UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Nocaute de LEKTI, através da utilização de CRISPR/Cas9, em linhagem de queratinócito imortalizado

GABRIEL VILIOD VIEIRA

Ribeirão Preto

2018

GABRIEL VILIOD VIEIRA

Nocaute de LEKTI, através da utilização de CRISPR/Cas9, em linhagem de queratinócito imortalizado

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração:
Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Katiuchia Uzzun Sales

Ribeirão Preto

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Vieira, Gabriel Viliod

Nocaute de LEKTI, através da utilização de CRISPR/Cas9, em linhagem de queratinócito imortalizado. Ribeirão Preto, 2018.

83p. :il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Sales, Katiuchia Uzzun

1. LEKTI. 2. CRISPR. 3. HNSCC.

Aluno: **Vieira, Gabriel Viliod**

Título: **Nocaute de LEKTI, através da utilização de CRISPR/Cas9, em linhagem de queratinócito imortalizado**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular. Orientadora: Profa. Dra. Katiuchia Uzzun Sales

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a).: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

“Eu gosto do impossível porque lá a concorrência é menor”

Walt Disney

DEDICATÓRIA

*À minha família, meu maior suporte.
À minha esposa Mariane, minha maior inspiração.
À sociedade brasileira.*

AGRADECIMENTOS

A Ciência só é possível se feita em colaboração. O conhecimento e vivência de diversas pessoas envolvidas que fazem com que um projeto seja bem sucedido. Por essas e outras que eu agradeço a muitas pessoas...

*“A caridade é um exercício espiritual. Quem pratica o bem
coloca em movimento as forças da alma”
Chico Xavier*

“Viva como se fosse morrer amanhã. Aprenda como se fosse viver para sempre.” Gandhi

Agradeço de coração:

Ao meu pai e mãe, **Roberto Rocha Vieira** e **Erika Viliod Vieira**, principalmente pela vida que me deram, além de todo o amor, carinho e apoio que foram tão importantes para que eu chegasse até esse momento. O caminho ainda é longo e por isso necessito de vocês ao meu lado. Amo vocês.

Ao meu irmão, **Jonas**, o qual é uma das pessoas mais importantes na minha vida. Desde pequenos fomos muito próximos e gostaria de continuar assim pro resto de nossas vidas. Saiba que eu estarei aqui sempre pra você e por você meu irmão. Você não é meu irmão por acaso. Amo você! E sua esposa **Bárbara**, a qual é essencial para que essa união se fortaleça!

À minha esposa **Mariane**, a responsável por toda a inspiração e vontade de continuar nesse caminho científico tão árduo. A pessoa responsável por aguentar todas as montanhas-russas de sentimentos que só a pós-graduação nos propicia. Sem a sua paciência, amor, carinho, compreensão e principalmente companheirismo, eu jamais teria chegado tão longe nessa caminhada. Minha eterna esposa e companheira de vida e de alma.

À toda a minha família que direta ou indiretamente me apoiaram, seja por pensamentos positivos, seja por orações. Agradeço ainda, de forma especial, aos meus queridos avós falecidos **Maria Helena de Almeida Viliod** e **José Viliod**. Tenho certeza que a energia espiritual de vocês me influenciou para que eu chegasse até aqui. Fiquem em paz e evoluam sempre.

À minha outra família, a **família Góes Tomaz**, principalmente por terem me acolhido de maneira tão natural e amorosa. Vocês também fizeram parte disso e aguentaram muitas horas de minha ausência por causa de estudos. Vocês são incríveis!

Ao meu querido amigo **Eduardo** e sua esposa **Susana**. Parceiro, obrigado por toda a paciência em me ouvir e me apoiar por todos esses quase 16 anos de amizade. Partidinha? Sua amizade foi essencial em toda essa caminhada e por essa conquista. E só você **Susana** sabe como ajudar o Duzão nos momentos de aconselhamento quando eu mais precisei. Obrigado por tudo a vocês dois.

Meus agradecimentos especiais:

À minha orientadora, **Profa. Dra. Katiuchia Uzzun Sales**, primeiramente pela oportunidade de voltar à Ciência; pelas críticas, sugestões e *insights* científicos tão importantes para a realização deste trabalho, além de todo o apoio e me fazer enxergar que a Ciência é sim somente para aqueles que batalham e jamais desistem. Muito obrigado pela oportunidade de crescimento e formação científica, pela confiança e principalmente pelo carinho.

Aos docentes que aceitaram fazer parte da Banca Examinadora da defesa deste trabalho. Muito obrigado pela disponibilidade e atenção dispensada.

Agradeço ainda a todos os docentes que, direta ou indiretamente, contribuíram para minha formação acadêmica durante o período de Mestrado.

Aos meus amigos do Laboratório de Proteases e Biologia do Câncer:

Dra. Elaine, muito obrigado por ter lembrado de mim. Essa oportunidade foi essencial para que eu chegasse até aqui. Você sabe todo carinho e admiração que eu tenho por você. Obrigado por todo o apoio.

Ao **Bruno**, primeiramente por ser uma pessoa tão especial. Obrigado por todo o apoio científico e emocional durante esses dois anos. O seu jeito tão descontraído e engraçado faz do nosso dia a dia muito mais leve e confortável. Continue sendo essa pessoa humilde e de um coração maravilhoso. Confie na sua capacidade e não pare nunca. Só voe!

Ao **Márcio**, por toda a amizade nesse curto tempo que nos conhecemos. O seu apoio nesse período foi muito importante para chegar até aqui. Jamais deixe esse brilho oriental apagar em você meu querido. Seu coração é bom demais para esse mundo.

Ao **Rodrigo**, principalmente pela amizade construída nesse curto tempo. Obrigado por trazer um pouco mais de alegria e descontração ao laboratório. Nunca deixe que as pessoas aproveitem de você por ter esse coração de ouro meu amigo.

À **Carol Kobori**, por toda a ajuda e apoio nesse curto tempo. Você sempre disposta a nos ajudar científica e emocionalmente. Obrigado por tudo.

À **Marcia**, por toda a amizade nesses poucos anos. Obrigado por toda a ajuda nos momentos que precisei, além de nos fornecer um café tão saboroso no dia a dia, o qual nos mantém na luta.

À **Naira**, pela amizade e diversão. Obrigado por toda a discussão científica que tivemos. Elas foram essenciais para aquilo que fazemos. Saiba que você vai longe, nunca desista.

À **Marina**, agradeço por todo o apoio nesse período. Nunca desista daquilo que você quer na vida.

À **Manuela**, agradeço por todo o apoio e amizade, mesmo não estando mais no nosso Lab.

Agradeço também:

À **Nerry**, por tudo que você fez durante esse tempo. Você me ajudou muito e fez com que eu tivesse alguém como referência de trabalho árduo de bancada. Obrigado ainda pela amizade e por tudo que fizemos juntos cientificamente.

À **Leticia**, por ter me ajudado muito no início do meu aprendizado em Biologia Molecular, além de nos agradecer com toda sua alegria. Saiba que você faz parte dessa trajetória.

Agradeço também à todos que fizeram parte do meu antigo laboratório onde fiz Iniciação Científica, a **Turma dos Mastócitos**. Vocês fizeram parte de toda essa caminhada científica até aqui. Obrigado por tudo!

Agradeço também, principalmente, à **Luisa** e **Cauã** por toda a amizade e apoio. Agradeço ainda à todos aqueles que fizeram parte do **Laboratório Lison**. Só a gente sabe o quanto foi difícil manter a ordem com mais de 20 pessoas no Lab. Mas nós superamos as expectativas, pois ainda conseguíamos nos divertir.

Agradeço à **Mara**, por todo o apoio e ajuda em todos os experimentos desse trabalho. Você acompanhou muita coisa e nos ajudou muito. Agora aproveite seu momento de descanso, após tantos anos de serviço à comunidade científica. Obrigado!

Agradeço ainda à **Alina** e **Catarina**, vocês são essenciais para que toda quinta de manhã seja mais divertida. A gente ainda irá conseguir esse camundongo CRISPR. Espero que a próxima vez que eu ler esse agradecimento já tenhamos conseguido. Obrigado por tudo.

À funcionária **Beth** por toda a ajuda técnica na microscopia de fluorescência.

À secretária da pós-graduação **Gabriela Bunhotto Zamonier**, agradeço a permanente disponibilidade e serviços prestados aos alunos.

Às secretárias do Departamento de Biologia Celular e Molecular, **Lúcia Helena Picinato Raphael** e **Camila Fabris**, muito obrigado pelos ótimos serviços prestados.

À **todas as pessoas** que participaram de forma direta ou indiretamente nesse trabalho, que eventualmente não foram citadas.

Ao **Centro Universitário Barão de Mauá**, pela formação acadêmica em Ciências Biológicas.

Agradeço à **CAPES** pelo auxílio financeiro durante todo o mestrado.

Agradeço à **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo auxílio financeiro do laboratório durante este período.

À **população brasileira**, pois sem ela o ensino público não seria possível. Fazemos o que fazemos sempre pensando em dar um retorno à essa população tão batalhadora.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.” (Theodore Roosevelt)

Sumário

SUMÁRIO

RESUMO	23
ABSTRACT	25
INTRODUÇÃO	27
CARCINOMA DE CABEÇA E PESCOÇO	27
PROTEASES	29
Matriptase.....	30
LEKTI e Calicreínas 5 e 7	32
OBJETIVOS	40
Objetivo Geral.....	40
Objetivos Específicos	40
MATERIAL E MÉTODOS	42
1. Técnica de Edição Gênica CRISPR/Cas9	42
2. Desenho do Guia.....	44
3. Clonagem	44
4. Digestão Analítica.....	47
5. Curva de Morte e Seleção de Células Transfectadas	49
6. Transfecção	49
7. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	50
8. Extração de RNA seguida de Síntese de cDNA	51
9. Extração de proteínas e Western blot.....	52
10. Imunofluorescência.....	52
11. Extração de DNA genômico	53
12. Sequenciamento	53
13. Análise estatística	54

RESULTADOS	56
1. Expressão de LEKTI em: (i) amostras humanas de carcinoma de cabeça e pescoço; e (ii) linhagens de carcinoma de boca (HN6 e HN12) e de queratinócito imortalizado (HaCaT)	56
2. Desenho experimental do guia 2-LEKTI e clonagem deste guia no plasmídeo px459 para nocautear LEKTI através da metodologia CRISPR/Cas9	57
3. A linhagem de queratinócito imortalizada HaCaT: (i) foi induzida à morte, através do tratamento com o antibiótico puromicina, em 3 dias; e (ii) apresentou eficiência de transfecção muito baixa	59
4. As células HaCaT transfectadas com o plasmídeo px459 guia 2-LEKTI não são nocautes	61
5. As células transfectadas apresentam um <i>stop codon</i> prematuro e, portanto, a maquinaria de CRISPR/Cas9 intacta	64
DISCUSSÃO	67
CONCLUSÕES.....	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Via proteolítica da Matriptase.....	31
Figura 2: Modelo da ativação proteolítica de LEKTI em queratinócitos humanos.....	35
Figura 3: LEKTI, KLKs e seus papéis na descamação epitelial.....	36
Figura 4: Esquema representando a clivagem do DNA pelo Sistema CRISPR/Cas9 e os reparos NHEJ e HDR.....	43
Figura 5: Representação esquemática das principais regiões do Plasmídeo px459 e o local de inserção do guia 2-LEKTI neste plasmídeo.....	46
Figura 6: Padrão de fragmentos do plasmídeo px459 vazio e clonado com guia 2 após Digestão Analítica.....	48
Figura 7: Expressão de mRNA de LEKTI em carcinoma de cabeça e pescoço e em linhagem imortalizada de queratinócito e linhagens de carcinoma de boca.....	57
Figura 8: Desenho experimental e clonagem do guia 2-LEKTI no plasmídeo px459.....	59
Figura 9: Curva de morte e eficiência de transfecção da linhagem imortalizada de queratinócito HaCaT.....	60
Figura 10: Imunofluorescência e Wester Blot das células transfectadas.....	63
Figura 11: Maquinaria CRISPR/Cas9 intacta e heterozigose no gene SPINK5 de HaCaT selvagem.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Primers utilizados nas reações de PCR.....	49
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA: *Bovine Serum Albumin*

CAGB: *calgranulina B*

CAS: *Crispr Associated Sequences*

Cbh: *hybrid form of a CB promoter*

cDNA: *DNA complementar*

CDKN2A: *cyclin-dependent kinase inhibitors 2A*

CDKN2B: *cyclin-dependent kinase inhibitors 2B*

CDKs: *cinases dependentes de ciclinas*

c-Met: *tyrosine kinase receptor Met*

CRISPR: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*

crRNA: *CRISPR-RNA*

CUB: *complement C1r/s, urchin embryonic growth factor and bone morphogenetic protein 1*

DAPI: *4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride*

dCas9: *dead Cas9*

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

GAPDH: *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*

HAI-1: *hepatocyte growth factor activator-1*

HAI-2: *hepatocyte growth factor activator-2*

HDR: *Homology Direct Repair*

HNSCC: *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*

HPV: *Vírus do papiloma humano*

IFN: *Interferons*

INCA: *Instituto Nacional do Câncer*

KI: *knock-in*

KLKs: *Calicreínas*

KO: *knockout*

LDLA: *low-density lipoprotein receptor class A*

LEKTI: *lympho-epithelial kazal-type inhibitor*

MTAP: *S-methyl-5'-thioadenosine phosphorylase*

NFKb: fator nuclear

NHEJ: *Non-homologous End Joining*

p14^{ARF}: *ARF tumor suppresor*

p16^{ink4a}: Inibidor de CDK

PAM: *proto-adjacent motif*

PAR-2: *Protease-activated receptor 2*

pb: pares de base

PBS: *Phosphate Buffer Saline*

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

pro-HGF: forma inativa do *hepatocyte growth factor*

pró-KLKs: forma inativa das Calicreínas

pro-uPA: forma inativa do *urokinase-type plasminogen activator*

RT-PCR: *Reverse Transcriptase PCR*

SA: *signal-anchor*

SEA: *sea urchin sperm protein, enteropeptidase and agrin*

SFB: soro fetal bovino

sgRNA: *single guide RNA*

SPINK5: *Serine protease inhibitor Kazal-type 5*

TALENs: *Transcriptor Activator-like Effector Nucleases*

TGM3: *transglutaminase-3*

tracrRNA: *trans-activating crRNA*

WT: *Wild-type*

ZNF-185: *zinc finger protein 185*

RESUMO

RESUMO

VIEIRA, Gabriel Viliod. Nocaute de LEKTI, através da utilização de CRISPR/Cas9, em linhagem de queratinócito imortalizado. [dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2018.

