B, Vilardell M, Gallastegui F, Villa O, González E, Rodríguez-Santiago B, Vilella E, Del Campo M, Pérez-Jurado LA (2009) Autism-specific copy number variants further implicate the phosphatidylinositol signaling pathway and the glutamatergic synapse in the etiology of the disorder. *Hum Mol Genet* 18, 1795-804
- Dutertre S, Becker CM, Betz H (2012) Inhibitory glycine receptors: an update. *The Journal of biological chemistry* 287:40216-40223.
- Farra N, Zhang WB, Pasceri P, Eubanks JH, Salter MW, Ellis J (2012) Rett syndrome induced pluripotent stem cell-derived neurons reveal novel neurophysiological alterations. *Molecular psychiatry* 17:1261-1271.
- Feng G, Tintrup H, Kirsch J, Nichol MC, Kuhse J, Betz H, Sanes JR (1998) Dual requirement for gephyrin in glycine receptor clustering e molybdoenzyme activity. *Science* 282:1321-1324.
- Gkogkas CG, Khoutorsky A, Ran I, Rampakakis E, Nevarko T, Weatherill DB, Vasuta C, Yee S, Truitt M, Dallaire P, Major F, Lasko P, Ruggero D, Nader K, Lacaille JC, Sonenberg N (2013) Autism-related deficits via dysregulated eIF4E-dependent translational control. *Nature* 493:371-377.

- Haddad LA, Aguiar MJ, Costa SS, Mingroni-Netto RC, Vianna-Morgante AM, Pena SD (1999) Fully mutated and gray-zone FRAXA alleles in Brazilian mentally retarded boys. *Am J Med Genet.* May 28;84(3):198-201.
- Harris TE, Chi A, Shabanowitz J, Hunt DF, Rhoads RE, Lawrence JC, Jr. (2006) mTOR-dependent stimulation of the association of eIF4G e eIF3 by insulin. *The EMBO journal* 25:1659-1668.
- Harvey K, Duguid IC, Alldred MJ, Beatty SE, Ward H, Keep NH, Lingenfelter SE, Pearce BR, Lundgren J, Owen MJ, Smart TG, Luscher B, Rees MI, Harvey RJ (2004) The GDP-GTP exchange factor collybistin: an essential determinant of neuronal gephyrin clustering. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24:5816-5826.
- Hinnebusch AG (2006) eIF3: a versatile scaffold for translation initiation complexes. *Trends in biochemical sciences* 31:553-562.
- Hoeffler CA, Sanchez E, Hagerman RJ, Mu Y, Nguyen DV, Wong H, Whelan AM, Zukin RS, Klann E, Tassone F (2012) Altered mTOR signaling e enhanced CYFIP2 expression levels in subjects with fragile X syndrome. *Genes, brain, e behavior* 11:332-341.
- Holz MK, Ballif BA, Gygi SP, Blenis J. mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell.* 2005;123(4):569-80
- Hoon M, Soykan T, Falkenburger B, Hammer M, Patrizi A, Schmidt KF, Sassoe-Pognetto M, Lowel S, Moser T, Taschenberger H, Brose N, Varoqueaux F (2009) Neuroligin-4 is localized to glycinergic postsynapses e regulates inhibition in the retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:3053-3058.
- Huang X, Zhang H, Yang J, Wu J, McMahon J, Lin Y, Cao Z, Gruenthal M, Huang Y (2010) Pharmacological inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway suppresses acquired epilepsy. *Neurobiology of disease* 40:193-199.
- Jacob TC, Bogdanov YD, Magnus C, Saliba RS, Kittler JT, Haydon PG, Moss SJ (2005) Gephyrin regulates the cell surface dynamics of synaptic GABAA receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:10469-10478.
- Jasinska M, Siucinska E, Jasek E, Litwin JA, Pyza E, Kossut M (2013) Fear learning increases the number of polyribosomes associated with excitatory e inhibitory synapses in the barrel cortex. *PloS one* 8:e54301.
- Jedlicka P, Papadopoulos T, Deller T, Betz H, Schwarzacher SW (2009) Increased network excitability e impaired induction of long-term potentiation in the dentate gyrus of collybistin-deficient mice in vivo. *Molecular e cellular neurosciences* 41:94-100.
- Kalscheuer VM, Musante L, Fang C, Hoffmann K, Fuchs C, Carta E, Deas E, Venkateswarlu K, Menzel C, Ullmann R, Tommerup N, Dalpra L, Tzschach A,

