UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR E
BIOAGENTES PATOGÊNICOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**O gene *KIAA0090* é ativado em lesão pré-neoplásica e
seu silenciamento por siRNA causa morte celular em
linhagem de melanoma.**

Rodrigo Ribeiro da Silva

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de <i>Mestre em Ciências</i> , área de concentração Biologia Celular e Molecular

Orientadora: Profa. Dra. Enilza Maria Espreafico

Ribeirão Preto
Junho – 2010

Ficha Catalográfica

Silva, Rodrigo Ribeiro

O gene *KIAA0090* é ativado em lesão pré-neoplásica e seu silenciamento por siRNA causa morte celular em linhagem de melanoma, Ribeirão Preto, 2010.

90 p.; 30cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / USP – Área de concentração: Biologia Celular e Molecular

Orientador: Enilza Maria Espreafico

1- câncer; 2- melanoma; 3- expressão gênica; 4- apoptose; 5- interferência funcional

FOLHA DE APROVAÇÃO

Rodrigo Ribeiro da Silva

O gene *KIAA0090* é ativado em lesão pré-neoplásica e seu silenciamento por siRNA causa morte celular em linhagem de melanoma.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de *Mestre em Ciências*.

Área de concentração: Biologia Celular e Molecular

Aprovada em ____/____/____.

Professor Doutor Sérgio Vicente Serrano

Instituto: Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos

Assinatura:

Professor Doutor Carlos Gilberto Carlotti Júnior

Instituto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

Assinatura:

Professora Doutora Enilza Maria Espreafico

Instituto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

Assinatura:

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”

(Leonardo da Vinci)

“Mostre-me um homem 100% satisfeito e eu lhe mostrarei um fracassado”

(Thomas Edison)

DEDICATÓRIA

Dedico

A quem, sem esperar nada em troca, vibra com sentimento verdadeiro pela conquista deste trabalho.

[illegible]

Agradeço especialmente

A Deus, por ter me concedido a serenidade para aceitar as coisas que eu não posso mudar, coragem para mudar as coisas que eu posso, e sabedoria para que eu saiba a diferença.

Agradeço especialmente

Aos meus pais, Eurípedes Ribeiro e Vilma Pereira, pela belíssima família e educação que me concederam e pelo apoio incondicional em bons e não tão bons momentos.

Aos meus queridos irmãos, Rogério, Luciana e Fabiano, pelo exemplo permanente de comportamento e postura. E também a todos os meus sobrinhos, Vinícius, Isabela, João Pedro, Maria Clara e Luís Otávio.

“Amo minha família, cada um de vocês e mesmo distantes, conseguimos manter a chama desse amor. O amor que nos une a cada dia, nos dando força para viver, nos dando força a cada caminhada, pois onde quer que vamos, sabemos que jamais estamos sozinhos. Os caminhos são diferentes, mas quando precisamos ali estamos nós em qualquer situação, acolhendo uns aos outros, semeando o amor de Deus, e o amor de nossos pais”.

Autor Desconhecido

Agradeço especialmente

A minha namorada, amiga e companheira Rafaela Bueno. Como você foi, é e será importante na minha vida. Amo você!

"No matter who you are, no matter where you go in life.

You go need somebody to stand by you!

No matter how much money you get. Or the friends you get.

You go need somebody to stand by you!"

I have you, to stand by me!

AGRADECIMENTOS

Agradeço

A **Professora Doutora Enilza Espreafico**, por abrir as portas do seu laboratório e pelo constante aprendizado. Obrigado por colaborar tanto na minha formação profissional.

A **Doutora Josane Freitas**, amiga e co-orientadora, por me ensinar como trabalhar em um laboratório de pesquisa. E pela participação direta na realização deste trabalho.

A **Silmara Banzi e Joana Souza** pelo esforço contínuo para oferecer sempre um ambiente e estrutura adequada para o desenvolvimento do meu trabalho.

Aos meus antigos e atuais amigos de trabalho, **Sarah Melo, Milene Mantovani, Guilherme Nader, Ingrid Meschede, Kamila Peronni, Milene Moraes, Valéria Valente, Cleidson Alves, Antônio Borges, Roberto Molina, Cristiano Gonçalves, Raul Torriere, Ana Paula Barreto, Denise Pimenta, Anelisa Ramão, Cibele e Bruno Ferreira**. Agradeço também a você também, quem eu esqueci. Valeu pelo auxílio e incentivo.

Aos grandes **amigos de Frutal-MG**, pelos intensos momentos de descontração durante os pequenos momentos de férias.

Aos **amigos da FMRP** pelas reuniões e discussões na tão querida fonte.

A todos os **funcionários da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto** por manterem o prédio central “de pé”, apesar de tantas reformas.

A todos os **professores do Departamento de Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**, pela transmissão de conhecimento.

A **FAPESP, Capes, CNPq, FAEPA, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Departamento de Biologia Celular e Molecular** pelo apoio financeiro e infra-estrutura para que este trabalho fosse realizado.

ÍNDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
I) INTRODUÇÃO.....	2
II) OBJETIVOS	11
III) MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
1. Análise de transcritos alternativos do gene <i>KIAA0090</i>	13
1.1. Estudo <i>in silico</i>	13
1.2. Estudos <i>in vitro</i>	13
2. RT-PCR em Tempo-Real do gene <i>KIAA0090</i>	14
2.1. Cultivo das linhagens celulares	14
2.2. Tratamento das linhagens WM278, WM1617, WM793, 1205Lu.	14
2.3. Extração de RNA total das linhagens celulares	15
2.4. Tratamento com DNase (DNA-free ^{TM} kit – Ambion)	16
2.5. Síntese de cDNA	17
2.6. PCR em Tempo Real.....	17
2.7. RT-PCR em Tempo Real dos transcritos do gene <i>KIAA0090</i> em amostras derivados de pele, nevos e tumores do tipo melanoma humanos.....	20
2.8. RT-PCR em Tempo Real dos transcritos do gene <i>KIAA0090</i> em amostras de Substância Branca, Glioblastoma e Leucemia Linfóide Aguda.....	21
2.9. Análise do efeito do silenciamento do gene <i>KIAA0090</i> sobre a viabilidade celular e a ativação da resposta ao mal-enovelamento protéico no retículo endoplasmático (UPR).....	21
IV) RESULTADOS	24
1. Análises <i>in silico</i> e <i>in vitro</i> de transcritos alternativos do gene <i>KIAA0090</i>	24
2. Análise da expressão do gene <i>KIAA0090</i> , através de RT-PCR em tempo real, em linhagens celulares de melanoma humano e amostras de tumores de pacientes.	31
3. Efeito do tratamento com as drogas inibidoras de metilação do DNA (5-AZA 2'-desoxicitidina, 5-AZA2dC) e/ou desacetilação de histonas (Tricostatina-A, TSA) sobre a expressão do gene <i>KIAA0090</i> , em células de melanoma humano – Análise por RT-PCR em tempo real.	37
4. Análise da expressão do gene <i>KIAA0090</i> , através de PCR em tempo real, em amostras provenientes de Substância Branca e Glioblastoma.....	39

5. Expressão do gene <i>KIAA0090</i> em amostras provenientes de pacientes com Leucemia Linfóide Aguda.	42
6. Efeito do silenciamento do gene <i>KIAA0090</i> sobre a viabilidade celular e ativação de UPR.....	43
V) DISCUSSÃO.....	54
1. Análises de transcritos alternativos do gene <i>KIAA0090</i>	54
2. Expressão do gene <i>KIAA0090</i> nas linhagens celulares de melanoma humano e amostras de tumores de pacientes.....	56
3. Efeito do tratamento com as drogas inibidoras de metilação do DNA e/ou desacetilação de histonas sobre a expressão do gene <i>KIAA0090</i>	65
4. Expressão do gene <i>KIAA0090</i> em Substância Branca e Glioblastoma.	67
5. Expressão do gene <i>KIAA0090</i> em pacientes com Leucemia Linfóide Aguda. ...	69
6. Efeito do silenciamento do gene <i>KIAA0090</i>	70
VI) CONCLUSÕES	77
VII) BIBLIOGRAFIA	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho esquemático mostrando as etapas da progressão do melanoma humano e as alterações moleculares associadas com a iniciação e progressão tumoral. (Adaptado de MR Zaidi <i>et al.</i> , 2008).....	6
Figura 2. Representação esquemática da proteína KIAA0090 e domínios preditos, de acordo com a RefSeq (NM_015047).....	8
Figura 3. Condições de ciclagem das reações de PCR em Tempo-Real no equipamento Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System.	18
Figura 4. Locus do gene <i>KIAA0090</i> e seus transcritos. A) Região genômica no cromossomo 1 humano onde mapeia o gene <i>KIAA0090</i> , mostrando a posição relativa e direção da transcrição do gene e seus vizinhos. B) Estrutura do cDNA que suporta a RefSeq do gene <i>KIAA0090</i> , mostrando os éxons em linhas pretas verticais conectados por cabeças de setas horizontais indicando o sentido da transcrição. C) Transcritos do gene <i>KIAA0090</i> depositados no <i>AceView</i>	26
Figura 5. Representação gráfica do alinhamento no genoma humano da RefSeq do gene KIAA0090 (NM_015047) e outras seqüências de cDNA e ESTs selecionadas por apresentarem inclusão ou exclusão de exons, com potencial de representar transcritos alternativos que gerariam formas variantes da proteína KIAA0090.	29
Figura 6. Eletroforese em gel de agarose, corado com brometo de etídeo, utilizando pares de primers que mapeiam todos os éxons presentes na RefSeq. Utilizamos como molde cDNAs das linhagens celulares Jurkat, FM308 (melanócito), WM793 e 1205Lu. Tamanhos esperados dos <i>amplicons</i> baseados na RefSeq: INÍCIO ALT. – E3 522 pb; ATG NM – E3 280 pb; E3 – E8 699 pb; E8 – E14 714 pb; E14 – E19 773 pb; E19 – E23 655 pb. As setas estão indicando os fragmentos esperados com base no transcrito referência para o gene <i>KIAA0090</i>	30
Figura 7. Perfil de expressão do gene KIAA0090 em linhagens celulares de melanoma humano. FM308 – melanócito; RGP – Fase de crescimento radial; VGP – fase de crescimento vertical. A expressão relativa foi calculada pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$, utilizando o valor de Ct do transcrito do gene <i>TBP</i> (controle endógeno) para normalização.....	31
Figura 8. Expressão do gene KIAA0090 em Pele Normal (PN1 e PN2), Melanomas Primários (MP1 e MP2) e Melanomas Metastáticos (MM1 e MM2). A expressão	