O carcinoma de cabeça e pescoço (HNSCC) é um dos tipos de câncer que mais acomete as pessoas ao redor do mundo, sendo responsável por 300 mil mortes anualmente. Essa alta taxa de mortalidade está diretamente associada ao diagnóstico tardio, ausência de biomarcadores e tratamento inespecífico. Diversos estudos mostraram que a expressão desregulada da classe de serino proteases do tipo II está intimamente relacionada com a etiologia de diversos tipos de carcinomas, como é o caso da via proteolítica da matriptase. Ainda, a matriptase, no contexto normal da descamação epitelial, ativa as KLKs 5 e 7, as quais são inibidas por LEKTI. A proteína LEKTI, codificada pelo gene SPINK5, possui 15 domínios diferentes, os quais são secretados de forma individual para a matriz extracelular, onde participa da inibição das KLKs 5 e 7. Resultados ainda não publicados do nosso laboratório mostraram que LEKTI é capaz de inibir o fenótipo pré-maligno causado pela superexpressão da matriptase na camada basal do epitélio de camundongos, quando superexpresso nessa mesma região. Ainda, marcações imunohistoquímicas de LEKTI, em amostras de carcinomas orais de humanos, mostraram que essa proteína está também presente nos carcinomas de cabeça e pescoço. Dessa forma, a hipótese levantada neste estudo é a de que LEKTI possui papel inibitório durante a carcinogênese de cabeça e pescoço. Sendo assim, para testar nossa hipótese, a presente dissertação buscou nocautear LEKTI, por meio da tecnologia de edição gênica CRISPR/Cas9, em linhagens de queratinócito imortalizado, através da dissecação por biologia celular, da função de LEKTI nestas células. Os resultados, obtidos por meio de Western Blot, imunofluorescência e sequenciamento das células potencialmente nocauteadas, mostram as dificuldades e desafios de nocautear células hipotetraplóides, como é o caso da linhagem celular utilizada neste estudo.

Palavras-chave: 1.LEKTI; 2.CRISPR; 3. HNSCC

ABSTRACT

ABSTRACT

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is one of the most common type of cancers around the world and it's responsible for 300.000 deaths every year. This high mortality rate is directly related with late diagnosis, lack of biomarkers and specific treatment. A fair amount of studies have shown that the deregulated expression of type II serine proteases, such as the matriptase proteolytic pathway, is intimately related with the etiology of a large number of carcinomas. Still, in a normal epithelial desquamation context, matriptase is able to activate KLKs 5 and 7, which are inhibited by LEKTI. The protein LEKTI, encoded by SPINK5 gene, has 15 different domains, which are secreted individually to the extracellular matrix, where acts inhibiting KLKs 5 and 7. Non published results from our laboratory has shown that LEKTI is able to inhibit the pre-malignant phenotype caused by the super-expression of matriptase in the epithelia's basal layer of mice, when super-expressed in the same region. Moreover, immunohistochemistry staining of LEKTI in human oral carcinomas showed that this protein is also present in head and neck carcinomas. In this way, the hypothesis of this study is that LEKTI has an inhibitory role during carcinogenesis of head and neck carcinomas. Therefore, to test our hypothesis, this dissertation aimed to knockout LEKTI in an immortalized keratinocyte cell line, using CRISPR/Cas9 editing technology, through cell biology dissection of LEKTI function in those cells. The results, obtained by Western Blot, immunofluorescence and sequencing of the cells, shows the difficulties and challenges to knockout cells that are hypo-tetraploids, just like HaCaT cell line.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

CARCINOMA DE CABEÇA E PESCOÇO

O carcinoma de cabeça e pescoço de células escamosas (do inglês *head and neck squamous cell carcinoma*, HNSCC) se origina nas células pavimentosas que fazem parte do epitélio de revestimento das seguintes regiões anatômicas: cavidade oral (lábios, língua, gengivas, bochechas, assoalho da boca e palato duro), faringe (nasofaringe, orofaringe e hipofaringe), laringe, cavidade nasal e seios paranasais (National Cancer Institute, 2017). Dentre estes sítios, estudos mostram que mais de 90% dos HNSCCs acometem a cavidade oral (Feller e Lemmer, 2012; Nadarajah e Williams, 2014).

O HNSCC é uma neoplasia maligna que possui altas taxas de incidência ao redor do mundo, afetando em torno de 600 mil pessoas e contabilizando em torno de 300 mil mortes anualmente (The Cancer Genome Atlas Network, 2015; Crooker *et al.*, 2018). No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou cerca de 14.700 novos casos de câncer na cavidade oral para 2018, sendo 11.200 destes casos em homens e 3.500 casos em mulheres. A incidência de HNSCC é maior em adultos acima de 50 anos de idade, sendo mais comum em homens do que em mulheres (British, 2000). Ainda, uma revisão de 2001 mostrou que de 4 a 6% dos pacientes acometidos com o carcinoma de boca são homens com menos de 40 anos (Llewellyn *et al.*, 2001).

O HNSCC possui etiologia multifatorial. Os principais fatores etiológicos são o tabagismo, etilismo e os vírus do papiloma humano (HPVs) de alto risco, como por exemplo os HPVs 16 e 18 (Miller e White, 1996; Sugerman and Shillitoe, 1997; Neville e Day, 2002; Solomon, Young e Rischin, 2018).

Por questões que envolvem a escassez de biomarcadores específicos e uma rotina inconsistente de acompanhamento da saúde bucal, o diagnóstico de HNSCC é, costumeiramente, tardio (Forastiere, W Koch, A Trotti, 2001; Hunter, Parkinson e Harrison, 2005; Nadarajah e Williams, 2014). Além disso, a inespecificidade dos tratamentos disponíveis atualmente, como radioterapia, quimioterapia com cisplatina e cirurgia, contribui para as altas taxas de mortalidade associadas a esta doença: a sobrevida média para pacientes com HNSCC é de apenas 50% em 5 anos (Forastiere *et al.*, 2001; Molinolo *et al.*, 2009; Melo Filho *et al.*, 2013). Ainda, por envolver áreas nobres da face, o tratamento cirúrgico através da

ressecção do tumor, com margem de segurança, impacta negativamente processos essenciais à manutenção da qualidade de vida dos pacientes, como o olfato e a deglutição.

A capacidade de proliferação celular infinita é uma característica marcante do câncer (Hannahan e Weinberg, 2011). Neste sentido, a camada basal do epitélio de revestimento da mucosa oral possui os “pré-requisitos” necessários para a transformação neoplásica: células-tronco com grande capacidade e rapidez de renovação do tecido epitelial (Costea et al., 2006). Devido à intensa proliferação dessas células, diversas mutações em genes supressores de tumor e em proto-oncogenes podem acontecer, levando à transformação maligna dessas células e o desenvolvimento de HNSCC (Molinolo et al., 2009). Além disso, as células que eventualmente sofrem transformação maligna perdem sua capacidade de: (i) passar pelos pontos de checagem do ciclo celular; e (ii) sofrer apoptose mediante dano celular irreparável. Interessantemente, a proteína supressora de tumor p53 está envolvida em vias de sinalização que culminam na parada do ciclo celular e, eventualmente, na apoptose (Ali et al., 2017).

O acúmulo de múltiplas alterações (genéticas e epigenéticas) é o principal responsável pelo HNSCC. Estudos com esse tipo de carcinoma mostraram que a perda do *locus* cromossomal 9p21 é muito comum e acontece sempre nos estágios iniciais da doença (Riet, van der *et al.*, 1994; Gonzaleiz *et al.*, 1997; Molinolo et al., 2009). A perda desse *locus* leva, principalmente, à inativação do gene CDKN2A, que codifica as proteínas p16^{INK4a} e p14^{ARF}, que são supressores tumorais e inibem as cinases dependentes de ciclinas (CDKs) (Rivandi et al., 2018). Estas, por sua vez, regulam a progressão do ciclo celular (Ferru et al., 2006; Rivandi et al., 2018). Ainda, a proteína supressora de tumor p53 está envolvida em vias de sinalização que culminam na parada do ciclo celular e, eventualmente, na apoptose (Ali et al., 2017). Por outro lado, mutações com perda de função no gene TP53, que codifica a proteína p53, estão fortemente associadas a: (i) um pior prognóstico; e (ii) resistência às terapias com cisplatina, sendo que este é o tratamento de eleição para os carcinomas de cabeça e pescoço (Ohnishi et al., 2002; Poeta et al., 2007; Solomon, Young e Rischin, 2018).

Em conclusão, a ausência de marcadores de prognóstico, a falta de tratamento eficaz para a doença e a complexa etiologia do HNSCC apontam a urgente necessidade de maior robustez no conhecimento de alvos moleculares envolvidos na iniciação e progressão desta patologia. Assim, novos estudos se fazem necessários para: (i) a melhor compreensão das vias de sinalização envolvidas neste tipo de câncer; e (ii) a descoberta de novos biomarcadores e proteínas-alvo para o desenvolvimento, em um futuro próximo, de tratamentos mais específicos e eficientes.

PROTEASES

Proteases são enzimas que catalisam a quebra de ligações peptídicas, através da hidrólise, dos seus substratos (Sanman e Bogyo, 2014). As diferentes famílias de proteases são classificadas, principalmente, de acordo com o aminoácido presente no sítio catalítico destas enzimas. Neste sentido, as seguintes famílias de proteases foram identificadas: serino, treonino e cisteíno proteases, metaloproteases, proteases de ácido aspártico ou glutamato proteases (Meyer-Hoffert, 2009).

As proteases são sintetizadas na forma de zimógenos, os quais podem ser ativados por diferentes mecanismos, como modificações pós-traducionais, ligação de co-fatores, mudanças de pH, entre outros. Além disso, vale ressaltar que a ativação de zimógenos é irreversível (Szabo e Bugge, 2011). Sendo assim, o controle da ativação de proteases é uma característica muito importante para que não ocorram clivagens de proteínas nas células de forma descontrolada (Khan e James, 1998; Sanman e Bogyo, 2014).

Ainda, estas enzimas participam de diversos processos biológicos, destacando-se a diferenciação epitelial, a homeostase e a regulação da pressão sanguínea (Szabo e Bugge, 2011). Por outro lado, as proteases estão intimamente relacionadas com a degradação da matriz extracelular, ativação de fatores de crescimento e de mediadores pró-inflamatórios, que participam em processos envolvidos na transformação maligna e na progressão tumoral (Murray et al., 2016).

Uma família de proteases, as serino proteases, é composta por enzimas que possuem uma tríade catalítica formada pelos resíduos de aminoácidos serina, aspartato e histidina. Essas proteases estão envolvidas em variados processos biológicos, como na barreira epitelial, fertilização, desenvolvimento embrionário, sinalização celular e morfogênese tecidual (Puente et al., 2005). Dentro dessa família de serino-proteases há o subgrupo das serino-proteases ancoradas à membrana plasmática e estas são, ainda, subdivididas em: (i) GPI: serino-proteases que são ancoradas na membrana plasmática por meio de um domínio de glicofosfatidilinositol; (ii) Tipo I: serino-proteases que possuem um domínio transmembrana de passagem única localizado próximo à região C-terminal; (iii) Tipo II: serino-proteases que possuem uma âncora sinal transmembrana localizada próxima à região N-terminal (Szabo e Bugge, 2011).

A classe das serino proteases do Tipo II começou a ser descrita no início dos anos 2000. Em 2001 foi publicada uma das primeiras revisões a descrever as características bioquímicas básicas dessa classe (Hooper et al, 2001). Com o passar dos anos, entretanto, ficou evidente que diversos membros das serino-proteases do Tipo II, quando expressos de forma desregulada, estão associados a vários tipos câncer em seres humanos, como por exemplo em carcinomas (Uhland, 2006; Murray et al., 2016). Um exemplo é a atividade da matriptase, uma serino protease que, quando desregulada em carcinomas orais, favorece o crescimento e a progressão tumoral (Kanemaru et al., 2016).

Matriptase

A Matriptase faz parte da família de serino proteases transmembranas do Tipo II e, portanto, possui sua porção C-terminal localizada na região extracelular. Essa protease é ancorada à membrana plasmática da célula por meio de uma âncora peptídeo sinal (SA) transmembrana e possui sua região N-terminal localizada intracelularmente (Szabo e Bugge, 2011). Entre o domínio SA e a região C-terminal dessa proteína há diferentes domínios: (i) domínio SEA (*sea urchin sperm protein, enteropeptidase and agrin*); (ii) dois domínios CUB (*complement C1r/s, urchin embryonic growth factor and bone morphogenetic protein 1*); (iii) 4 domínios LDLA (*low-density lipoprotein receptor class A*); (iv) domínio catalítico de serino protease composto por histidina, ácido aspártico e serina, que, como mencionado anteriormente, é comum à família de serino proteases (Szabo e Bugge, 2011).

Como outras proteases, esta protease é sintetizada como um zimógeno, e possui dois sítios de clivagem para sua ativação: o primeiro no resíduo glicina 149 e o segundo no resíduo arginina 614. Além da proteólise sítio-específica, a qual é comum à maioria das serino proteases, e da clivagem de seu domínio SEA, a ativação da matriptase é dependente do estado de seus outros domínios (Oberst et al, 2003; Uhland, 2006). Em uma série de experimentos com mutações pontuais nos diferentes domínios da matriptase, Oberst e colaboradores (2003) demonstraram que essa protease é ativada apenas quando diversos critérios são atendidos. De maneira geral, os experimentos apontaram que são necessárias, para a ativação da matriptase, (i) glicosilações no primeiro domínio CUB e no seu domínio catalítico; e (ii) a manutenção de seus domínios receptores LDL classe A intactos (Oberst et al, 2003). Entretanto, estudos indicam que a matriptase é capaz de exercer funções específicas mesmo quando cataliticamente inativa, isto é, na forma de zimógeno (Friis et al, 2013, 2017).

A matriptase está presente em células de origem epitelial e as vias proteolíticas ativadas por esta enzima culminam no aumento da proliferação celular e da inflamação

tecidual. Esta protease exerce suas funções através da ativação de três substratos principais: o receptor *Protease-activated receptor 2* (PAR-2); a forma zimógena do ativador *urokinase-type plasminogen activator* (pro-uPA) e a forma inativa do *hepatocyte growth factor* (pro-HGF) (Lee, Dickson e Lin, 2000; Takeuchi *et al.*, 2000). Desta forma, a matriptase cliva pro-HGF e PAR-2, resultando na ativação, respectivamente, do receptor *tyrosine kinase receptor Met* (c-Met) e do fator nuclear (NFκB), que ativam vias intimamente relacionadas à progressão tumoral como, por exemplo, as vias de sobrevivência e proliferação (PI3K-Akt-mTOR) e a via de sinalização inflamatória (PAR-2-NFκB) (Figura 1) (Trusolino e Comoglio, 2002; Downward, 2003; Sales *et al.*, 2015).

Figura 1: Via proteolítica da matriptase. A matriptase ativa proHGF, PAR-2 e KLK5/7. proHGF leva à ativação de Akt, enquanto que a ativação de PAR-2 leva à ativação de NFκB. Matriptase também ativa as KLKs, envolvidas na diferenciação epitelial. Os inibidores HAI-1 e HAI-2 inibem diretamente a matriptase, enquanto LEKTI inibe as KLKs 5 e 7, auxiliando no balanço da descamação epitelial.

Em um contexto normal, a matriptase e seus substratos participam de diversos processos celulares, como migração e proliferação celular, desenvolvimento folicular e desenvolvimento embrionário (List *et al.*, 2002; Uhland, 2006; Szabo e Bugge, 2011). Por

outro lado, no contexto do câncer, essas mesmas proteínas atuam em vias de sinalização associadas à progressão tumoral (Uhland, 2006).

Diversos estudos que desenvolveram animais-modelo, com ganho ou perda de função, e que caracterizaram algumas mutações em seres humanos, foram responsáveis pelo melhor entendimento das funções das serino proteases do Tipo II, como é o caso da matriptase, em diferentes processos fisiopatológicos, que incluem os tumores malignos (List et al., 2006; Bugge et al., 2007, 2009; Szabo e Bugge, 2008; Antalis et al., 2010). Um estudo mostrou que a superexpressão da matriptase na camada basal do epitélio da pele de camundongos, sob o controle do promotor da queratina 5 (K5-Matriptase), é capaz de levar ao surgimento espontâneo de carcinomas nesses animais (List et al., 2005). Através da utilização deste mesmo modelo animal, outros autores mostraram que este fenótipo tumorigênico é dependente da expressão concomitante de PAR-2 e cMet nas mesmas células epiteliais (Szabo et al., 2011; Sales et al., 2015). Outro estudo mostrou ainda que a super-expressão de HAI-1 e matriptase na mesma camada basal do epitélio, também sob o controle do promotor da queratina 5, foi capaz de resgatar completamente o fenótipo tumorigênico dependente da matriptase.