- Selicorni A, Luscher B, Ropers HH, Harvey K, Harvey RJ (2009) A balanced chromosomal translocation disrupting ARHGEF9 is associated with epilepsy, anxiety, aggression, e mental retardation. *Hum Mutat* 30:61-68.
- Kelleher RJ, 3rd, Govindarajan A, Tonegawa S (2004) Translational regulatory mechanisms in persistent forms of synaptic plasticity. *Neuron* 44:59-73.
- Kennedy MB (2013) *Synaptic Signaling in Learning e Memory*. Cold Spring Harbor perspectives in biology.
- Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, Stukart-Parsons GC, Gomes Massironi SM, Pereira LV, Caplan AI, Cerruti HF Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. (2006) *Cells Tissues Organs*. 184(3-4):105-16.
- Kim DS, Ross PJ, Zaslavsky K, Ellis J (2014) Optimizing neuronal differentiation from induced pluripotent stem cells to model ASD. *Frontiers in cellular neuroscience* 8:109.
- Kins S, Betz H, Kirsch J (2000) Collybistin, a newly identified brain-specific GEF, induces submembrane clustering of gephyrin. *Nature neuroscience* 3:22-29.
- Kneussel M, Brestatter JH, Laube B, Stahl S, Muller U, Betz H (1999) Loss of postsynaptic GABA(A) receptor clustering in gephyrin-deficient mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19:9289-9297.
- Kneussel M, Engelkamp D, Betz H (2001) Distribution of transcripts for the brain-specific GDP/GTP exchange factor collybistin in the developing mouse brain. *The European journal of neuroscience* 13:487-492.
- Koch C, Segev I (2000) The role of single neurons in information processing. *Nature neuroscience* 3 Suppl:1171-1177.
- Kuhse J, Kalbounieh H, Schlicksupp A, Mukusch S, Nawrotzki R, Kirsch J (2012) Phosphorylation of gephyrin in hippocampal neurons by cyclin-dependent kinase CDK5 at Ser-270 is dependent on collybistin. *The Journal of biological chemistry* 287:30952-30966.
- Lesca G, Till M, Labalme A, Vallee D, Hugonenq C, Philip N, Edery P, Sanlaville D (2011) De novo Xq11.11 microdeletion including ARHGEF9 in a boy with mental retardation, epilepsy, macrosomia, e dysmorphic features. *Am J Med Genet A* 155A:1706-1711.
- Liu J, Koscielska KA, Cao Z, Hulsizer S, Grace N, Mitchell G, Nacey C, Githinji J, McGee J, Garcia-Arocena D, Hagerman RJ, Nolta J, Pessah IN, Hagerman PJ (2012) Signaling defects in iPSC-derived fragile X premutation neurons. *Human molecular genetics* 21:3795-3805.
- Luo L (2000) Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nature reviews Neuroscience* 1:173-180.
- Luo L, Jan LY, Jan YN (1997) Rho family GTP-binding proteins in growth cone signalling. *Current opinion in neurobiology* 7:81-86.