relativa foi calculada pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$, utilizando o valor de Ct do gene <i>TBP</i> (controle endógeno) para normalização.	32
Figura 9. Expressão de transcritos do gene KIAA0090 em amostras derivadas de Nevos, Melanoma Primário e Melanoma Metastático. A expressão relativa foi calculada pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$, utilizando o valor de Ct do transcrito do gene <i>TBP</i> (controle endógeno) para normalização. A estatística foi feita pela análise de variância (ANOVA), utilizando-se o procedimento PROC GLM do software SAS versão 9. Para a diferença entre os grupos foram utilizados os contrastes ortogonais.....	34
Figura 10. Expressão relativa do gene KIAA0090 em linhagens celulares de melanoma humano. A expressão relativa foi calculada pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$, utilizando o valor de Ct do transcrito do gene <i>TBP</i> (controle endógeno) para normalização.....	35
Figura 11. Análise da relação entre expressão do gene <i>KIAA0090</i> e mutação BRAFV600E. As amostras de nevus (A), melanoma primário (B) e melanoma metastático (C) apresentadas na Figura 9 foram sequenciadas para verificar presença ou ausência de mutação no proto-oncogene BRAF (BRAFV600E). A expressão relativa foi calculada pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$, utilizando o valor de Ct do transcrito do gene <i>TBP</i> (controle endógeno) para normalização.	36
Figura 12. Predição de Ilhas CpG no gene <i>KIAA0090</i> . De acordo com o programa <i>EMBOSS CpGPlot</i> o gene apresenta uma concentração de dinucleotídeos CG na região promotora.	37
Figura 13. Perfil de expressão dos transcritos do gene KIAA0090, após tratamento com as drogas 5-AZA2dC e TSA. A expressão relativa foi calculada pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$, utilizando o valor de Ct do transcrito do gene <i>TBP</i> (controle endógeno) para normalização. As amostras WM278, WM1617, WM793 e 1205Lu correspondem as amostras não tratadas usadas como referência para o tratamento com 5-AZA2dC (5 Aza) e as amostras WM278/ETOH, WM1617/ETOH, WM793/ETOH e 1205Lu/ETOH foram usadas como referência para o tratamento com 5-AZA2dC e TSA (5-AZA+TSA).	39
Figura 14. Análise in silico da relação entre expressão do gene KIAA0090 e probabilidade de sobrevivência de pacientes com glioblastoma. (Cancer Biomedical Informatics Grid TM tool - https://cma.nci.nih.gov/).....	40
Figura 15. Expressão do gene KIAA0090 em amostras provenientes de Substância Branca (SB) e Glioblastoma (GBM) humanos. A expressão relativa foi calculada pelo	

método de $2^{-\Delta\Delta CT}$, utilizando o valor de Ct do transcrito do gene <i>TBP</i> (controle endógeno) para normalização.....	41
Figura 16. Relação entre expressão do gene <i>KIAA0090</i> e sobrevida de pacientes com glioblastoma. As amostras foram divididas em dois grupos, um que possui expressão de até 1,5 vezes maior que a amostra normalizadora (Baixa Expressão) e outro com expressão acima de 1,5 vezes maior que a normalizadora (Alta Expressão).	42
Figura 17. Estudo piloto do perfil de expressão do gene <i>KIAA0090</i> em Leucemia Linfóide Aguda. Da mesma forma, a expressão relativa foi calculada pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$, utilizando o valor de Ct do transcrito do gene <i>TBP</i> (controle endógeno) para normalização.....	43
Figura 18. Análise do knockdown do gene <i>KIAA0090</i> na linhagem celular de melanoma humano da fase metastática. Os RNAs foram isolados nos tempos acima indicados, convertidos em cDNA e analisados por RT-PCR em Tempo Real. A expressão relativa foi calculada pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$, utilizando o valor de Ct do transcrito do gene <i>TBP</i> (controle endógeno) para normalização.....	44
Figura 19. Análise do knockdown da proteína <i>KIAA0090</i> por citometria de fluxo. As células foram transfectadas com o siKIAA0090 e analisadas para a marcação pelo anticorpo anti-KIAA0090 120 horas após a transfecção. O primeiro quadrante mostra as células sem a marcação pelo anticorpo (No Ab), seguido pelas células não-transfectadas (NT), transfectadas com siRNA negativo (siNEG) e células transfectadas com siKIAA0090 (siK).	45
Figura 20. Efeito do silenciamento do gene <i>KIAA0090</i> sobre a morfologia da linhagem celular de melanoma metastático WM9 48h e 120h após a transfecção com os siRNA negativo (siNEG), siKIAA0090 e células não-transfectadas (WM9 NT).	46
Figura 21. Efeito do silenciamento do gene <i>KIAA0090</i> sobre a viabilidade celular. Após transfecção com os siRNAs na linhagem celular de melanoma humano metastático WM9, as células foram analisadas para a marcação com iodeto de propídeo por citometria de fluxo. Este ensaio foi realizado duas vezes, em experimentos independentes.	47
Figura 22. Efeito do silenciamento do gene <i>KIAA0090</i> sobre a indução de apoptose. A linhagem celular de melanoma humano metastático WM9 foi transfectada com siRNA e analisadas por citometria de fluxo para marcação por Anexina V. Este resultado foi reproduzido em dois experimentos independentes.	48