A regulação da via da matriptase parece estar intimamente relacionada a diferentes tipos de câncer. Estudos mostram que há uma relação entre a expressão de matriptase e seu inibidor HAI-1 na progressão tumoral. A maior expressão de matriptase em relação a HAI-1 está diretamente relacionada a um pior prognóstico em câncer de ovário (Oberst et al., 2002). Ainda, outro estudo mostrou que o aumento da expressão de matriptase acompanha a diminuição da expressão de HAI-1 em linhagens celulares de câncer de próstata (Saleem et al., 2006). Além disso, a investigação molecular dessa via tem se mostrado cada vez mais de suma importância para a identificação de possíveis novos biomarcadores oncológicos, como é o caso das Calicreínas (KLKs) (Diamandis e Yousef, 2002).

Como veremos na seção seguinte, evidências apontam para a possível participação de outras proteínas da via da matriptase, como LEKTI e KLKs, intrinsecamente relacionadas a processos de renovação tecidual, em processos fisiológicos e patológicos.

LEKTI e Calicreínas 5 e 7

O gene SPINK5 (*Serine protease inhibitor Kazal-type 5*), que codifica para a proteína LEKTI, está localizada em um *cluster* de genes SPINK (SPINK 14, 6, 13, 7, 5 e 9) no

cromossomo humano 5, na região q32A (Sarri *et al.*, 2016). Essa proteína possui 1064 aminoácidos, distribuídos em 15 domínios diferentes (D1-D15), dos quais 2 são domínios tipo Kazal característicos com 6 resíduos de cisteína formando 3 pontes dissulfeto (Domínios 2 e 15) (Meyer-Hoffert, Wu e Schroder, 2009). Os demais domínios possuem apenas 4 resíduos de cisteína e, assim, formam 2 pontes dissulfeto. Estes domínios tipo Kazal são característicos de inibidores de serino proteases (Meyer-Hoffert, Wu e Schroder, 2009).

Nos seres humanos, LEKTI está expressa no epitélio estratificado em três variantes que diferem apenas em sua região C-terminal, formadas após *splicing* alternativo do mRNA: **LEKTI_{FL}**, de 145 kDa e composta por 15 domínios; **LEKTI_L**, de 148 kDa que possui uma adição de 30 aminoácidos entre os domínios 13 e 14; e a variante **LEKTI_{Sh}**, que difere das demais por não possuir os dois últimos domínios (Bitoun *et al.*, 2003; Tartaglia-Polcini *et al.*, 2006).

A proteína LEKTI é processada em diferentes fragmentos (domínios acima descritos) em um compartimento pós-retículo endoplasmático, por uma enzima denominada Furina. Estes fragmentos são transportados por meio do sistema de grânulos lamelares até o meio extracelular, onde os domínios atuam inibindo diversas serino proteases (Bitoun *et al.*, 2003; Ishida-Yamamoto *et al.*, 2005).

Um estudo realizado com biópsias oriundas de tecidos humanos mostrou que LEKTI está expressa em diversas regiões do organismo, como por exemplo na mucosa oral, epitélio vaginal, amígdalas, glândulas de Bartholin e glândula parótida (Mägert *et al.*, 1999). Em 2002, pesquisadores mostraram, por meio de hibridização *in situ*, que LEKTI também está expressa na parte superior da camada espinhosa e na camada granular do epitélio de tecido normal de humanos (Komatsu *et al.*, 2002). Assim, Fortugno e colaboradores (2011) propuseram o processamento das diferentes variantes de LEKTI em queratinócitos humanos normais, bem como os diversos sítios de clivagem pela enzima Furina (Arg355, Arg425, Arg489 e Arg625) após análises *in silico*, conforme mostrado na Figura 2.

Nas três variantes, o processamento de LEKTI, entre os domínios 1 e 5, ainda não foi esclarecido. Por outro lado o processamento de LEKTI, entre os domínios 6 e 15, já é conhecido e ocorre, resumidamente, da seguinte forma:

- Após primeira clivagem (entre os domínios 5 e 6), no resíduo Arg 355:
 LEKTI_{FL} – 102 kDa (D6 ao D15);
 LEKTI_L – 105 kDa (D6 ao D15);
 LEKTI_{Sh} – 79 kDa (D6 ao D13).

- Após segunda clivagem (entre os domínios 9 e 10) – no resíduo Arg 625:
LEKTI_{FL} – dois fragmentos, sendo 37 kDa (D6 ao D9) e 65 kDa (D10 ao D15);
LEKTI_L – dois fragmentos, sendo 37 kDa (D6 ao D9) e 68 kDa (D10 ao D15);
LEKTI_{Sh} – dois fragmentos, sendo 37 kDa (D6 ao D9) e 42 kDa (D10 ao D13).
- Após terceira clivagem (entre os domínios 6 e 7) – no resíduo Arg 425:
LEKTI_{FL} – três fragmentos, sendo 7 kDa (D6), 30 kDa (D7-D9) e 65 kDa (D10 ao D15);
LEKTI_L – três fragmentos, sendo 7 kDa (D6), 30 kDa (D7-D9) e 68 kDa (D10 ao D15);
LEKTI_{Sh} – três fragmentos, sendo 7 kDa (D6), 30 kDa (D7-D9) e 42 kDa (D10 ao D13).
- Após quarta clivagem (entre os domínios 7 e 8) – no resíduo Arg 489:
LEKTI_{FL} – quatro fragmentos, sendo 7 kDa (D6), 7 kDa (D7), 23 kDa (D8-D9) e 65 kDa (D10 ao D15);
LEKTI_L – quatro fragmentos, sendo 7 kDa (D6), 7 kDa (D7), 23 kDa (D8-D9) e 68 kDa (D10 ao D15);
LEKTI_{Sh} – quatro fragmentos, sendo 7 kDa (D6), 7 kDa (D7), 23 kDa (D8-D9) e 42 kDa (D10 ao D13).
(Furio e Hovnanian, 2011).

Figura 2: Modelo da ativação proteolítica de LEKTI em queratinócitos humanos. As três isoformas LEKTI_{FL}, LEKTI_L e LEKTI_{Sh} estão representadas na figura. Os resíduos de arginina (Arg 355, Arg 625, Arg 425 e Arg 489), onde a furina efetua a clivagem, estão indicados em vermelho. As três isoformas são clivadas inicialmente no resíduo Arg 355, o que leva à geração dos fragmentos D6-D15-FL (102 kDa), D6-D15-L (105 kDa) e D10-D13-Sh (79 kDa), que são rapidamente clivados no resíduo Arg 625 para formar os fragmentos D10-D15-FL (65 kDa), D10-D15-L (68 kDa), D10-D13-Sh (42 kDa) e D6-D9 (37 kDa), o qual é igual para as três isoformas. Em seguida, o fragmento D6-D9 é clivado no resíduo Arg 425 em D6 (7 kDa) e D7-D9 (30 kDa). Logo depois, o fragmento D7-D9 é clivado no resíduo Arg 489, gerando o fragmento D7 (7 kDa) e D8-D9 (23 kDa). O processamento dos domínios D1-D5 não é mostrado, pois ainda não se sabe exatamente como ocorre. A letra K nos domínios D2 e D15 evidencia os domínios clássicos Kazal-type. As cores dos domínios são ilustrativas para melhor compreensão. Figura adaptada de Furio e Hovnanian, 2011.

Um estudo de 2003 mostrou que LEKTI recombinante, na sua variante de comprimento total (LEKTI_{FL}), é capaz de inibir diversas proteínas específicas, como calicreínas plasmina, catepsina G, elastase, tripsina e subtilisina, mas não foi capaz de inibir quimotripsina (Mitsudo *et al.*, 2003). Além disso, esse estudo foi capaz de mostrar também que LEKTI é um inibidor muito eficiente, com uma concentração inibitória média (CI 50) de 30nM para plasmina, 49nM para subtilisina e 66nM para catepsina G (Mitsudo *et al.*, 2003).

Assim como mostrado por Ishida-Yamamoto e colaboradores (2005), LEKTI e as KLKs estão presentes nas camadas mais superficiais da epiderme humana, mais especificamente, nas camadas granulosa e córnea. Ainda, tanto LEKTI quanto as KLKs 5 e 7 são secretadas para o meio extracelular, e, juntas, participam no processo de descamação normal do epitélio (Figura 3): (i) KLKs 5 e 7 são enzimas que clivam os corneodesmosomos favorecendo a descamação; (ii) e LEKTI funciona inibindo a descamação, através da inibição

das KLKs 5 e 7 (Deraison et al, 2007). Podemos observar, na Figura 3, que LEKTI inibe as KLKs na região mais profunda do estrato córneo (interface com a camada granulosa), onde o pH é mais próximo de neutro (6.8 a 7.5). À medida em que o pH se torna mais ácido nas regiões mais superficiais do estrato córneo (4.5 a 5.3), LEKTI se dissocia das KLKs e essas proteínas são capazes de degradar os corneodesmossomos, levando à descamação epitelial.

Figura 3: LEKTI, KLKs e seus papéis na descamação epitelial. Esta figura representa, resumidamente, o processo de descamação epitelial que ocorre na pele. No estrato córneo profundo, onde o pH é mais próximo de básico (6.8 a 7.5), LEKTI inibe a atividade das KLKs 5 e 7. Nas regiões mais superficiais do epitélio, como no estrato córneo superficial, o pH se torna mais ácido (4.5 a 5.3). Dessa forma, LEKTI se dissocia das KLKs, permitindo a atuação dessas proteases. Com isso, as KLKs ficam livres para degradar os corneodesmossomos, o que leva ao processo de descamação epitelial. Figura adaptada de Deraison et al., 2007.

Mutações com perda de função no gene *SPINK5* levam à Síndrome de Netherton (NS), uma doença autossômica recessiva muito severa, com sintomas bem característicos como descamação exacerbada, desidratação, cabelos com aparência de bambu, altos níveis de imunoglobulina E e eosinófilos circulantes no sangue. Os sintomas aparecem logo nos primeiros meses de vida, e para os casos mais severos, o prognóstico é muito ruim, principalmente devido às infecções recorrentes e à desidratação (Sarri *et al.*, 2016). A ausência de LEKTI faz com que as KLKs 5 e 7 fiquem desimpedidas para degradar os corneodesmossomos. Por esse motivo, o processo de descamação do epitélio é exacerbado e culmina na perda excessiva do estrato córneo superficial.

Podemos observar na literatura que uma das formas de se estudar o papel de determinado gene é através da geração de camundongos nocautes para o gene de interesse. Aproveitando dessa estratégia, dois grupos mostraram a importância de LEKTI na fisiologia epitelial. Como esperado, camundongos nocautes para *Spink5* morrem nas primeiras horas de vida devido à desidratação (Yang et al., 2004; Descargues et al., 2005). Neste contexto, Sales e colaboradores (2010) mostraram, ainda, que camundongos nocautes para a serino protease matriptase (gene *St14*), apresentam o resgate da descamação exacerbada, presente nos camundongos nocautes para *Spink5*. Em outras palavras, os zimógenos das KLKs 5 e 7 são ativados pela matriptase e, uma vez ativadas, as enzimas KLKs 5 e 7 são inibidas por LEKTI.

Como vimos anteriormente, matriptase está também envolvida na carcinogênese, ou seja, na transformação maligna da célula epitelial. Ainda, já que LEKTI inibe a via proteolítica da matriptase nas células epiteliais, houve o questionamento de uma possível participação de LEKTI na inibição da carcinogênese mediada por matriptase. Entretanto, os estudos que abordam a participação de LEKTI no HNSCC são muito escassos, sendo possível encontrar apenas alguns artigos que abordem este tema. Destes, um estudo com análises de *microarray* e *differential display* PCR mostrou que houve uma diferença de expressão de diversos genes, dos quais SPINK5 possuía expressão reduzida, quando amostras de pacientes com HNSCC e biópsias normais dos mesmos pacientes foram comparadas (Gonzalez et al., 2003). Ainda, outro estudo mostrou que neste mesmo tipo de câncer é possível observar a regulação positiva (ou expressão aumentada) de alguns genes de metaloproteases, enquanto outros, como SPINK5, se encontram subexpressos quando comparados a tecidos normais (Ye et al., 2008). Vale ressaltar também que diversas KLKs, como as 5, 7, 8 e 10 estão expressas em níveis mais altos nos carcinomas orais (língua), quando comparadas ao tecido normal (Pettus et al., 2009).

Resultados ainda não publicados do nosso laboratório mostram que a expressão concomitante de matriptase e LEKTI na camada basal do epitélio resgata a tumorigênese espontânea que acontece quando estes camundongos expressam apenas a matriptase nestas mesmas células da camada basal do epitélio. Em outras palavras, o cruzamento de animais que superexpressam a matriptase nas células da camada basal do epitélio, e que possuem fenótipo pré-maligno (K5-Matriptase), com animais que superexpressam LEKTI nessas mesmas células (K5-LEKTI), resultou em um resgate total do fenótipo tumorigênico. Ainda, dados preliminares do nosso laboratório, com marcação imunohistoquímica de LEKTI em

biópsias de carcinomas orais humanos, mostraram que esta proteína está menos expressa à medida que o carcinoma se torna mais indiferenciado e, portanto, mais agressivo.

Entretanto, os mecanismos envolvidos na possível participação de LEKTI durante a patogênese dos carcinomas de cabeça e pescoço são ainda inexplorados. Com o objetivo de testar a hipótese de que LEKTI possui a função de inibir eventos celulares associados à transformação maligna epitelial, este trabalho buscou nocautear LEKTI em células imortalizadas (capacidade proliferativa infinita: uma característica clássica adquirida por células epiteliais que passam pela transformação maligna), de origem epitelial, através da tecnologia de edição gênica CRISPR/Cas9. Ainda, esta é uma excelente oportunidade para compartilhar as dificuldades e desafios encontrados nesta pioneira metodologia de edição gênica.

OBETIVOS

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Nocautear LEKTI em células epiteliais imortalizadas, através da tecnologia de edição gênica CRISPR/Cas9, com o objetivo de testar a hipótese de que LEKTI possui a função de inibir eventos celulares associados à transformação maligna epitelial.

Objetivos Específicos

- Avaliar se as linhagens de: (i) queratinócitos imortalizados (HaCat); e (ii) carcinoma de boca (subclassificação do carcinoma de cabeça e pescoço – HN6 e HN12) expressam LEKTI;
- Nocautear LEKTI nos queratinócitos imortalizados:
 - Construir estratégia para o desenho do RNA guia e seleção do DNA alvo;
 - Clonar o RNA guia de LEKTI no plasmídeo px459 ;
 - Transfectar linhagem de queratinócitos imortalizados:
 - Construir curva de morte após tratamento com puromicina (resistência do plasmídeo px459);
 - Avaliar a eficiência de transfecção do plasmídeo px459;
 - Analisar os clones oriundos da transfecção celular acima mencionada através da:
 - Avaliação da expressão de LEKTI por imunofluorescência e Western Blot;
 - Avaliação da presença de Cas9, nestas células, por técnicas de PCR e Western Blot;
 - Avaliação da sequência do RNA guia e da quebra mediada pela enzima Cas9 no DNA genômico destes clones.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

1. Técnica de Edição Gênica CRISPR/Cas9

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) é um tipo de imunidade inata de bactérias e *archaea*, onde, após uma infecção por vírus, uma pequena porção de DNA viral, denominada de espaçador, é inserida no genoma do organismo hospedeiro, fornecendo proteção imunológica após outra infecção.