- Lynch JW (2004) Molecular structure e function of the glycine receptor chloride channel. *Physiological reviews* 84:1051-1095.
- Magri L, Galli R (2013) mTOR signaling in neural stem cells: from basic biology to disease. *Cellular e molecular life sciences : CMLS* 70:2887-2898.
- Marchetto MC, Carrromeu C, Acab A, Yu D, Yeo GW, Mu Y, *et al.* A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell*. 2010;143(4):527-39.
- Marco EJ, Abidi FE, Bristow J, Dean WB, Cotter P, Jeremy RJ, Schwartz CE, Sherr EH (2009) ARHGEF9 disruption in a female patient is associated with X linked mental retardation e sensory hyperarousal. *BMJ Case Rep* 2009.
- Masutani M, Sonenberg N, Yokoyama S, Imataka H (2007) Reconstitution reveals the functional core of mammalian eIF3. *The EMBO journal* 26:3373-3383.
- Mayer S, Kumar R, Jaiswal M, Soykan T, Ahmadian MR, Brose N, Betz H, Rhee JS, Papadopoulos T (2013) Collybistin activation by GTP-TC10 enhances postsynaptic gephyrin clustering e hippocampal GABAergic neurotransmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110:20795-20800.
- Meikle L, Pollizzi K, Egnor A, Kramvis I, Lane H, Sahin M, Kwiatkowski DJ (2008) Response of a neuronal model of tuberous sclerosis to mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors: effects on mTORC1 e Akt signaling lead to improved survival e function. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28:5422-5432.
- Moschella PC, McKillop J, Pleasant DL, Harston RK, Balasubramanian S, Kuppuswamy D (2013) mTOR complex 2 mediates Akt phosphorylation that requires PKCepsilon in adult cardiac muscle cells. *Cellular signalling* 25:1904-1912.
- Moss SJ, Smart TG (2001) Constructing inhibitory synapses. *Nature reviews Neuroscience* 2:240-250.
- Papadopoulos T, Eulenburg V, Reddy-Alla S, Mansuy IM, Li Y, Betz H (2008) Collybistin is required for both the formation e maintenance of GABAergic postsynapses in the hippocampus. *Molecular e cellular neurosciences* 39:161-169.
- Papadopoulos T, Korte M, Eulenburg V, Kubota H, Retiounskaia M, Harvey RJ, Harvey K, O'Sullivan GA, Laube B, Hulsman S, Geiger JR, Betz H (2007) Impaired GABAergic transmission e altered hippocampal synaptic plasticity in collybistin-deficient mice. *The EMBO journal* 26:3888-3899.
- Pereda AE (2014) Electrical synapses e their functional interactions with chemical synapses. *Nature reviews Neuroscience* 15:250-263.
- Pestova TV, Kolupaeva VG, Lomakin IB, Pilipenko EV, Shatsky IN, Agol VI, Hellen CU (2001) Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98:7029-7036.

- Poulopoulos A, Aramuni G, Meyer G, Soykan T, Hoon M, Papadopoulos T, Zhang M, Paarmann I, Fuchs C, Harvey K, Jedlicka P, Schwarzacher SW, Betz H, Harvey RJ, Brose N, Zhang W, Varoqueaux F (2009) Neuroligin 2 drives postsynaptic assembly at perisomatic inhibitory synapses through gephyrin e collybistin. *Neuron* 63:628-642.
- Rees MI, Harvey K, Ward H, White JH, Evans L, Duguid IC, Hsu CC, Coleman SL, Miller J, Baer K, Waldvogel HJ, Gibbon F, Smart TG, Owen MJ, Harvey RJ, Snell RG (2003) Isoform heterogeneity of the human gephyrin gene (GPHN), binding domains to the glycine receptor, e mutation analysis in hyperekplexia. *The Journal of biological chemistry* 278:24688-24696.
- Reid T, Bathoorn A, Ahmadian MR, Collard JG (1999) Identification e characterization of hPEM-2, a guanine nucleotide exchange factor specific for Cdc42. *The Journal of biological chemistry* 274:33587-33593.
- Sabatini DM, Barrow RK, Blackshaw S, Burnett PE, Lai MM, Field ME, Bahr BA, Kirsch J, Betz H, Snyder SH (1999) Interaction of RAFT1 with gephyrin required for rapamycin-sensitive signaling. *Science* 284:1161-1164.
- Saiepour L, Fuchs C, Patrizi A, Sassoe-Pognetto M, Harvey RJ, Harvey K (2010) Complex role of collybistin e gephyrin in GABAA receptor clustering. *The Journal of biological chemistry* 285:29623-29631.
- Santini E, Huynh TN, MacAskill AF, Carter AG, Pierre P, Ruggero D, Kaphzan H, Klann E (2013) Exaggerated translation causes synaptic e behavioural aberrations associated with autism. *Nature* 493:411-415.
- Schmidt EK, Clavarino G, Ceppi M, Pierre P. (2009) SUnSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis. *Nature methods*. 6(4):275-7.
- Schuemann A, Klawiter A, Bonhoeffer T, Wierenga CJ (2013) Structural plasticity of GABAergic axons is regulated by network activity e GABAA receptor activation. *Frontiers in neural circuits* 7:113.
- Sertie AL, de Alencastro G, De Paula VJ, Passos-Bueno MR (2010) Collybistin e gephyrin are novel components of the eukaryotic translation initiation factor 3 complex. *BMC Res Notes* 3:242.
- Sharma A, Hoeffler CA, Takayasu Y, Miyawaki T, McBride SM, Klann E, Zukin RS (2010) Dysregulation of mTOR signaling in fragile X syndrome. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:694-702.
- Shimajima K, Sugawara M, Shichiji M, Mukaida S, Takayama R, Imai K, Yamamoto T (2011) Loss-of-function mutation of collybistin is responsible for X-linked mental retardation associated with epilepsy. *J Hum Genet* 56:561-565.
- Sigel E, Steinmann ME (2012) Structure, function, e modulation of GABA(A) receptors. *The Journal of biological chemistry* 287:40224-40231.