Figura 23. Expressão do gene <i>GRP78</i> . Células de melanoma humano não-transfectadas, transfectadas com siRNA negativo e com siKIAA0090 foram analisadas para a expressão do gene <i>GRP78</i> nos tempos indicados. A expressão relativa foi calculada pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$, utilizando o valor de Ct do transcrito do gene <i>TBP</i> (controle endógeno) para normalização.....	49
Figura 24. Expressão do gene <i>CHOP</i> . Células de melanoma humano não-transfectadas, transfectadas com siRNA negativo e com siKIAA0090 foram analisadas para a expressão do gene <i>CHOP</i> nos tempos indicados. A expressão relativa foi calculada pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$, utilizando o valor de Ct do transcrito do gene <i>TBP</i> (controle endógeno) para normalização.....	49
Figura 25. Análise do silenciamento do gene <i>KIAA0090</i> na linhagem celular de melanoma humano da fase metastática, antes e após tratamento com as drogas Befeldina A (BFA) e MG132. Os RNAs foram isolados 48h após a transfecção antecedido ou não pelo tratamento com as drogas, convertidos em cDNA e analisados por RT-PCR em Tempo Real. A expressão relativa foi calculada pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$, utilizando o valor de Ct do transcrito do gene <i>TBP</i> (controle endógeno) para normalização.....	50
Figura 26. Análise da expressão do gene <i>GRP78</i> na linhagem celular de melanoma humano da fase metastática, antes e após tratamento com as drogas Befeldina A (BFA) e MG132. Os RNAs foram isolados 48h após a transfecção antecedido ou não pelo tratamento com as drogas, convertidos em cDNA e analisados por RT-PCR em Tempo Real. A expressão relativa foi calculada pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$, utilizando o valor de Ct do transcrito do gene <i>TBP</i> (controle endógeno) para normalização.....	51
Figura 27. Análise da expressão do gene <i>CHOP</i> na linhagem celular de melanoma humano da fase metastática, antes e após tratamento com as drogas Befeldina A (BFA) e MG132. Os RNAs foram isolados 48h após a transfecção antecedido ou não pelo tratamento com as drogas, convertidos em cDNA e analisados por RT-PCR em Tempo Real. A expressão relativa foi calculada pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$, utilizando o valor de Ct do transcrito do gene <i>TBP</i> (controle endógeno) para normalização.....	52

RESUMO

O gene *KIAA0090*, encontrado em todos os genomas eucariotos, está localizado em uma região cromossômica (1p36.13) com alta frequência de aberrações em tumores humanos. Além disso, os perfis de expressão disponíveis em bancos de dados públicos sugerem expressão alterada deste gene em muitos tumores e em resposta a diferentes tratamentos. Os objetivos deste trabalho foram investigar a possível ocorrência de múltiplos transcritos do gene *KIAA0090* em linhagens celulares de melanoma humano; avaliar o padrão de expressão do gene em diferentes linhagens celulares e amostras de tumores, por RT-PCR tempo-real; e analisar o efeito do *knockdown* deste gene sobre a viabilidade de células de melanoma. O transcrito que observamos estar expresso em linhagem de células de melanoma parece corresponder à RefSeq completa. Observamos aumento da expressão do gene *KIAA0090* em todas as linhagens celulares de melanoma humano em comparação com melanócitos. Curiosamente, entretanto, observou-se expressão significativamente maior em amostras de nevos (média = 11,02) em relação a melanoma primário (média = 2,87) ou metastático (média = 2,72) ($p < 0,01$). Não houve diferença significativa entre melanoma primário e metastático. O tratamento de células de melanoma, com um inibidor da metilação do DNA (5-Aza-2'-desoxicitidina) e/ou desacetilação de histonas (tricotatina A) levou a um aumento da expressão *KIAA0090*, sugerindo que eventos epigenéticos possam estar envolvidos na modulação da expressão do gene *KIAA0090*. Não houve diferenças significativas nos níveis de expressão do mRNA *KIAA0090* entre substância branca e glioblastoma, embora tenhamos observado uma discreta redução na taxa de sobrevida associada com maiores níveis de mRNA *KIAA0090* em glioblastomas, em estudo envolvendo amostras de 28 pacientes. Interessante que esta observação é compatível com dados de estudos de expressão gênica em larga escala onde se constata uma correlação direta entre superexpressão de *KIAA0090* e menor probabilidade de sobrevida em pacientes com glioblastoma (dados de 216 pacientes analisados - <https://cma.nci.nih.gov/cma-tcga/>). Em 31 amostras de pacientes com leucemia linfóide aguda não conseguimos encontrar qualquer relação entre a expressão do gene *KIAA0090* e idade do paciente, sexo, contagem de leucócitos, risco, imunofenótipo e resposta clínica do paciente. *Knockdown* do gene *KIAA0090* induziu morte celular em linhagem de melanoma metastático, e esta parece ser uma morte celular por apoptose, já que as células inviáveis são positivas para Anexina V. Os dados obtidos, assim como os dados depositados em bancos de dados, confirmam alteração na expressão do gene *KIAA0090* durante a progressão tumoral. Lesões pré-neoplásicas como nevos já apresentam alteração na expressão do gene em estudo, comparável com o que ocorre para oncogenes como BRAF. Assim como para outras moléculas envolvidas nas vias UPR e ERAD, *knockdown* do gene induz morte celular do tipo apoptótica. Portanto o gene *KIAA0090* parece ser muito importante em ajudar a manter a capacidade tumorigênica das células em ambientes não favoráveis.