O sistema CRISPR/Cas mais utilizado para edição gênica nos dias de hoje é o CRISPR/Cas9 do Tipo II, proveniente da bactéria *Streptococcus pyogenes*. O reconhecimento de uma determinada região do genoma que se objetiva editar é feito por meio de uma sequência denominada *proto-adjacent motif* (PAM), muito comum em todos os genomas. Este sistema em questão possui a enzima Cas9 como responsável pelo reconhecimento do DNA por meio da sequência PAM (formada pela trinca de nucleotídeos ‘NGG’, onde ‘N’ pode ser qualquer nucleotídeo) e pela clivagem do DNA alvo, que forma um complexo proteico juntamente com as moléculas *crispr-RNA* (crRNA) e *trans-activating crRNA* (tracrRNA) unidas por um loop e levam o nome de *single guide RNA* (sgRNA). Este sgRNA possui uma sequência de 20 pares de bases (pb) de uma região alvo específica, sendo que a clivagem pela enzima Cas9 acontece preferencialmente na sequência *seed*, uma pequena região do sgRNA (Figura 4A).

A enzima Cas9 possui dois domínios de nuclease, o domínio RuvC que é responsável pela clivagem da fita complementar do DNA e o domínio HNH, que é responsável pela clivagem da fita alvo do espaçador de DNA (Figura 4A).

O complexo proteico formado pelo sgRNA, a enzima Cas9 e o DNA alvo efetua a quebra dupla-fita do DNA alvo e tem como consequência a indução do reparo celular, que pode seguir dois caminhos: 1) Reparo por junção de pontas não homólogas (*Non-homologous End Joining* – NHEJ), onde a célula efetua o reparo celular simplesmente unindo as extremidades danificadas, sendo que nesse local pode haver a inserção ou deleção de nucleotídeos (indels), levando à perda de informação genética (reparo esperado para realizar o *knockout*); ou 2) Reparo por Homologia (*Homology Direct Repair* – HDR), onde a célula consegue reparar precisamente o local da quebra de dupla-fita quando há uma molécula de DNA complementar àquela região danificada, que pode ser endógena ou exógena, sem que ocorra a perda de informação genética; (Figura 4B).

Figura 4: Esquema representando a clivagem do DNA pelo Sistema CRISPR/Cas9 e os reparos NHEJ e HDR. **A.** Esse esquema representa a quebra de dupla fita do DNA realizada pelo complexo CRISPR/Cas9. Inicialmente, ocorre o reconhecimento do DNA alvo a partir da sequência PAM (NGG). Em seguida, o sgRNA pareia com a sequência alvo do DNA. Após isso, o domínio nuclease RuvC da enzima Cas9 cliva a fita não complementar, enquanto o domínio HNH cliva a fita complementar do DNA, que é a fita alvo. **B.** Após a clivagem dupla fita do DNA pela enzima Cas9, o DNA pode seguir reparos diferentes para que essa molécula seja recuperada. Do lado esquerdo, uma opção é o reparo por junção de pontas não homólogas (NHEJ), onde é

possível que ocorra os chamados indels, ou seja, inserção ou deleção de nucleotídeos na região danificada do DNA, o que pode levar à perda de informação genética, reparo este esperado por nós para realizar o *knockout*. A outra opção de reparo, à direita, é o reparo por homologia (HDR), o qual consiste no reparo do DNA a partir de uma sequência de DNA homóloga à região do DNA danificado. Nesse tipo de reparo não ocorre a perda de informação genética e o DNA é reparado de forma perfeita. Imagem A Retirada do Livro Introdução à Técnica de CRISPR, 2016. Imagem B Adaptada de Sanger e Joung, 2014.

2. Desenho do Guia

Para que pudéssemos realizar o *knockout* do gene SPINK5, que codifica a proteína LEKTI, utilizamos inicialmente o *software* online gratuito CRISPR Design (<http://crispr.mit.edu>) e depois o CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>). Estes *softwares* são ferramentas muito eficazes para auxiliar no desenho de guias específicos para realizar o *knockout* de um gene de interesse. Eles são capazes de fornecer informações suficientes de variantes de uma determinada proteína, além de *off-targets* e *on-targets* de cada guia. Esse *software* nos forneceu o melhor Guia para o Exon1 de LEKTI, mais especificamente na região onde a sequência do peptídeo sinal está localizada, sendo esta responsável pelo direcionamento dessa proteína para que ela seja secretada para o meio extracelular. O Guia escolhido foi nomeado guia 2, o qual é formado pelo oligo direcional para uma das fitas do Exon 1 e o seu complementar, e possui um Score de 67 com o *software* CRISPR Design e Score 75 com o CRISPOR (Score varia de 0-100 e mede o quanto o Guia é único no genoma). A sequência dos guia 2 e seu reverso complementar estão a seguir, sendo que a região direcional está identificada com o sublinhado e os *overhangs* (saliências que representam os sítios de clivagem da enzima BbsI) do plasmídeo estão identificados com letras minúsculas, e o nucleotídeo preferencial da Polimerase III para transcrição está identificado com letra minúscula e em vermelho:

Forward: 5'- cacc**g**TTGGCTCTTTGCCTCATACA - 3'

Reverse: 5' – aaacTGTATGAGGCAAAGAGCCAAc - 3'

3. Clonagem

Após o desenho e síntese do guia 2, este foi clonado no plasmídeo px459 (pSpCas9(BB)-2A-Puro (px459) V2.0, gentilmente cedido por Feng Zhang - Addgene plasmid # 62988), o qual está ilustrado na Figura 5A. Este plasmídeo contém, principalmente, além de outros componentes, o promotor U6 (em amarelo), que controla a expressão do *single*

guide RNA (sgRNA – em azul) e o promotor Cbh (*hybrid form of a CB promoter*, também em amarelo), que controla a expressão da Cas9 (que contém um tag FLAG, em vermelho) e do gene de resistência ao antibiótico puromicina (em cinza). Para a clonagem, inicialmente, os oligos do guia 2-LEKTI foram submetidos ao protocolo de anelamento descrito a seguir:

Protocolo de Anelamento:

- 1 minuto a 95°C
- Decrescer 5°C a cada 1 minuto até 25°C
- 7 µL de água livre de nucleases
- 1 µL Primer *Forward* (100 uM)
- 1 µL Primer *Reverse* (100 uM)
- 1 µL T4 Ligase Buffer (NEB)

Depois, este plasmídeo foi digerido com a enzima de restrição BbsI (Figura 5B) (New England BioLabs® Inc., EUA) e, em seguida, os oligos foram ligados ao plasmídeo com a enzima T4 Ligase (New England BioLabs® Inc., EUA). O protocolo desta reação está descrito a seguir:

Digestão/Ligação:

- 100 ng de Vetor
- 2 µL Oligos (guia 2-LEKTI) anelados
- 1 µL BbsI
- 1 µL T4 Ligase
- 2 µL T4 Ligase Buffer
- Água livre de nucleases - q.s.p 20 µL

Os plasmídeos clonados foram então transformados em bactérias DH5- α calciocompetentes. Depois, as colônias que cresceram na placa com seleção ao antibiótico ampicilina foram ressuspensas em água. Após esse processo, as bactérias com o plasmídeo guia 2-LEKTI foram submetidas ao PCR de colônia, descrito no item 7, digestão analítica, descrita no item 4, e sequenciamento, descrito no item 12, para confirmação da inserção dos oligos. Por fim, este plasmídeo contendo o guia 2 de LEKTI foi amplificado por meio do kit *PureLink™ HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit* (Thermo Fischer Scientific Inc., EUA) e

preparado para as etapas posteriores de transfecção em células.

Figura 5: Representação esquemática das principais regiões do Plasmídeo px459 e o local de inserção do guia 2-LEKTI neste plasmídeo. A. Este plasmídeo possui o sgRNA sob o controle do promotor U6, enquanto que a expressão da Cas9 (com FLAG) é controlada pelo promotor Cbh. O plasmídeo px459 possui o gene de resistência a puromicina e possui um comprimento total de 9175 pares de base. **B.** Este plasmídeo possui dois sítios de restrição da enzima BbsI mostrados em cinza. Esta enzima cliva nas regiões assinaladas com as pontas de flecha vermelhas. A região demarcada com bordas azuis é a sequência que é perdida após digestão com essa enzima e inserção do guia 2-LEKTI, e portanto, perde-se os sítios de reconhecimento dessa enzima. Figura B adaptada de Ran et al, 2013.

4. Digestão Analítica

Os clones positivos e os plasmídeos vazios foram submetidos à Digestão Analítica para confirmar a correta inserção do guia 2-LEKTI. As digestões foram realizadas em dois tubos diferentes para cada amostra, sendo o primeiro tubo a Digestão Analítica com EcoRI+BbsI (New England Biolabs® Inc., EUA) e o segundo tubo com apenas a enzima NotI (New England Biolabs® Inc., EUA). É importante ressaltar que os sítios de reconhecimento e de clivagem da enzima BbsI são perdidos quando o guia 2 é inserido corretamente naqueles plasmídeos. Os plasmídeos vazios utilizados possuem 2 sítios de restrição da enzima BbsI, 2 sítios da enzima EcoRI e 1 sítio da enzima NotI, conforme a Figura 6A. Após a Digestão Analítica destes plasmídeos com EcoRI+BbsI, podemos observar um padrão de fragmentos no gel de agarose conforme a Figura 6B, coluna 1; quando estes são digeridos com NotI, podemos observar um padrão de fragmentos no gel de agarose conforme a Figura 6B, coluna 2. Os clones positivos, após a inserção do guia 2-LEKTI, possuem 2 sítios de EcoRI e 1 sítio de NotI, conforme Figura 6C. Após Digestão destes clones com EcoRI+BbsI podemos observar o padrão de fragmentos na Figura 6D, coluna 1 e após Digestão com NotI, o padrão de fragmentos é o mostrado na Figura 6D, coluna 2.

Figura 6: Padrão de Fragmentos do plasmídeo px459 vazio e clonado com guia 2 após Digestão Analítica. A. O plasmídeo vazio px459 possui dois sítios de restrição da enzima BbsI, dois sítios da enzima EcoRI e um sítio da enzima NotI. B. Após digestão analítica desse plasmídeo vazio com as enzimas BbsI + EcoRI, temos o

padrão representativo de bandas no gel de agarose da coluna 1, com 3 dos 4 fragmentos representados da Figura A. Por seu tamanho diminuto, o fragmento 1, formado pelos sítios de BbsI adjacentes, costumeiramente não é identificado no gel de agarose. Após digestão analítica desse mesmo plasmídeo com a enzima NotI, temos o padrão representativo de bandas no gel de agarose da coluna 2, com o plasmídeo linearizado. **C.** Conforme explicitado na Figura 5B, após a clonagem do plasmídeo px459 com o guia 2 de LEKTI há a perda dos sítios de restrição para BbsI. Desta forma, o plasmídeo fica com apenas os 2 sítios de restrição da enzima EcoRI e um sítio da enzima NotI. **D.** Na coluna 1 é possível observar o padrão representativo de bandas no gel de agarose, com apenas 2 fragmentos representados da Figura C, após digestão analítica do plasmídeo clonados com o guia 2 com as enzimas BbsI + EcoRI, enquanto que na coluna 2 é possível observar o padrão representativo de bandas no gel de agarose, com o plasmídeo linearizado, após digestão analítica com a enzima NotI.

5. Curva de Morte e Seleção de Células Transfectadas

Para que as células transfectadas com o plasmídeo px459 pudessem ser submetidas ao processo de seleção com antibiótico puromicina (Sigma Aldrich, EUA), foi feita uma análise de curva de morte com o objetivo de se padronizar a menor e melhor concentração de antibiótico capaz de matar todas as células da linhagem imortalizada HaCaT não transfectadas no período de três dias. Para tanto, 2×10^5 células foram incubadas durante três dias com as concentrações de 0, 0.5, 1, 1.5, 2 e 3 $\mu\text{g/mL}$ do antibiótico em placas de 24 poços. Ainda, as células não tratadas com o antibiótico não morrem e se proliferam durante esse período. Uma vez estabelecida a concentração de uso do antibiótico, a seleção consistiu em incubação das células transfectadas por três dias. Ao fim, as células sobreviventes foram incubadas normalmente com DMEM completo, contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), até que formassem colônias isoladas. Estas colônias foram então coletadas com o auxílio de uma pipeta, após um curto período de incubação com tripsina, e realocadas em placas de 96 poços para etapas posteriores.

6. Transfecção

As células imortalizadas HaCaT foram submetidas à transfecção para que o plasmídeo px459 guia 2-LEKTI fosse inserido nas mesmas. O reagente de transfecção utilizado foi a *Lipofectamine 3000* (Thermo Scientific, EUA), seguindo o protocolo do fabricante. As células que receberam o plasmídeo px459 vazio e px459 guia 2-LEKTI (2 μg), que possuem o gene de resistência puromicina, foram co-transfectadas com um plasmídeo que possui o gene repórter GFP (0,5 μg) (pcDNA3-EGFP foi um presente de Doug Golenbock - Addgene plasmid # 13031) para que pudéssemos observar por microscopia se a transfecção haveria funcionado. Após 24h de transfecção, as células foram selecionadas com o antibiótico puromicina na concentração de $1 \mu\text{g/mL}$ por 3 dias. Em seguida, as células foram mantidas em cultura até que colônias isoladas crescessem. Essas colônias foram então coletadas e passadas

para placas com 96 poços e mantidas em cultura para futuros experimentos de confirmação do *knockout*.

7. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A amplificação do DNA das células foi feita pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Para tanto, foi utilizado o kit *Taq Pol Master Mix 2x Green* (Cellco Biotec, São Carlos, Brasil), que contém, em uma única solução (Master Mix), a enzima DNA polimerase termoestável, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, KCl, MgCl₂, corante, tampão de carregamento e estabilizantes.