- Srikanth P, Young-Pearse TL (2014) Stem cells on the brain: modeling neurodevelopmental e neurodegenerative diseases using human induced pluripotent stem cells. *Journal of neurogenetics* 28:5-29.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131:861-872.
- Takei N, Nawa H (2014) mTOR signaling e its roles in normal e abnormal brain development. *Frontiers in molecular neuroscience* 7:28.
- Tyagarajan SK, Ghosh H, Harvey K, Fritschy JM (2012) Collybistin splice variants differentially interact with gephyrin e Cdc42 to regulate gephyrin clustering at GABAergic synapses. *Journal of cell science* 124:2786-2796.
- Wondolowski J, Dickman D (2013) Emerging links between homeostatic synaptic plasticity e neurological disease. *Frontiers in cellular neuroscience* 7:223.
- Wuchter J, Beuter S, Treindl F, Herrmann T, Zeck G, Templin MF, Volkmer H (2012) A comprehensive small interfering RNA screen identifies signaling pathways required for gephyrin clustering. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32:14821-14834.

ANEXO

Colaboração no desenvolvimento do trabalho:

Altered mTORC1 signaling in nearly 25% of nonsyndromic autism spectrum disorders

Angela May Suzuki¹; Camila de Oliveira Freitas Machado²; Karina Griesi-Oliveira¹; Estevão Vadasz³; Maria Rita Passos-Bueno¹; Andrea Laurato Sertie^{1,2}.

1- Human Genome Research Center, Institute of Biosciences, University of São Paulo, Brazil; 2- Albert Einstein Jewish Hospital, São Paulo, Brazil. 3- Psychiatric Institute, School of Medicine, University of São Paulo, Brazil.

SUMMARY

Dysfunctional mTOR signaling plays important roles in the pathophysiology of syndromic forms of autism spectrum disorders (ASD), but its role in nonsyndromic ASD is unknown. Here, we present evidence for mTORC1 signaling hyperfunction in 3 out of 13 patients with nonsyndromic ASD, using as a model system cultured stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHEDs). In particular, these patient-derived SHEDs showed i) altered phosphorylation patterns of key mTORC1 cascade components in response to extracellular nutrient availability, ii) enhanced proliferative capacity at higher cell densities, iii) reduced response to the antiproliferative effect of rapamycin. Interestingly, one of these 3 patients harbors a duplication of 15q11-13. Altogether, our results suggest that: dysregulation of mTORC1 signaling plays an important role in the pathogenesis of a subgroup of nonsyndromic ASD; increased proliferative capacity and diminished cell contact inhibition might contribute to the ASD phenotype; functional analysis of common molecular pathways is an interesting approach to study genetically heterogeneous diseases such as ASD; mTOR pathway components might be promising therapeutic targets for this subgroup of patients.

Manuscrito em revisão: *Molecular Psychiatry – manuscript MP000572R*