ABSTRACT

The *KIAA0090* gene, which has been found in all eukaryotic genomes and is predicted to encode a highly conserved transmembrane protein, maps to a chromosomal region (1p36.13) with frequent aberrations in some human tumors. In addition, publicly available expression data suggest altered expression of this gene associated with many tumors and treatments. The goals of this work were to search for the occurrence of multiple *KIAA0090* transcripts in melanoma cell lines; determine the gene expression pattern in different cell lines and tumor types by real time RT-PCR; and analyze the gene *knockdown* effect on melanoma cell viability. The transcript that we found to be expressed in melanoma cell line seems to correspond to RefSeq transcript. In melanoma, increased *KIAA0090* expression was found in all human melanoma cell lines in comparison to melanocytes. Interestingly, however, we observed significantly higher expression of *KIAA0090* in nevi samples (mean value = 11,02) as compared to primary (mean value = 2,87) or metastatic (mean value = 2,72) melanoma groups ($p < 0,01$), although there was no significant difference between primary and metastatic melanoma. Treatment of melanoma cells with an inhibitor of DNA methylation (5-Aza-2'-deoxycytidine) and /or deacetylation of histones (Trichostatin A) leads to an enhancement of *KIAA0090* expression, supporting the hypothesis that epigenetic events may be involved in modulating *KIAA0090* gene expression. On the other hand, no significant differences in the *KIAA0090* mRNA expression levels were observed between white matter and glioblastoma samples, although we found slightly lower survival rates associated with high levels of *KIAA0090* mRNA in glioblastomas in a study involving 28 patient samples. Interestingly, this was compatible with database of large scale gene expression studies, which have shown a direct correlation between *KIAA0090* up-regulation and low survival rates in patients with glioblastoma (216 patients' data analyzed - <https://cma.nci.nih.gov/cma-tcga/>). In 31 samples from Acute Lymphocytic Leukemia patients, we could not find any relationship between the *KIAA0090* gene expression and patient age, sex, white blood cell count, risk, immunophenotype, response and patient's current situation. *KIAA0090 knockdown* led to an increase of cell death rate in a melanoma cell line, and since unviable cells are Annexin V positive, we postulate that they undergo apoptotic death. The data obtained, and the ones deposited in databases, confirms changes in expression of *KIAA0090* during tumor progression. Pre-neoplastic lesions such as nevi already have changes in *KIAA0090* expression, comparable to oncogene BRAF. As for other molecules involved in the UPR and ERAD pathways, *KIAA0090 knockdown* induces apoptotic cell death. Therefore, *KIAA0090* gene seems to be very important in helping maintain the tumorigenic ability of cells in not suitable environments.

I) INTRODUÇÃO

A diminuição da taxa de natalidade e aumento da expectativa de vida, observado na população mundial, tem provocado uma elevação na incidência de doenças crônico-degenerativas e neoplasias. Dados divulgados pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) mostram que de um total de 58 milhões de mortes ocorridas no mundo em 2005, o câncer foi responsável por aproximadamente 13% deste total. As maiores taxas de mortalidade entre os diferentes tipos de câncer foram pulmão (1,3 milhão), estômago (cerca de 1 milhão), fígado (662 mil), cólon (655 mil) e mama (502 mil). Cerca de 70% das mortes por câncer ocorreram em países de média ou baixa renda. Para o ano de 2020, estudo do INCA estima que o número de casos novos anuais será da ordem de 15 milhões. Já para o Brasil, estimam-se para o ano de 2010 489.270 casos novos de câncer, números válidos também para o ano seguinte. À exceção do câncer de pele não-melanoma, os cânceres mais incidentes em homens serão os de próstata e de pulmão, e em mulheres, os de mama e colo do útero.

O câncer de pele não melanoma é o mais incidente na maioria das regiões do Brasil, com um risco estimado maior para a região Sul. Já o câncer de pele do tipo melanoma possui baixa incidência (2.960 casos novos em homens e 2.970 casos novos em mulheres), porém sua letalidade é extremamente elevada. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que anualmente ocorram cerca de 132 mil casos novos desse câncer no mundo e, em termos de prevalência, seja cerca de 2,5%. Ocorreu um expressivo aumento na incidência desse tumor em populações de cor de pele branca. Nos últimos anos estamos presenciando uma melhora na sobrevida dos pacientes com este tipo de câncer, o que pode ser justificado principalmente pela evolução na forma de diagnóstico que permite uma detecção mais precoce do mesmo, mas também pela melhora na forma de tratamento. A sobrevida média estimada em cinco anos é de 73%

para os países desenvolvidos, 56% nos países em desenvolvimento e média mundial estimada de 69% (INCA – www.inca.org.br).