O equipamento utilizado para as PCRs foi o Termociclador (C1000-Touch™ Thermocycler, Bio-Rad, Berkeley, California, EUA). A descrição do programa de PCR para amplificação de LEKTI e GAPDH a partir de amostras de cDNA (DNA complementar) é mostrada abaixo:

1. Desnaturação inicial – 95°C por 2 minutos;
2. Desnaturação – 95°C por 1 minuto;
3. Anelamento/Hibridização – 55°C por 1 minuto;
4. Elongação – 72°C por 1 minuto;
5. Repetição dos passos 2-4 por 33 vezes;
6. Elongação final – 72°C por 7 minutos;
7. Manutenção das amostras – 4°C até a retirada das amostras;

Além disso, uma das etapas de confirmação preliminares da correta inserção do guia 2-LEKTI no plasmídeo px459 é o PCR de colônias. Esta reação é realizada com dois primers específicos, sendo o *Forward* U6 do promotor do sgRNA e o *Reverse* sendo a sequência complementar do guia 2-LEKTI. A descrição do programa de PCR de colônias utilizado é mostrada abaixo:

1. Desnaturação inicial – 95°C por 3 minutos;
2. Desnaturação – 95°C por 1 minuto;
3. Anelamento/Hibridização – 53°C por 1 minuto;
4. Elongação – 72°C por 1 minuto;
5. Repetição dos passos 2-4 por 40 vezes;

6. Elongação final – 72°C por 10 minutos;
7. Manutenção das amostras – 4°C até a retirada das amostras;

Os primers utilizados em todas as reações de PCR estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Primers utilizados nas reações de PCR

GENES	SEQUÊNCIA
SPINK5 F	5' - TGTGTGCCAGTGTGTTCAAA - 3'
SPINK5 R	5' - GGAGTCGTCCATTCCTCACA - 3'
GAPDH F	5' - AGATCCCTCCAAAATCAAGTGG - 3'
GAPDH R	5' - GGCAGAGATGATGACCCTTTT - 3'
U6 F	5' - GAGGGCCTATTTCCCATGATTCC - 3'
GUIA 2 R	5' - AAAGTGTATGAGGCAAAGAGCCAAC - 3'
CAS9 F	5' - AGTTCATCAAGCCCATCCTG - 3'
CAS9 R	5' - GAAGTTTCTGTTGGCGAAGC - 3'

8. Extração de RNA seguida de Síntese de cDNA

Células provenientes de carcinoma de boca (HN6 e HN12) e queratinócitos imortalizados (HaCaT) foram submetidas à extração de RNA por meio de TRIzol® (Life Technologies™, CA, EUA). As células foram inicialmente tripsinizadas e posteriormente peletadas em tubos limpos. As células foram então submetidas ao protocolo de extração de RNA com TRIzol®, que difere daquele proposto pelo *datasheet* do fabricante apenas em uma incubação em isopropanol por 60 minutos a -80°C para que a precipitação do RNA ocorra de forma mais eficiente. Após o término da extração do RNA das células, as amostras foram quantificadas no espectrofotômetro *Eppendorf BioSpectrometer® kinetic* (Eppendorf, Alemanha). Em seguida, 3 µg de RNA foram tratados com duas unidades da enzima DNase I (New England BioLabs®, EUA) para eliminação de DNA genômico residual que possa ter permanecido nas amostras.

Após a utilização da DNase I, as amostras foram novamente quantificadas e 500 ng de RNA foram utilizados para síntese de cDNA. Para esse processo foi utilizado o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, EUA), seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante.

Para garantir a qualidade das amostras e indicar que estas não possuíam DNA genômico residual, foi realizada uma reação sem a presença da enzima Transcriptase Reversa, substituindo o volume de 1 μL da enzima por H_2O livre de RNase e DNase. Para facilitar a identificação, essa reação foi denominada “no RT”. Em seguida, as reações com as amostras e a reação controle foram submetidas à Reação em Cadeia da Polimerase descrita no item 7.

9. Extração de proteínas e Western blot

Para essa etapa realizamos a extração proteica de queratinócitos imortalizados HaCaT. Para tanto, foi feito o protocolo de lise e extração de proteínas totais, que consiste em lisar 3×10^6 células em 200 μL de tampão de lise RIPA (Sigma Aldrich, EUA) e 3 μL de coquetel inibidor de proteases (Sigma Aldrich, EUA), na concentração de 15 $\mu\text{L}/\text{mL}$ a 4°C por 20 minutos, seguido de sonicação à mesma temperatura e centrifugação a 13400 rpm por 20 minutos, também a 4°C . A quantidade total de proteína do lisado foi quantificada pelo método de Bradford.

As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida a 70V, em câmara fria (4°C), para separação das bandas proteicas. Após a corrida, foram transferidas à membrana de nitrocelulose a 100V por 1h, também em câmara fria (4°C). A membrana foi então corada com solução de *Ponceau* 0,5% por 5 minutos para observar se as proteínas haviam sido transferidas para a membrana e, em seguida, descorada por lavagens sucessivas com TBS-Tween 0,1%.

Para detecção de proteínas na membrana, a mesma foi bloqueada por 1 hora com 5% de leite integral, seguida de incubação pelo mesmo período com anticorpo primário específico para LEKTI (R&D Systems AF8515) ou anti-FLAG (Invitrogen, EUA) em 1% de leite integral. Após sucessivas lavagens com TBS-Tween 0,1%, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti IgG de coelho conjugado com peroxidase (Jackson Immunoresearch Laboratories, INC) relativo ao primário por 1 hora em 1% de leite integral. Por fim, a membrana foi lavada com TBS-Tween 0,1% e revelada com ECL (Enhanced ChemiLuminescence, Amersham International Ltd, Bucks, UK) e as fotos adquiridas com o equipamento ChemiDocTM MP Imaging Systems (Bio-rad, EUA).

10. Imunofluorescência

A linhagem celular HaCaT foi cultivada *overnight* sobre lamínulas de vidro com 13 mm de diâmetro, em placas de 24 poços, na concentração de 3×10^4 células/poço, em meio DMEM

completo com 10% de soro fetal bovino. Após a adesão, as células foram fixadas por 20 minutos em 2% paraformaldeído (EM Sciences, Hatfield, PA) diluído em PBS (*Phosphate Buffer Saline*), e posteriormente lavadas duas vezes com PBS e uma vez com 0.1 M de glicina, também diluída em PBS. Logo em seguida, as células foram bloqueadas através da incubação, por 45 minutos, com uma solução de 2% BSA (*bovine serum albumin*) em PBS. Após o bloqueio, as células foram lavadas três vezes com PBS e incubadas com o anticorpo primário policlonal anti-SPINK5 a 2 µg/ml (Novus Biologicals, a biotechne brand, USA) diluído em PBS contendo 1% de BSA, por 1 hora. Depois, as células foram lavadas cinco vezes de três minutos com PBS + BSA 1% e incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com Alexa 488, diluídos (1:1000) em PBS + BSA 1%, por 30 minutos. Em seguida, as lamínulas foram lavadas 10 vezes em PBS + BSA 1% por três minutos, passadas rapidamente em água Milli-Q e montadas com Fluoromount G (EM Sciences, Hatfield, PA), contendo DAPI. O Controle Negativo da imunofluorescência foi realizado apenas com o anticorpo secundário conjugado a Alexa 488. O material foi então analisado por microscopia de fluorescência e as imagens obtidas com o auxílio do microscópio confocal SP5 (Leica Microsystems, Alemanha).

11. Extração de DNA genômico

A extração do DNA genômico foi realizada nas células transfectadas e WT. Inicialmente, um poço de 6 confluyente de cada célula foi lavado com PBS e depois tripsinizado, peletado e as células ressuspensas em 100 µL de Tampão de Lise contendo Proteinase K (Sigma, EUA). Essas células foram então incubadas a 55° C por 2 horas. Em seguida, adicionamos 100 µL de Isopropanol (Merck Millipore, EUA), vortexamos e centrifugamos por 10 minutos a 13.200 rpm. Por fim, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensado em 100 µL de TE para experimentos futuros.

12. Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado para verificar se houve uma clivagem dupla-fita pela enzima Cas9 nas células transfectadas com px459 guia 2-LEKTI. Inicialmente, realizamos uma PCR com a enzima *Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase* (New England Biolabs®, EUA) para amplificar a região onde o complexo CRISPR/Cas9 atuaria nas células transfectadas, de aproximadamente 500 pares de base, bem como da região de uma célula *wild-type* (WT). O primer *Forward* utilizado foi o 5' –

TCTGTTCAAACCTGACACCCTGAC - 3' e o *Reverse* utilizado foi o 5' - AAGAATTTCTCATGGTTAGAAAATTCAGATTATCTCAAACCTACT - 3'. O produto de PCR foi então submetido à reação com o kit *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Thermo Fisher Scientific, USA). O produto dessa amplificação foi precipitado e submetido ao sequenciamento Sanger utilizando o equipamento *ABI 3500xL Genetic Analyzer*, um sistema de análise de DNA de 24 capilares de 50 cm e o polímero POP-7, com a tecnologia Applied Biosystems (Life Technologies, EUA), e posteriormente as sequências foram analisadas.

13. Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados utilizando-se o *software* GraphPad Prism v7.04 (GraphPad Software, San Diego, California, EUA, www.graphpad.com). Para a meta-análise dos dados de bioinformática foram realizadas análises de variância ANOVA de 1 via, com pós-teste de Tukey's.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Expressão de LEKTI em: (i) amostras humanas de carcinoma de cabeça e pescoço; e (ii) linhagens de carcinoma de boca (HN6 e HN12) e de queratinócito imortalizado (HaCaT)

Inicialmente, realizamos uma busca na base de dados de bioinformática *cBio Portal For Cancer Genomics* para observar os níveis de expressão de mRNA de LEKTI em carcinomas de cabeça e pescoço. Foi possível observar, de acordo com a Figura 7A, que o mRNA de LEKTI está expresso nesse tipo de câncer. Ainda, nesta mesma imagem, podemos observar que essa expressão diminui à medida em que os tumores se tornam pouco diferenciados (G1 – carcinoma bem diferenciado, G2 – carcinoma moderadamente diferenciado e G3 – carcinoma pouco diferenciado), sendo que há maior expressão de mRNA de LEKTI em carcinomas bem diferenciados quando comparados aos demais grupos (G1 Vs G2, $p=0,0001$; G1 Vs G3, $p<0,0001$).

O próximo passo foi avaliar se as linhagens de células epiteliais imortalizadas/transformadas, da mesma maneira, expressavam LEKTI. Realizamos um RT-PCR (Reverse Transcriptase PCR) do cDNA da linhagem de queratinócito imortalizado (HaCaT) e de duas linhagens de carcinoma de cabeça e pescoço; HN6 (primária) e HN12 (metastática), com o objetivo de analisar a expressão de mRNA de LEKTI de forma semi-quantitativa. Foi possível identificar que as três linhagens expressam mRNA de LEKTI (Figura 7B). Nesta figura, HaCaT é representada na coluna 1, HN6 na coluna 2 e HN12 na coluna 3. A coluna 4 representa o controle negativo, sem DNA, da reação de PCR. Ainda, as colunas de 5 a 10 mostram, respectivamente, a expressão de GAPDH (5, 6 e 7) e os controles negativos, na ausência da enzima transcriptase reversa, (8, 9 e 10) das linhagens HaCaT, HN6 e HN12.

Figura 7: Expressão de mRNA de LEKTI em carcinoma de cabeça e pescoço e em linhagem imortalizada de queratinócito e linhagens de carcinoma de boca. **A.** Análise de dados de Bioinformática indicando a expressão de mRNA de LEKTI em carcinomas de cabeça e pescoço humanos. Nessa imagem há maior expressão de LEKTI em carcinomas bem diferenciados (G1), quando comparados a carcinomas moderadamente diferenciados (G2) e carcinomas pouco diferenciados (G3) (ANOVA de 1 via, *** $p = 0,0001$; **** $p < 0,0001$). **B.** Expressão de mRNA de LEKTI em HaCaT, HN6 e HN12, a partir de cDNA dessas células. No painel superior, podemos observar a expressão de LEKTI em HaCaT (1), HN6 (2) e HN12 (3); a coluna 4 mostra o controle negativo sem DNA. No painel inferior, temos a amplificação do controle endógeno GAPDH, sendo HaCaT (5), HN6 (6), HN12 (7), controle negativo 'no RT' da HaCaT (8), controle negativo 'no RT' de HN6 (9), controle negativo no RT de HN12 (10)

2. Desenho experimental do guia 2-LEKTI e clonagem deste guia no plasmídeo px459 para nocautear LEKTI através da metodologia CRISPR/Cas9

Após a confirmação da expressão de LEKTI na linhagem imortalizada HaCaT e nas linhagens de carcinoma de boca (HN6 e HN12), prosseguimos com o desenho experimental para nocautear LEKTI nestas linhagens celulares. Inicialmente, a padronização dos experimentos para a geração do CRISPR/Cas9 de LEKTI foi realizada com a linhagem celular HaCaT.

O gene *SPINK5* (NG_009633.1), que codifica LEKTI, possui 15 domínios e, exceto pelo domínio 1, todos os demais possuem atividade inibitória. O exon 1 do gene *SPINK5* codifica para o peptídeo sinal (LEKTI é uma proteína que é secretada para o meio extracelular) e para o domínio 1. Assim, o exon 1 foi o alvo escolhido para que a Cas9 realizasse a clivagem dupla-fita após o direcionamento com o RNA guia.

Após o desenho do oligonucleotídeo referente ao RNA guia de LEKTI, com a utilização dos *softwares* gratuitos e disponíveis na internet: CRISPR design e CRISPOR

(descritos na seção Material e Métodos), procedeu-se à escolha do RNA guia, denominado guia 2-LEKTI, que mostrou um *score* de eficiência de 75% (Figura 8A). A clonagem do guia 2-LEKTI no plasmídeo px459 foi então confirmada por PCR de colônia (Figura 8B). Na coluna 1 podemos observar a amplificação dessa região do px459 guia 2-LEKTI, com 250pb, que corresponde à região do início do promotor U6 (*primer forward*) ao final do oligonucleotídeo do RNA guia (*primer reverse*); na coluna 2 o controle positivo da reação (gene PKM2 não relacionado, clonado anteriormente em nosso laboratório); e na coluna 3 o controle negativo da reação de PCR, sem DNA.

O clone escolhido, após clonagem do guia 2-LEKTI, na reação de PCR foi submetido à digestão analítica com as enzimas BbsI+EcoRI e NotI (descritas no item 4 da seção Material e Métodos) para confirmação do sucesso da clonagem. Podemos observar, na Figura 8C, que o px459 guia 2-LEKTI possui apenas duas bandas visíveis no gel (coluna 4), quando comparado ao plasmídeo px459 vazio digerido que possui três bandas visíveis (coluna 2, a banda de 22 pares de base não é visível no gel), mostrando que o sítio de clivagem da enzima BbsI foi perdido e o guia 2-LEKTI inserido com sucesso. As demais colunas na figura 8C correspondem, respectivamente, ao plasmídeo px459 vazio não digerido (coluna 1), plasmídeo px459 vazio linearizado com a enzima NotI (coluna 3) e px459 guia 2-LEKTI linearizado com a enzima Not I (coluna 5).

Por fim, como último método para confirmação de que a sequência do guia 2-LEKTI foi inserida de forma correta e ausente de mutações, este foi submetido ao sequenciamento Sanger (descrito no item 12 da seção Material e Métodos). Conforme a Figura 8D, o plasmídeo px459 guia 2-LEKTI possui a sequência intacta do guia, ausente de mutações (painel inferior). O plasmídeo px459 vazio também foi sequenciado, como controle (painel superior).

Figura 8: Desenho experimental e clonagem do guia 2-LEKTI no plasmídeo px459. **A.** Desenho experimental do guia 2-LEKTI. Este guia de 20 pb foi desenhado direcionado ao final do Exon 1 do gene que codifica para esta proteína. A sequência PAM (AGG) pode ser encontrada entre o final do exon 1 e início do intron. **B.** PCR de Colônia. Na coluna 1 podemos observar a amplificação da região compreendida entre o início do promotor U6 e final do oligo do guia 2-LEKTI escolhido. Na coluna 2 é possível observar o controle positivo da reação, o qual consiste em um gene não relacionado, já clonado em nosso laboratório. Na coluna 3 observamos o controle negativo, sem DNA. **C.** Digestão Analítica. Na coluna 1 temos o plasmídeo px459 vazio e não digerido. Na coluna 2 observamos este mesmo plasmídeo digerido com as enzimas BbsI+EcoRI, mostrando 3 bandas visíveis. Na coluna 3 é possível observar o mesmo plasmídeo vazio, digerido com NotI, linearizado. Na coluna 4 observamos o px459 guia 2-LEKTI, digerido com BbsI+EcoRI, mostrando apenas duas bandas visíveis, pois após a inserção do guia 2 o plasmídeo perdeu os sítios de restrição da enzima BbsI. Na coluna 5 é possível observar o px459 guia 2-LEKTI digerido apenas com NotI e, consequentemente, linearizado. **D.** Sequenciamento Sanger do px459 vazio (painel superior) e px459 guia 2-LEKTI (painel inferior), mostrando a sequência correta do guia inserido e ausente de mutações.

3. A linhagem de queratinócito imortalizada HaCaT: (i) foi induzida à morte, através do tratamento com o antibiótico puromicina, em 3 dias; e (ii) apresentou eficiência de transfecção muito baixa

A clonagem do guia 2-LEKTI no plasmídeo px459 foi acompanhada: (i) do teste de concentração de antibiótico ideal para a linhagem imortalizada de queratinócito HaCaT; (ii) e para o teste de eficiência de transfecção.

Para a curva de morte, incubamos 2×10^5 células em placas com 24 poços, com o objetivo de definir a menor concentração do antibiótico puromicina que fosse capaz de matar todas as células selvagens em um tempo compatível com a entrada e transcrição do plasmídeo nas células (3 dias). Testamos 5 concentrações diferentes de antibiótico (0, 0,5, 1, 1,5, 2 e 3 $\mu\text{g/mL}$), além de um controle positivo não tratado com antibiótico. Como apresentado na Figura 9A, na concentração de 0,5 $\mu\text{g/mL}$, as células começaram a morrer no primeiro dia de

tratamento, mas células remanescentes se mantiveram viáveis até o terceiro dia (linha verde no gráfico). Na concentração de 1 µg/mL, a maioria das células morreu nos 2 primeiros dias e todas morreram com 3 dias de tratamento (linha azul no gráfico). Já nas concentrações de 1.5, 2 e 3 µg/mL todas as células morreram entre 1 e 2 dias de tratamento (curvas preta, amarela e bege, respectivamente), o que nos mostrou serem concentrações muito altas. Comparativamente, as células não tratadas cresceram normalmente durante os 3 dias (linha vermelha no gráfico). Dessa forma, definimos a concentração de 1 µg/mL do antibiótico puromicina para a seleção dos clones transfectados com os plasmídeos px459 vazio e px459 guia 2-LEKTI. Os resultados do gráfico (Figura 9A) são relativos à quantificação das células viáveis em 5 campos de cada concentração de antibiótico.

Em seguida, partimos para o teste de eficiência de transfecção. Nesse teste realizamos a transfecção da linhagem celular HaCaT com Lipofectamina 3000, utilizando: (i) o plasmídeo px459 vazio + pcDNA3-EGFP; e (ii) px459 guia 2-LEKTI + pcDNA3-EGFP. Plaqueamos 1×10^6 células em placas de 6 poços e transfectamos essas células com 2,5 µg de DNA (0,5 µg de plasmídeo EGFP e 2 µg de plasmídeo CRISPR). Por fim, realizamos a quantificação de 5 campos de cada amostra e calculamos a porcentagem de eficiência de transfecção. É possível observar, na Figura 9B, que as células transfectadas com o px459 vazio + pcDNA3-EGFP apresentaram aproximadamente 13% de eficiência de transfecção (coluna azul), enquanto que as células transfectadas com o plasmídeo px459 guia 2-LEKTI apresentaram aproximadamente 7% de eficiência de transfecção (coluna laranja).

Figura 9: Curva de morte e eficiência de transfecção da linhagem imortalizada de queratinócito HaCaT.
A. Curva de morte com 5 concentrações diferentes de antibiótico puromicina, 0,5 µg/mL, 1 µg/mL, 1,5 µg/mL, 2 µg/mL e 3 µg/mL, além de um controle positivo não tratado; a quantificação das células foi realizada a partir de

5 campos diferentes de cada concentração **B.** Quantificação da eficiência de transfecção de células HaCaT com o plasmídeo px459 vazio+pcDNA3-EGFP (em torno de 13%), plasmídeo px459 guia 2-LEKTI+pcDNA3-EGFP (em torno de 7%) e células não transfectadas.

Após a transfecção com os plasmídeos px459 vazio e px459 guia 2-LEKTI, as células foram selecionadas com meio contendo 1 µg/ml de puromicina por 3 dias. Procedeu-se com o isolamento de colônias e com o re-plaqueamento dos clones individuais em placas de 96 poços. Entretanto, durante essa etapa, apenas as células que foram transfectadas com o plasmídeo px459 guia 2-LEKTI sobreviveram. Foram isolados 20 clones após clonagem com o px459 guia 2-LEKTI + pcDNA3-EGFP, dos quais 4 clones sobreviveram (#3, #8, #14 e #19); e foram isolados 8 clones após px459 vazio + pcDNA3-EGFP, com morte de 100% dos clones isolados. Dessa forma, prosseguimos para as etapas posteriores de confirmação das células nocautes apenas com as células transfectadas com o plasmídeo px459 guia 2-LEKTI. Como controle e, apesar de não ser o ideal, utilizamos as células não transfectadas (HaCaT selvagens).

4. As células HaCaT transfectadas com o plasmídeo px459 guia 2-LEKTI não são nocautes

Os quatro clones: 3, 8, 14 e 19, além do *pool* (clones que não foram passíveis de isolamento e que cresceram residualmente na placa), foram expandidos e checados para a confirmação de possíveis linhagens nocautes para LEKTI. Como observado na Figura 10A, todos os clones selecionados, o *pool* de células transfectadas e as células HaCaT selvagens possuem a expressão de LEKTI no citoplasma. Entretanto, as células HaCaT selvagem, o *pool* e clone 3 apresentam menor expressão e de forma muito similar entre si, quando comparados com o clone 8, clone 14 e clone 19, que apresentam maior expressão e de forma mais difusa no citoplasma. Pelo fato de LEKTI ser secretado para o meio extracelular, em um contexto fisiológico normal, investigamos através de Western Blot se os clones selecionados, o *pool* de células transfectadas e as células HaCaT selvagens: (i) expressavam LEKTI em algum dos compartimentos celulares (lisado celular, Figura 10B, painel superior); e (ii) secretavam LEKTI para o meio extracelular (lisado do sobrenadante, Figura 10B, painel inferior). Como o anticorpo utilizado reconhece a região C-terminal de LEKTI, os tamanhos de bandas esperadas no Western Blot referentes a, respectivamente LEKTI_{FL}/LEKTI_L/LEKTI_{Sh} são 148KDa/145KDa/125KDa (proteína LEKTI não processada), 105KDa/102KDa/79KDa (após clivagem Arg355), 68KDa/65KDa/42KDa (após clivagem Arg625). Observamos, na Figura

10B, que tanto no lisado quanto no sobrenadante é possível observar que LEKTI é expresso em todos os clones selecionados (coluna C, clone 3; coluna D, clone 8; coluna E, clone 14; e coluna F, clone 19), no *pool* (coluna B), e nas células HaCaT selvagens (coluna A). Na Figura 10B, coluna G, observamos marcação de LEKTI no lisado de pele de camundongo K5-LEKTI (controle positivo, super-expressa LEKTI na camada basal do epitélio). Já na Coluna H, não é possível observar marcação de LEKTI, pois o lisado utilizado foi de camundongo nocaute para LEKTI, sendo assim o controle negativo da reação.

A

B

Figura 10: Imunofluorescência e Western Blot das células transfectadas. A. Imunofluorescência das células transfectadas e selvagens. Nessa imagem podemos observar que todas as células expressam LEKTI no citoplasma. O controle negativo foi feito utilizando-se apenas anticorpo secundário (Ctrl Sec). **B.** Western Blot das células transfectadas e selvagens. Podemos observar nessa imagem que todas as células expressam os fragmentos de LEKTI tanto no lisado celular quanto no sobrenadante. Na figura 10B painel acima, na coluna A temos as células HaCaT selvagens, na coluna B, o pool de células transfectadas; na coluna C, clone 3; na coluna

D, clone 8; na coluna E, clone 14; na coluna F, clone 19; na coluna G, pele de camundongo que super-expressa LEKTI (controle positivo); na coluna H, pele de camundongo LEKTI nocaute (controle negativo). O GAPDH foi utilizado como controle endógeno. * representa uma banda inespecífica, pois há expressão no camundongo SPINK5 nocaute (coluna H).

5. As células transfectadas apresentam um *stop codon* prematuro e, portanto, a maquinaria de CRISPR/Cas9 intacta

Com o objetivo de confirmar a presença de Cas9 residual nestes clones, apesar da ausência de linhagens celulares nocautes para LEKTI, amplificamos uma região do gene da *Cas9* utilizando os primers descritos na seção Material e Métodos. Observamos na Figura 11B que o *pool* (coluna B), clone 8 (coluna D), clone 14 (coluna E) e clone 19 (coluna F) expressam fragmento amplificado do gene *Cas9*, enquanto que a célula HaCaT selvagem (coluna A) e o clone 3 (coluna C) não o expressam. Como controle positivo da amplificação do PCR, utilizamos o plasmídeo px459 vazio (coluna G), enquanto que a coluna H representa o nosso controle negativo sem DNA. Ainda, é possível confirmar na Figura 11C, através da análise por Western Blot com anticorpo anti-FLAG, já que o px459 expressa este tag fusionado à Cas9, que a proteína Cas9 também estava sendo expressa no *pool* (coluna 2), clone 14 (coluna 5) e clone 19 (coluna 6). Como esperado, não foi possível observar a presença do gene *Cas9* e sua expressão proteica na célula HaCaT selvagem (coluna 1). O clone 3 (coluna 3) não mostrou presença do gene *Cas9* e, conseqüentemente, a expressão dessa proteína. Entretanto, apesar do gene da *Cas9* estar presente no clone 8 (banda presente no PCR), não foi possível detectar a expressão dessa proteína (coluna 4).

Por fim, com o objetivo de checar se a sequência a ser reconhecida pelo RNA guia, nestas células, correspondia àquela disponível na base de dados (utilizada para o desenho dos RNAs guia), analisamos, por meio de sequenciamento, a sequência do guia 2-LEKTI no DNA genômico da linhagem HaCaT WT e do clone 19. Como observado na Figura 11D, a linhagem HaCaT selvagem possui, aparentemente, 3 nucleotídeos em heterozigose na região de 20 pb direcional do nosso guia 2-LEKTI, não correspondendo à sequência exata do RNA guia. Por outro lado, embora seja possível observar a heterozigose no clone 19, este apresenta a inserção de um nucleotídeo na região onde a Cas9 provavelmente efetuou a clivagem (após 3 ou 4 nucleotídeos *upstream* à sequência PAM), o que levou à formação de um *stop codon* prematuro logo após a região referente ao guia 2-LEKTI (Figura 11C – círculo em vermelho). Assim, nossos resultados mostram que alguns alelos possuem a sequência intacta, enquanto que outros não, o que pode ter impossibilitado a atuação eficiente do sistema CRISPR/Cas9.

Figura 11: Maquinaria CRISPR/Cas9 intacta e heterozigose no gene SPINK5 de HaCaT selvagem. **A.** Amplificação do gene da Cas9 no DNA genômico das células transfectadas e selvagem. Coluna A: HaCaT selvagem; Coluna B: pool; Coluna C: clone 3; Coluna D: clone 8; Coluna E: clone 14; Coluna F: clone 19; Coluna G: controle positivo, plasmídeo px459 vazio; Coluna H: controle negativo sem DNA. **B.** Western Blot anti-FLAG. Nessa imagem observamos a expressão protéica da Cas9, que possui o tag FLAG, no *pool* e clones 14 e 19. **C.** Sequenciamento da célula HaCaT WT e clone 19. Nessa imagem observamos a sequência original do NCBI utilizada para fazer o desenho experimental de LEKTI e a região de LEKTI sequenciada da célula HaCaT selvagem e clone 19. Podemos observar que a região de 20 pb direcional do guia 2-LEKTI possui heterozigose dos alelos do gene SPINK5 quando comparado à sequência do NCBI. Ainda, a sequência do clone 19 apresenta a inserção de um nucleotídeo no local do guia 2-LEKTI (evidenciada pelo círculo vermelho), o que levou à formação de um *stop codon* prematuro.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

A presente dissertação objetivou-se em realizar o nocaute da proteína LEKTI em linhagens de: (i) queratinócito imortalizado (HaCaT); e (ii) células neoplásicas oriundas de HNSCC (HN6 e HN12), utilizando a tecnologia de edição gênica CRISPR/Cas9. Ainda, antes de prosseguir com as linhagens tumorais, iniciamos a padronização e validação dos experimentos com a linhagem HaCaT: uma linhagem de queratinócitos não-tumorais e imortalizados.

Na prática, entretanto, nocautear a proteína LEKTI na linhagem HaCaT seria o passo inicial ao entendimento de como LEKTI estaria envolvido em HNSCC, já que esta linhagem celular exhibe inúmeras características comuns às aquelas linhagens tumorais, como a proliferação infinita e poliploidia (Boukamp et al., 1988).

Inicialmente, analisamos a expressão de LEKTI em 490 casos de HNSCC, fazendo uso de dados de bioinformática (*cBio Portal For Cancer Genomics*). Para esta análise de expressão, os casos foram agrupados de acordo com os seguintes graus de diferenciação histológica dos tumores: grau 1 (G1), que corresponde aos carcinomas bem diferenciados; grau 2 (G2), que corresponde aos tumores moderadamente diferenciados; e grau 3 (G3), que corresponde aos tumores pouco diferenciados. Essa meta-análise mostrou que a expressão de LEKTI foi maior no grupo G1, quando comparado aos grupos G2 e G3, com diferença estatística (ANOVA de 1 via - G1 Vs G2, $p = 0,0001$; G1 Vs G3, $p < 0,0001$, Figura 7A). Este aumento está em acordo com resultados prévios (ainda não publicados) obtidos em nosso laboratório, nos quais a expressão de LEKTI, além de estar ausente nos carcinomas histologicamente indiferenciados, acontece nas células bem diferenciadas dos tumores com maior diferenciação histológica.

Os resultados mencionados acima foram validados nas linhagens celulares HaCaT, HN6 e HN12 (Figura 7B), por meio de análise semi-quantitativa (RT-PCR). A expressão de LEKTI foi detectada tanto na linhagem celular imortalizada HaCaT quanto nas linhagens de carcinoma de boca. Neste contexto, a linhagem HN12 é originária de metástase, enquanto que a linhagem HN6 é oriunda de carcinoma primário (HN6 e HN12 são oriundas do mesmo doador) (Cardinali et al., 1995). Seria interessante a análise quantitativa da expressão de LEKTI nestas células para avaliar a possível diferença na expressão, ainda que tênue, entre as linhagens primárias e a linhagem metastática. Com esse objetivo, estamos otimizando a

reação de PCR em tempo real para melhor elucidar e validar os resultados de bioinformática obtidos.

CRISPR foi descrito pela primeira vez há mais de 30 anos por Ishino e colaboradores (1987), e a função de imunidade adaptativa foi proposta por Mojica e colaboradores em 2005. Apenas recentemente, entre 2012 e 2013, CRISPR foi proposto como tecnologia de edição gênica em mamíferos (Jinek et al., 2012; Cong et al., 2013). Desde então, houve um crescimento muito robusto do número de publicações onde CRISPR foi utilizado como ferramenta, com aproximadamente 20 manuscritos publicados por semana (Nature Biotechnology, 2017). Este *boom* do CRISPR para a edição gênica, na comunidade científica, é consequência da facilidade, flexibilidade e baixo custo inerentes a esta metodologia, que pode ser utilizada para editar o genoma de diversos organismos.

Como objetivo deste estudo, o sistema CRISPR/Cas9 foi a metodologia de escolha para a edição gênica em linhagens celulares. Através de linhagens nocautes para LEKTI, teríamos uma ferramenta importante para dissecar os mecanismos celulares envolvidos nas vias proteolíticas inibidas por LEKTI nos HNSCC.