Os cânceres originam-se a partir de uma mutação em uma única célula passada às suas descendentes, que ao sofrerem e acumularem novas mutações ou ainda serem alvos de modificações epigenéticas passam por uma seleção natural e se tornam cancerosas. Células cancerosas proliferam desordenadamente e são capazes de escaparem do mecanismo de morte celular programada, da senescência celular replicativa e das vias de diferenciação, que normalmente bloqueariam sua capacidade de crescimento e divisão (Alberts *et al.*, 2004). O câncer progride devido a alterações genéticas e, conseqüentemente, mudanças no padrão de expressão gênica. Mutações com perda de função em genes supressores tumorais, e com ganho de função em proto-oncogenes podem liberar as células da inibição normal de crescimento e divisão celular, assim como estimular um crescimento anormal. Este é o princípio mais aceito atualmente, em relação ao processo de origem e progressão tumoral, que envolve o desenvolvimento inicial de células com potencial tumorigênico dentro do sítio primário de formação do tumor. Ao se tornarem invasivas, estas células podem intravasar em vasos sanguíneos ou linfáticos e disseminar para sítios distantes. Então podem escapar dos vasos (extravasar), e formar metástases macroscópicas (colonização) (Fidler, 2002, 2003; Fidler *et al.*, 2007; Thiery, 2002).

Os fatores que permitem que células neoplásicas no tumor primário invadam e gerem metástases são muito complexos. Alguns deles podem já estar presentes nas precursoras das células do tumor primário. Por exemplo, o programa de diferenciação de uma célula normal assim como uma variedade de alterações somáticas (mutações e alterações epigenéticas) sustentados por suas células descendentes dentro de um tumor

primário são responsáveis por afetarem a capacidade metastática destas células (Bernards and Weinberg, 2002; Ince *et al.*, 2007).

Também importante, o microambiente do estroma onde se encontra o tumor primário contribui com sinais que estimulam o desenvolvimento da capacidade invasiva (Bhowmick *et al.*, 2004). A capacidade adquirida em colonizar sítios distantes envolve alterações no fenótipo da célula, que dependem por sua vez de alterações genéticas e epigenéticas em reguladores de proliferação celular, motilidade e capacidade invasiva.

O câncer era anteriormente visto como uma massa homogênea de células que proliferam rapidamente, e as terapias eram designadas para eliminar estas células com alto potencial proliferativo. Porém estudos recentes sugeriram que estas células tumorais são heterogêneas em relação à proliferação e diferenciação, e que a taxa de proliferação pode ser um ruim indicador do seu potencial tumorigênico. Em alguns tipos de tumores, a capacidade de iniciar e manter o crescimento tumoral foram encontradas em uma pequena população de células chamadas células-tronco tumorais (*câncer stem cells* – CSCs) (Al-Hajj *et al.*, 2004; Reya *et al.*, 2001; Wicha *et al.*, 2006). Estas células possuem a capacidade de auto-renovação e dão origem a uma variedade de células proliferativas e diferenciadas que compõem a massa tumoral. São frequentemente quiescentes e desta forma não afetadas por terapias que atingem células altamente proliferativas. Aumento de expressão de transportadores que eliminam agentes quimioterápicos (Donnenberg and Donnenberg, 2005) e uma capacidade aumentada em reparar danos no DNA (Bao *et al.*, 2006a) podem contribuir para a capacidade destas células em sobreviver aos modos convencionais de terapias.

A hierarquia de células-tronco tumorais foi sugerida existir para o melanoma, onde células primitivas auto-renováveis capazes de iniciar a tumorigênese originam células altamente proliferativas e mais diferenciadas que constituem o centro da massa

tumoral (Susan and Herlyn., 2008). Células *stem-like* foram propagadas, tanto em células de melanoma em cultivo quanto em isolados clínicos de tumores de pacientes, como células esféricas não aderentes capazes de auto-renovação, diferenciação em várias linhagens mesenquimais e iniciação de tumores em modelos de xenotransplante com um pequeno número de células (Fang *et al.*, 2005). Também apresentaram características de células-tronco, como tamanho da população, marcadores de células-tronco ABCG2, CD133 e nestina (Dou *et al.*, 2007; Grichnik *et al.*, 2006; Klein *et al.*, 2007; Monzani *et al.*, 2007).

O modelo clássico de progressão do melanoma humano, assim como ocorre em alguns modelos de camundongos, ocorre a partir de um nevo benigno. Este é formado por uma população de melanócitos que proliferaram de maneira desorganizada e forma uma lesão hiperplásica, geralmente em resposta a radiação UV, que não progride devido à senescência celular (Mooi and Peeper, 2006; Gray-Schopfer *et al.*, 2006). Uma vez vencida essa barreira proliferativa, este nevo se torna displásico e pode progredir para um estágio de espalhamento superficial, chamada Fase de Crescimento Radial (RGP), que é confinado à epiderme e possui baixo potencial invasivo. Posteriormente estas células RGP podem adquirir a capacidade de invadir a derme rompendo a membrana basal, etapa esta chamada de Fase de Crescimento Vertical (VGP), e formar metástases (Miller and Mihm, 2006). Dados clínicos sugerem que nem todos os melanomas se originam desta forma, desde que já foram observados casos de doença metastática sem evidente lesão primária. A Figura 1 mostra um desenho esquemático das etapas da progressão tumoral do melanoma humano.