Para o desenho experimental, utilizamos a sequência do gene *SPINK5* humano (NG_009633.1) disponível na base de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). LEKTI é uma proteína secretada em fragmentos para o meio extracelular, e o exon 1 codifica a sequência do peptídeo sinal. Ainda, dos 15 domínios de LEKTI, apenas os domínios 1 e 15 não possuem atividade inibitória. Os outros domínios, de forma isolada, são capazes de inibir as KLKs (Deraison et al., 2007). Desta forma, com o objetivo de se gerar um *stop codon* prematuro e impedir a tradução protéica a partir do exon 2, utilizamos a sequência do Exon 1 para realizar o desenho dos guias (Figura 8A). Por ser uma sequência-alvo curta, de 20 pares de base, existiu a dificuldade de se selecionar um RNA guia com *score* acima de 75. Este *score*, disponibilizado pelos *softwares* de desenho do RNA guia (CRISPR Design e CRISPOR) avalia, entre outros parâmetros, a presença de *off-targets*, os quais são sequências do genoma de interesse alheias à região-alvo, mas onde o complexo CRISPR/Cas9 pode efetuar a clivagem dupla-fita de forma inespecífica. Um artigo de Kennedy e colaboradores (2015) mostrou que o sistema CRISPR/Cas9 foi capaz de inativar os oncogenes E6 e E7 do HPV16/18 de células de carcinoma cervical, mas que resultou também em uma translocação de parte do cromossomo 8 para a região clivada pela Cas9. Portanto, uma das características do sistema CRISPR que deve ser levada em consideração na edição gênica são os *off-targets*. Desta forma, o guia 2-LEKTI foi escolhido por possuir o maior *score* fornecido pelo *software*,

o que representa o melhor local da região do Exon 1 com o menor número de *off-targets* (*Scores* do guia2-LEKTI, de acordo com cada um dos *softwares*; CRISPR Design: 67; CRISPOR: 75).

O plasmídeo utilizado para a expressão dos componentes do CRISPR/Cas9, denominado px459 (#62988 - Addgene), possui: (i) a expressão do sgRNA (crRNA+tracrRNA), onde clonamos o guia 2-LEKTI, sob o controle do promotor U6, o qual é transcrito pela Polimerase III; e (ii) a Cas9 e o gene de resistência a puromicina, sob o controle do promotor Cbh, transcrito pela Polimerase II.

A diferença de tamanho entre o plasmídeo (px459: 9175 pb) e o inserto a ser clonado (guia 2-LEKTI: 20 pb) é muito grande. Dessa forma, a clonagem foi uma etapa que exigiu um extenso período de padronização, que culminou na realização e otimização de dois diferentes protocolos adaptados de Cong e colaboradores (2013): (i) reações de digestão e ligação do plasmídeo ao inserto foram realizadas separadamente, o que, entretanto, após a transformação das bactérias, resultou em um baixo crescimento de colônias positivas; e (ii) reações de digestão e ligação do plasmídeo ao inserto foram realizadas simultaneamente em um mesmo *ependorf*, o que resultou em um maior número de colônias de bactérias positivas, após a transformação. A confirmação dessa etapa foi realizada por três metodologias diferentes: (i) PCR de colônia (Figura 8B); (ii) digestão analítica (Figura 8C) e; (iii) sequenciamento (Figura 8D), as quais foram bem sucedidas e permitiram que progredíssemos para as etapas posteriores.

Antes de iniciarmos a etapa de transfecção celular, precisávamos confirmar a concentração de antibiótico puromicina capaz de inviabilizar todas as células HaCaT selvagem no período de 3 dias, e que fosse capaz de selecionar as células transfectadas com o plasmídeo px459 resistentes ao antibiótico. Para tanto, assim como mostrado por Wicovsky e colaboradores (2007), que utilizaram a concentração de 1 µg/mL para selecionar as células HaCaT com puromicina, decidimos elaborar um protocolo de curva de morte que fosse capaz de confirmar essa concentração. Realizamos, então, uma curva de morte com as células HaCaT selvagem, utilizando diferentes concentrações de puromicina (conforme item 5 da seção Material e Métodos). A quantificação foi realizada através da contagem das células viáveis, se presentes, em 5 campos diferentes para cada concentração de antibiótico, durante 5 dias de tratamento. Confirmamos, então, que a concentração de 1 µg/mL de puromicina foi capaz de inviabilizar todas as células no período de 3 dias, conforme mostrado na Figura 9A.

As células foram então co-transfectadas, primeiramente, com: (i) os plasmídeos px459 vazio e pcDNA3-EGFP; e (ii) px459 guia 2-LEKTI e pcDNA3-EGFP para analisarmos a eficiência da transfecção. Essa etapa é essencial, pois quanto maior a quantidade final de clones sobreviventes, maior a probabilidade de clones positivos para os plasmídeos citados anteriormente.

É possível observar na Figura 9B que a eficiência de transfecção do plasmídeo px459 vazio+pcDNA3-EGFP ficou em torno de 13%, enquanto que a do plasmídeo px459 guia 2-LEKTI+pcDNA3-EGFP ficou em torno de 7%. Essa baixa eficiência pode estar relacionada com a confluência das células e com a concentração de cálcio no meio de cultura. Deyrieux e Wilson (2007) mostraram que há maior eficiência de transfecção em HaCaT com Lipofectamina 2000 quando uma menor quantidade de células é transfectada e quando incubadas em baixas concentrações de cálcio no meio de cultura.

Por motivo de baixa eficiência de transfecção, apesar de na literatura diversos trabalhos terem utilizado o método de transfecção por lipossomos com as células HaCaT (Bachelor et al., 2002; Seoane et al., 2002; Benedyk et al., 2007; Lacerte et al., 2008), essa etapa foi umas das mais árduas e demoradas, e dessa forma, tivemos que repeti-la diversas vezes até que tivéssemos clones sobreviventes e pudéssemos continuar com a investigação do nocaute. As células transfectadas com os plasmídeos px459 vazio, apesar de demonstrarem um maior percentual de eficiência de transfecção, não sobreviveram à seleção dos clones. Portanto, continuamos os experimentos apenas com os clones sobreviventes das células transfectadas com o plasmídeo px459 guia 2-LEKTI, os quais foram denominadas de, clone 3, clone 8, clone 14 e clone 19. Ainda, os clones que não foram passíveis de isolamento, cresceram residualmente na placa e a eles nós denominamos *pool*.

Sendo assim, a investigação do nocaute consistiu em 2 etapas: (i) ensaio de imunofluorescência; e (ii) Western Blot. Na Figura 10A observamos, por meio de imunofluorescência, que todos os clones expressam LEKTI, quando comparados com as células HaCaT selvagem. Nessa figura, podemos observar que os clones 8, 14 e 19 parecem expressar mais LEKTI de forma mais difusa no citoplasma, quando comparados com os outros clones e HaCaT selvagem. Essa dispersão de LEKTI no citoplasma poderia estar de acordo com o proposto por Jayakumar e colaboradores (2005), que mostram que LEKTI, quando não possui a região do peptídeo sinal, se localiza de forma mais difusa no citoplasma. Ainda, os autores desse estudo propõem que LEKTI sem o peptídeo sinal adquire características insolúveis, e por isso, seria encontrada em abundância na porção insolúvel do

lisado celular após Western Blot. Entretanto, quando realizamos a técnica de Western Blot, todos os clones expressaram LEKTI tanto no lisado celular (exceto membranas) quanto no sobrenadante, assim como a HaCaT selvagem (Figura 10B). Com esses resultados observamos que possivelmente nenhum clone seria nocaute para LEKTI.

Como havia a possibilidade de nenhum clone ser nocaute para LEKTI, iniciamos o processo de confirmação da expressão da enzima Cas9 e da presença de mutação no DNA genômico. Optamos por realizar três etapas de confirmação: (i) PCR convencional com primers específicos para o gene *Cas9*, a partir de amostra de DNA genômico dos clones isolados; (ii) Western Blot com anticorpo anti-FLAG para confirmar a expressão da enzima Cas9; e (iii) sequenciamento da região homóloga ao RNA guia.

A primeira e segunda etapas consistiram em nos mostrar se o gene *Cas9* e a proteína Cas9 estavam presentes nas células transfectadas. Normalmente, os plasmídeos CRISPR transfectados, que contém a enzima Cas9, se mantêm nas células por mais de 72 horas, o que poderia levar à uma integração genômica dessa molécula, enquanto que com a utilização da proteína purificada isso não ocorre, assim com evidenciado por Kim e colaboradores (2017). Ainda, no caso de integração, esta pode ocorrer a uma taxa de 10-30% quando direcionado ao núcleo (Smith, 2001). Os resultados da Figura 11A e B nos mostram que no *pool*, no clone 14 e no clone 19 houve amplificação de banda, por PCR, com *primers* específicos para o gene *Cas9* e expressão da proteína da Cas9. No clone 8, o fragmento do gene da *Cas9* foi amplificado por PCR, mas não houve expressão proteica, talvez por impossibilidade de detecção por Western Blot (Figura 11A e B). Como esperado, não foi possível observar a presença do gene *Cas9* e sua expressão proteica na célula HaCaT selvagem. Entretanto, o clone 3 não mostrou presença do gene *Cas9* e, consequentemente, a expressão dessa proteína, o que nos levou a acreditar que o plasmídeo tenha sido degradado após o período de seleção com puromicina. Entretanto, naqueles clones que apresentaram a presença do gene e expressão da proteína Cas9, não fomos capazes de identificar se o plasmídeo px459 estava integrado no genoma ou episomal no interior das células.

As duas etapas acima nos mostraram que toda a maquinaria CRISPR/Cas 9 estava intacta, pelo menos no quesito expressão da enzima Cas9. Dessa forma, nos questionamos se a sequência genômica relativa à região do guia 2-LEKTI do exon 1 do gene *SPINK5* dessas células estava intacta, pelo fato de que o não-pareamento correto da sequência guia com o DNA genômico impossibilitaria a atuação da enzima Cas9 de maneira eficiente. Este achado

corroboraria com Zheng e colaboradores (2017), que mostraram que a Cas9 praticamente não tolera *mismatches* na sequência *seed*.

Esta região *seed* foi proposta como a região que confere a maior especificidade no pareamento do guia com o DNA genômico, pois permite que o domínio de reconhecimento (REC) da enzima Cas9 atue de forma mais eficiente (Nishimasu et al., 2014; Liu et al., 2016). Para confirmar a sequência dessa região, realizamos o sequenciamento Sanger das células HaCaT selvagem e do clone 19, como comparação. A Figura 11C nos mostra que, aparentemente, a sequência referente ao nosso guia 2-LEKTI na célula HaCaT selvagem possui heterozigose em pelo menos 3 nucleotídeos, sendo que 2 deles estão localizados exatamente na região referente à sequência *seed*, o que impossibilitaria a clivagem dupla-fita da Cas9 nos alelos onde o pareamento não é completo. Por outro lado, o sequenciamento do clone 19 nos mostrou uma inserção na região da sequência *seed* e identificamos a formação de um *stop codon* prematuro, conforme a Figura 11C, o que levaria ao impedimento da transcrição nos alelos que possuem essa modificação (Ran et al., 2013). Entretanto, embora o sequenciamento Sanger seja uma metodologia extremamente sensível e que fornece dados muito confiáveis (Tsiatis et al., 2010), é necessário que este seja repetido para a linhagem HaCaT selvagem, clone 19 e de todos os outros não sequenciados, para que possamos confirmar a heterozigose e propor direções futuras bem elaboradas.

Portanto, de acordo com os resultados discutidos acima, acreditamos que seria praticamente impossível realizar o nocaute completo de LEKTI utilizando apenas o guia 2-LEKTI na linhagem celular HaCaT. Uma estratégia alternativa para realizar o nocaute seria a utilização de dois guias diferentes com sequências específicas para cada alelo do gene *SPINK5*, na linhagem HaCaT, já que possivelmente esta linhagem possui mutações na região homóloga ao guia. Outra estratégia que melhoraria a eficiência de transfecção celular seria a diminuição do cálcio do meio de cultura quando as células são transfectadas com Lipofectamina 2000 (Deyrieux e Wilson, 2007). Ainda, já iniciamos a clonagem do nosso guia 2-LEKTI no plasmídeo lentiviral (Add gene #52961 – Sanjana et al. 2014), pois a entrega do DNA através da transdução (Wang et al., 2013) é mais eficiente, assim como o descrito por Sanjana e colaboradores (2014). Finalmente, estamos em processo de desenhar outro guia para essa mesma região para tentar suprimir os problemas da heterozigose (dados não mostrados).

Por fim, fica evidente que a tecnologia de edição gênica CRISPR/Cas9 para a realização de nocaute possui diversos desafios e dificuldades, entretanto, continua sendo uma

ferramenta eficiente para se estudar o envolvimento de uma proteína em carcinomas de cabeça e pescoço (Birkeland et al., 2016; Kyakusoku et al., 2016).

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos na presente dissertação nos permitem concluir que:

- A expressão de LEKTI está presente em amostras humanas de carcinoma de cabeça e pescoço e em linhagem celular imortalizada (HaCaT) e provenientes de carcinoma de boca (HN6 e HN12);
- O desenho experimental do guia 2-LEKTI e a clonagem deste guia no plasmídeo px459 foram realizadas com sucesso;
- As células HaCaT são inviabilizadas com 3 dias de tratamento com concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ de antibiótico puromicina e possuem baixa eficiência de transfecção com Lipofectamina 3000;
- A maquinaria CRISPR/Cas9 estava sendo expressa nas células HaCaT, mas não foi possível realizar o nocaute de LEKTI nessas células, pois o gene SPINK5 de células HaCaT selvagem parece possuir heterozigose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI, J. *et al.* Genetic etiology of oral cancer. **Oral Oncology**, v. 70, p. 23–28, 2017.
- ANTALIS, T. M. *et al.* The cutting edge: membrane-anchored serine protease activities in the pericellular microenvironment. **The Biochemical journal**, v. 428, n. 3, p. 325–46, 2010.
- BACHELOR, M. A.; SILVERS, A. L.; BOWDEN, G. T. The role of p38 in UVA-induced cyclooxygenase-2 expression in the human keratinocyte cell line, HaCaT. **Oncogene**, v. 21, n. 46, p. 7092–7099, 2002.
- BALBOA, D. *et al.* Conditionally Stabilized dCas9 Activator for Controlling Gene Expression in Human Cell Reprogramming and Differentiation. **Stem Cell Reports**, v. 5, n. 3, p. 448–459, 2015.
- BARRANGOU, R. *et al.* CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. **Science**, v. 315, n. March, p. 1709–1712, 2007.
- BENEDYK, M. *et al.* HaCaT keratinocytes overexpressing the S100 proteins S100A8 and S100A9 show increased NADPH oxidase and NF- κ B activities. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 8, p. 2001–2011, 2007.
- BENGTSSON, N. E. *et al.* Muscle-specific CRISPR/Cas9 dystrophin gene editing ameliorates pathophysiology in a mouse model for Duchenne muscular dystrophy. **Nature Communications**, v. 8, p. 1–9, 2017.
- BITOUN, E. *et al.* LEKTI proteolytic processing in human primary keratinocytes, tissue distribution and defective expression in Netherton syndrome. **Human Molecular Genetics**, v. 12, n. 19, p. 2417–2430, 2003.
- BIRKELAND, A. C. *et al.* The potential for tumor suppressor gene therapy in head and neck cancer. **Discovery medicine**, v. 21, n. 113, p. 41–7, 2016.
- BOUKAMP, P. Normal Keratinization in a Spontaneously Immortalized. **Journal of Cell Biology**, v. 106, n. March, p. 761–771, 1988.
- BRITISH, D. A. Opportunistic oral cancer screening. **BDA occasional paper, April**, n. 6, 2000.
- BUGGE, T. H.; ANTALIS, T. M.; WU, Q. Type II transmembrane serine proteases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 35, p. 23177–23181, 2009.
- BUGGE, T. H.; LIST, K.; SZABO, R. Proteases and Tissue Remodeling Unit, National Institute of Dental and Craniofacial Research, National Institutes of Health, Bethesda, MD. **BioScience**, v. 15, p. 5060–5070, 2007.
- CARDINALI, M. *et al.* Tyrosine phosphorylation as a marker for aberrantly regulated growth-promoting pathways in cell lines derived from head and neck malignancies.