Vários genes de susceptibilidade ao melanoma já foram descritos em parentes afetados pela doença e validados em modelos animais. Entre eles foram descritas mutações herdadas nos genes CDKN2A (Hocker and Tsao, 2007) e CDK4 (Sotillo *et al.*, 2001), associadas com o melanoma. Mutações espontâneas foram observadas em vários outros genes e acreditam estar envolvidas na progressão do melanoma em diferentes estágios, como por exemplo, BRAF (Davies *et al.*, 2002; Hocker and Tsao, 2007), NRAS (Hocker and Tsao, 2007) e TP53 (Hussein *et al.*, 2003). Modulação epigenética da expressão gênica em melanomas também é importante, e muitos genes são desregulados por metilação do DNA assim como por modificações em histonas (Hoon *et al.*, 2004; Gallagher *et al.*, 2005; Muthusamy *et al.*, 2006; Rothhammer and Bosserhoff, 2007). Entre os genes que são silenciados por metilação do DNA em

melanomas podemos citar CDKN2A, PTEN, APC e APAF1 (de Snoo and Hayward, 2005; Muthusamy *et al.*, 2006). Expressão aumentada do gene MAGE (*melanoma antigen gene*) em melanoma está associada à hipometilação (van Doorn *et al.*, 2005). Outros genes envolvidos em modificações de histonas estão desregulados em melanoma, entre eles HDAC1, HDAC2, HDAC3 e Sirtuin 1 (Bandyopadhyay *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005).

O recente seqüenciamento do genoma humano permitiu e permitirá a descoberta e caracterização de genes que são críticos no desenvolvimento e manutenção do câncer. A identificação de genes e vias envolvidas nesta progressão aumentará nosso entendimento da biologia deste processo e ainda poderá identificar novos alvos para diagnóstico precoce e tratamento da doença. Muitos estudos em biologia celular e molecular têm objetivos dirigidos em compreender os genes e mecanismos que levam à formação do câncer. Os perfis de expressão gênica estão sendo usados atualmente para a subclassificação de alguns tipos de tumores (Garnis, 2004).

O gene anotado como *KIAA0090*, localizado no cromossomo 1 humano (1p36.13), possui 4253 pb divididos em 23 éxons segundo a única RefSeq anotada (NM_015047) e codifica uma proteína de 993 resíduos de aminoácidos. É encontrado em todas as espécies de eucariotos, cuja alta conservação sugere algum papel importante em um mecanismo celular básico. De acordo com o programa *PSORT II* (<http://psort.nibb.ac.jp/form2.html>) a proteína codificada de acordo com a RefSeq possui alguns domínios preditos (Figura 2): (1) um peptídeo sinal (SP) na porção amino, que define se a proteína é secretada ou é integral de membrana; (2) ainda na porção N-terminal apresenta um sinal de endereçamento para mitocôndria (Mts), importante no direcionamento de pré-proteínas para a mitocôndria; (3) Repetições WD40-like, indicativo de participação na transdução de sinais, regulação da transcrição, controle do

ciclo celular e apoptose; (4) similaridade, dentro do domínio WD40-like (β -propeller), com enzimas que utilizam pyrrolo-quinoline quinone como grupo prostético; (5) sítio de fosforilação de tirosina (Y) e uma região rica em serina (SRR) que são sítios de fosforilação e glicosilação, respectivamente; (6) Zíper de Leucina (LZ), que é uma sequência específica de ligação ao DNA envolvida em dimerização de proteínas, regulação da transcrição DNA-dependente; (7) Sinal de Localização Nuclear (NLS) usado para confinar a proteína ao núcleo celular através do poro nuclear; (8) DUF1620, domínio de função desconhecida; (9) Motif Dileucina (LL), envolvido no endereçamento para *trans*-Golgi, distribuição para lisossomo e internalização de proteínas; (10) Domínio Transmembrana (TM) α -hélice ou folha- β no interior da membrana.

Dados obtidos por nosso grupo mostram que a superexpressão da proteína KIAA0090 em fusão com a EGFP (*Green fluorescent protein*) leva a diferentes padrões de distribuição da proteína de fusão, dependendo da posição da proteína em relação à EGFP, tanto em células de melanoma humano quanto melanoma murino. A construção EGFP-KIAA0090 quando expressa em diferentes linhagens de melanoma leva a um forte acúmulo perinuclear da proteína de fusão, o que parece estar associado a uma desorganização da rede de microtúbulos e do Complexo de Golgi e, mais