International Journal of Cancer, v. 61, n. 1, p. 98–103, 1995.

CONG, L. *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. **Science (New York, N.Y.)**, v. 339, n. 6121, p. 819–23, 2013.

COSTEA, D. E. *et al.* Cancer stem cells - New and potentially important targets for the therapy of oral squamous cell carcinoma. **Oral Diseases**, v. 12, n. 5, p. 443–454, 2006.

DELTCHEVA, E. *et al.* CRISPR RNA maturation by trans -encoded small RNA and host factor RNase III. **Nature**, v. 471, n. 7340, p. 602–607, 2011.

DESCARGUES, P. *et al.* Spink5-deficient mice mimic Netherton syndrome through degradation of desmoglein 1 by epidermal protease hyperactivity. **Nature Genetics**, v. 37, n. 1, p. 56–65, 2005.

DEYRIEUX, A. F.; WILSON, V. G. In vitro culture conditions to study keratinocyte differentiation using the HaCaT cell line. **Cytotechnology**, v. 54, n. 2, p. 77–83, 2007.

DOWNWARD, J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 1, p. 11–22, 2003.

FELLER, L.; LEMMER, J. Oral Squamous Cell Carcinoma: Epidemiology, Clinical Presentation and Treatment. **Journal of Cancer Therapy**, v. 03, n. 04, p. 263–268, 2012.

FORTUGNO, P. *et al.* Proteolytic activation cascade of the netherton syndrome-defective protein, LEKTI, in the epidermis: Implications for skin homeostasis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 131, n. 11, p. 2223–2232, 2011.

FURIO, L.; HOVNANIAN, A. When Activity Requires Breaking Up : LEKTI Proteolytic Activation Cascade for Specific Proteinase Inhibition. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 131, n. 11, p. 2169–2173, 2011.

GONZAILEZ, M. V. *et al.* Deletion and methylation of the tumour and neck squamous cell carcinoma. p. 509–512, 1997.

GONZALEZ. Identification of 9 genes differentially expressed in head and neck squamous cell carcinoma . v. 129, n. July 2003, p. 1–2, 2003.

HAEUSSLER, M. *et al.* Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR. **Genome Biology**, v. 17, n. 1, p. 1–12, 2016.

HAFT, D. H. *et al.* A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/cas subtypes exist in prokaryotic genomes. **PLoS Computational Biology**, v. 1, n. 6, p. 0474–0483, 2005.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HOOPER, J. D. *et al.* Type II transmembrane serine proteases. Insights into an emerging class

of cell surface proteolytic enzymes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 2, p. 857–860, 2001.

HUNTER, K. D.; PARKINSON, E. K.; HARRISON, P. R. Profiling early head and neck cancer. v. 5, n. February, 2005.

HYAKUSOKU, H. *et al.* JunB promotes cell invasion, migration and distant metastasis of head and neck squamous cell carcinoma. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 35, n. 1, p. 6, 2016.

INCA, 2018 – Estimativas Câncer 2018 – Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/estimativa-2018.pdf>

ISHIDA-YAMAMOTO, A. *et al.* LEKTI is localized in lamellar granules, separated from KLK5 and KLK7, and is secreted in the extracellular spaces of the superficial stratum granulosum. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 124, n. 2, p. 360–366, 2005.

ISHINO, Y. *et al.* Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 12, p. 5429–5433, 1987.

JANSEN, R. *et al.* Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. **Molecular Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 1565–1575, 2002.

JINEK, M. *et al.* A Programmable Dual-RNA – Guided. v. 337, n. August, p. 816–822, 2012.

JAYAKUMAR, A. *et al.* Consequences of C-terminal domains and N-terminal signal peptide deletions on LEKTI secretion, stability, and subcellular distribution. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 435, n. 1, p. 89–102, 2005.

KAMB, A. *et al.* A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. **Science (New York, N.Y.)**, v. 264, n. 5157, p. 436–40, 1994.

KANEMARU, A. *et al.* Deregulated matriptase activity in oral squamous cell carcinoma promotes the infiltration of cancer-associated fibroblasts by paracrine activation of protease-activated receptor 2. **International Journal of Cancer**, v. 140, n. 1, p. 130–141, 2017.

KENNEDY, E. M. *et al.* Inactivation of the Human Papillomavirus E6 or E7 Gene in Cervical Carcinoma Cells by Using a Bacterial CRISPR/Cas RNA-Guided Endonuclease. **Journal of Virology**, v. 88, n. 20, p. 11965–11972, 2014.

KHAN, A. R.; JAMES, M. N. G. Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. **Protein science : a publication of the Protein Society**, v. 7, n. 4, p. 815–836, 1998.

KIM, S. *et al.* Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. **Genome Research**, v. 24, n. 6, p. 1012–1019, 2014.

KOMATSU, N. *et al.* Elevated stratum corneum hydrolytic activity in Netherton syndrome suggests an inhibitory regulation of desquamation by SPINK5-derived peptides. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 118, n. 3, p. 436–443, 2002.

LACERTE, A. *et al.* Transforming growth factor- β inhibits telomerase through SMAD3 and E2F transcription factors. **Cellular Signalling**, v. 20, n. 1, p. 50–59, 2008.

LEE, S. L.; DICKSON, R. B.; LIN, C. Y. Activation of hepatocyte growth factor and urokinase/plasminogen activator by matriptase, an epithelial membrane serine protease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 47, p. 36720–36725, 2000.

LIU, X. *et al.* Sequence features associated with the cleavage efficiency of CRISPR/Cas9 system. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–9, 2016.

LIST, K. *et al.* Matriptase/MT-SP1 is required for postnatal survival, epidermal barrier function, hair follicle development, and thymic homeostasis. **Oncogene**, v. 21, n. 23, p. 3765–3779, 2002.

____. Deregulated matriptase causes ras -independent multistage carcinogenesis and promotes ras -mediated malignant transformation. **Genes & Development**, v. 19, p. 1934–1950, 2005.

____. Delineation of matriptase protein expression by enzymatic gene trapping suggests diverging roles in barrier function, hair formation, and squamous cell carcinogenesis. **American Journal of Pathology**, v. 168, n. 5, p. 1513–1525, 2006.

LLEWELLYN, C. D.; JOHNSON, N. W.; WARNAKULASURIYA, K. A. A. S. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people - A comprehensive literature review. **Oral Oncology**, v. 37, n. 5, p. 401–418, 2001.

MA FORASTIERE, W KOCH, A TROTTI, D. S. HEAD AND NECK CANCER. v. 345, n. 26, p. 1890–1900, 2001.

MÄGERT, H. J. *et al.* LEKTI, a novel 15-domain type of human serine proteinase inhibitor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 31, p. 21499–21502, 1999.

MAKAROVA, K. S. A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 2, p. 482–496, 2002.

MAKAROVA, K. S. *et al.* A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: Computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. **Biology Direct**, v. 1, p. 1–26, 2006.

____. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 11, p. 722–736, 2015.

MANUSCRIPT, A.; ONLINEFIRST, P. Downloaded from cancerpreventionresearch.aacrjournals.org on April 1, 2018. © 2018 American Association for Cancer Research. [s.l: s.n.].

MELO FILHO, M. R. DE *et al.* Quality of life of patients with head and neck cancer. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 79, n. 1, p. 82–88, 2013.

MEYER-HOFFERT, U. Reddish, scaly, and itchy: How proteases and their inhibitors

contribute to inflammatory skin diseases. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 57, n. 5, p. 345–354, 2009.

MEYER-HOFFERT, U.; SCHRÖDER, J. M. Epidermal proteases in the pathogenesis of rosacea. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 15, n. 1, p. 16–23, 2011.

MILLER, C. S.; WHITE, D. K. Human papillomavirus expression in oral mucosa, premalignant conditions, and squamous cell carcinoma: a retrospective review of the literature. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics**, v. 82, n. 1, p. 57–68, 1996.

MITSUDO, K. *et al.* Inhibition of serine proteinases plasmin, trypsin, subtilisin A, cathepsin G, and elastase by LEKTI: A kinetic analysis. **Biochemistry**, v. 42, n. 13, p. 3874–3881, 2003.

MOHANRAJU, P. *et al.* Diverse evolutionary roots and mechanistic variations of the CRISPR-Cas systems. **Science**, v. 353, n. 6299, 2016.

MOJICA, F. J. M. *et al.* Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. **Journal of Molecular Evolution**, v. 60, n. 2, p. 174–182, 2005.

MOLINOLO, A. A. *et al.* Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis. **Oral Oncology**, v. 45, n. 4–5, p. 324–334, 2009.

MURRAY, ANDREW S; VARELA FAUSTO A; LIST, K. Cancer Therapy. v. 397, n. 9, p. 815–826, 2016.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. Head and neck cancers. Disponível em: <https://www.cancer.gov/types/head-and-neck/head-neck-fact-sheet>

Nature Biotechnology. v. 35, 389, 2017. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nbt.3885>. Acesso em 26 de maio de 2018.

NEVILLE, B. W.; DAY, T. A. Oral cancer and precancerous lesions. **Ca-A Cancer Journal for Clinicians**, v. 52, n. 4, p. 195–215, 2002.

NISHIMASU, H. *et al.* HHS Public Access. v. 156, n. 5, p. 935–949, 2015.

PATEL, S. J. *et al.* Identification of essential genes for cancer immunotherapy. **Nature**, v. 548, n. 7669, p. 537–542, 2017.

PETTUS, J. R. *et al.* Multiple kallikrein (KLK 5, 7, 8, and 10) expression in squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Histol Histopathol**, v. 24, n. 2, p. 197–207, 2009.

PUENTE, X. S. *et al.* A genomic view of the complexity of mammalian proteolytic systems. **Biochemical Society Transactions**, v. 33, n. 2, p. 331–334, 2005.

- REED, A. L. *et al.* High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Res**, v. 56, n. 16, p. 3630–3633, 1996.
- RIET, P. VAN DER *et al.* Frequent Loss of Chromosome 9p21-22 Early in Head and Neck Cancer Progression. **Cancer Research**, v. 54, n. 5, p. 1156 LP-1158, 1994.
- SALES, K. U. *et al.* Matriptase initiates activation of epidermal pro-kallikrein and disease onset in a mouse model of Netherton syndrome. **Nature Genetics**, v. 42, n. 8, p. 676–683, 2010.
- SALES, K. U.; FRIIS, S.; KONKEL, J. E.; *et al.* Non-hematopoietic PAR-2 is essential for matriptase-driven pre-malignant progression and potentiation of ras-mediated squamous cell carcinogenesis. **Oncogene**, v. 34, n. 3, p. 346–356, 2015.
- SALES, K. U.; FRIIS, S.; ABUSLEME, L.; *et al.* Matriptase promotes inflammatory cell accumulation and progression of established epidermal tumors. **Oncogene**, v. 34, n. 35, p. 4664–4672, 2015.
- SANJANA, N. E.; SHALEM, O.; ZHANG, F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. **Nature Methods**, v. 11, n. 8, p. 783–784, 2014.
- SANMAN, L. E.; BOGYO, M. Activity-Based Profiling of Proteases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 83, n. 1, p. 249–273, 2014.
- SARRI, C. A. *et al.* Netherton Syndrome: A Genotype-Phenotype Review. **Molecular Diagnosis and Therapy**, v. 21, n. 2, p. 137–152, 2016.
- SATOMURA, A. *et al.* Precise genome-wide base editing by the CRISPR Nickase system in yeast. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2017.
- SHILLITOE, S. AND. The high risk human papillomaviruses and oral cancer: evidence for and against a causal relationship. p. 130–147, 1997.
- SEONANE, J.; LE, H.-V.; MASSAGUE, J. Cell culture Myc suppression of the p21 Cip1 Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage. **Nature**, v. 419, n. October, p. 729–734, 2002.
- SHMAKOV, S. *et al.* Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 169–182, 2017.
- SMITH, K. Theoretical mechanisms in targeted and random integration of transgene DNA. **Reproduction, nutrition, development**, v. 41, n. 6, p. 465–485, 2002.
- SOMERS, K. D. *et al.* Frequent p53 mutations in head and neck cancer. **Cancer Research**, v. 52, n. 21, p. 5997–6000, 1992.
- SOREK, R.; KUNIN, V.; HUGENHOLTZ, P. CRISPR - A widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 181–186, 2008.
- SZABO, R.; BUGGE, T. H. Membrane-Anchored Serine Proteases in Vertebrate Cell and

Developmental Biology. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 27, n. 1, p. 213–235, 2011.

TAKEUCHI, T. *et al.* Cellular localization of membrane-type serine protease 1 and identification of protease-activated receptor-2 and single-chain urokinase-type plasminogen activator as substrates. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 34, p. 26333–26342, 2000.

TANAKA, R. J.; ONO, M.; HARRINGTON, H. A. Skin barrier Homeostasis in atopic dermatitis: Feedback regulation of kallikrein activity. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, 2011.

TARTAGLIA-POLCINI, A. *et al.* SPINK5, the defective gene in Netherton syndrome, encodes multiple LEKTI isoforms derived from alternative pre-mRNA processing. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, n. 2, p. 315–324, 2006.

TRUSOLINO, L.; COMOGLIO, P. M. Scatter-Factor and Semaphorin Receptors: Cell Signalling for Invasive Growth. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 4, p. 289–300, 2002.

TSIATIS, A. C. *et al.* Comparison of Sanger sequencing, pyrosequencing, and melting curve analysis for the detection of KRAS mutations: Diagnostic and clinical implications. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 12, n. 4, p. 425–432, 2010.

UHLAND, K. Matriptase and its putative role in cancer. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, n. 24, p. 2968–2978, 2006.

VIGNESWARAN, N.; WILLIAMS, M. D. Epidemiologic trends in head and neck cancer and aids in diagnosis. **Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 123–141, 2014.

WANG, J. *et al.* Structural and Mechanistic Basis of PAM-Dependent Spacer Acquisition in CRISPR-Cas Systems. **Cell**, v. 163, n. 4, p. 840–853, 2015.

YANG, T. *et al.* Epidermal detachment , desmosomal dissociation , and destabilization of corneodesmosin in Spink5 – / – mice. n. 713, p. 2354–2358, 2004.

YE, H. *et al.* Transcriptomic dissection of tongue squamous cell carcinoma. **BMC Genomics**, v. 9, p. 1–11, 2008.

WICOVSKY, A. *et al.* Sustained JNK activation in response to tumor necrosis factor is mediated by caspases in a cell type-specific manner. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 4, p. 2174–2183, 2007.

ZHANG, X. H. *et al.* Off-target effects in CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, v. 4, n. 11, 2015.

ZHENG, T. *et al.* Profiling single-guide RNA specificity reveals a mismatch sensitive core sequence. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–8, 2017.