surpreendentemente, a uma agregação das mitocôndrias na mesma região de concentração da proteína de fusão. Já a proteína KIAA0090-EGFP mostrou intensa co-localização com um marcador de Retículo Endoplasmático, a calreticulina, o que não ocorre para a outra construção. Apesar das duas proteínas de fusão terem apresentado padrões de distribuição diferentes, indicando enovelamento e/ou endereçamento incorretos, as duas proteínas de fusão interferem na viabilidade celular, e resultados preliminares indicam que a morte observada possa ser do tipo apoptótica, uma vez que as células inviáveis são positivas para Anexina V. Além disso, a morte é parcialmente prevenida (30 a 60%) por tratamento com inibidor de caspase 3, o que sugere contribuição da via proteolítica central da apoptose nesse tipo de morte desencadeada por superexpressão de KIAA0090. Ainda, experimentos de *Western blot* demonstram a presença de múltiplos polipeptídeos reconhecidos pelo anticorpo α -KIAA0090, com propriedades distintas de solubilização, em frações subcelulares extraídas de diferentes tipos de células. Esses dados sugerem a ocorrência de isoformas alternativas da proteína KIAA0090 sendo expressas em diferentes tipos celulares e com distribuição subcelular variável (dados do nosso grupo ainda não publicados).

De acordo com dados da literatura, e com os dados obtidos em nosso laboratório existem evidências do envolvimento do gene *KIAA0090* com o desenvolvimento tumoral, não só em melanoma como em diversos outros cânceres. Sendo assim, um estudo detalhado desse gene torna-se de extrema importância para o entendimento do seu papel nos mecanismos moleculares envolvidos na progressão tumoral.

II) OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é verificar a existência de transcritos alternativos do gene *KIAA0090* em linhagens celulares de melanócitos e melanoma humano, e analisar o papel desta proteína em funções relacionadas ao processo de tumorigênese, principalmente apoptose e proliferação celular.

Objetivos específicos:

1. Determinar a estrutura de transcritos do gene *KIAA0090*, tanto nas linhagens celulares de melanoma quanto em melanócitos normais.
2. Avaliar a expressão diferencial do gene *KIAA0090* no painel de linhagens celulares de melanoma humano, das diferentes fases da progressão tumoral, disponíveis em nosso laboratório, assim como em outras linhagens tumorais ou tumores de pacientes.
3. Avaliar o efeito do *knockdown* do gene *KIAA0090* sobre a viabilidade de linhagens celulares de melanoma humano.

III) MATERIAIS E MÉTODOS

1. Análise de transcritos alternativos do gene *KIAA0090*

1.1. Estudo *in silico*

Para analisar a presença de transcritos alternativos do gene em estudo, realizamos uma análise *in silico* utilizando a plataforma *AceView* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/index.html>), a qual oferece uma representação de sequências acuradas e não-redundantes de todos os mRNAs depositados em bancos de dados (GenBank, dbEST e Trace). O programa alinha milhões de sequências de cDNAs disponíveis nos bancos de dados contra a sequência do genoma humano, posteriormente filtra os clones de cDNAs por qualidade e agrupa as sequências com qualidade maior de 90% nos genes. As sequências redundantes no GenBank, dbEST e Trace são então sobrepostas, sendo as sequências resultantes fixadas com alta qualidade ao genoma humano. Os genes e variantes alternativas são analisados em termos de expressão, estrutura íntron-éxon, regulação e relação com genes vizinhos. Os produtos protéicos são analisados para presença de *motifs*, família de proteínas relacionadas, conservação e evolução, homologia e sinais de localização subcelular. Ainda, genes não-codificadores são indicados. Após este estudo foram selecionados os transcritos que apresentavam evidências de serem completos em suas extremidades 5' e 3', e ainda codificarem para proteínas.

1.2. Estudos *in vitro*

As sequências obtidas do alinhamento foram analisadas para presença ou ausência de éxons alternativos, que podem indicar isoformas da proteína. Alguns pares de primers já existentes no laboratório, e ainda novos pares foram desenhados (*Oligo Explorer Software*) para caracterizarmos os possíveis transcritos em melanócitos e linhagens celulares de melanoma humano. O cultivo celular, extração de RNA total e síntese de

cDNA foram realizados conforme protocolos descritos abaixo. Os cDNAs das diferentes linhagens celulares foram utilizados como molde para reações de PCR convencional no termociclador *GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)*, utilizando a enzima *Taq DNA Polymerase (Fermentas)*. As condições de ciclagem foram as seguintes: 94°C 3 minutos; 40 ciclos de 94°C 45s / temperatura de anelamento 45s / 72°C 1min; e um período adicional de extensão 72°C 7 min. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo.

2. RT-PCR em Tempo-Real do gene *KIAA0090*

2.1. Cultivo das linhagens celulares

As células de melanoma humano correspondentes à Fase de Crescimento Radial (WM35, WM1552, WM1789), Fase de Crescimento Vertical (WM278, WM793 e WM902) e Metastática (WM9, WM852, WM1617, 1205Lu) foram cultivadas em meio TU 2% (MCDB-153 80%, Leibovitz's L-15 20%, Insulina 5µg/mL e CaCl₂ 1,6mM) suplementado com 2% soro fetal bovino (SFB) em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C. Amostra de cDNA de melanócitos, extraídos de prepúcio de neonatos, (FM308) e outras linhagens celulares de melanoma humano (SK-Mel 19, SK-Mel 28, SK-Mel 29, SK-Mel 94, UACC62, G361, SK-Mel 103, SK-Mel 147, SK-Mel 173, UACC257) foram gentilmente cedidas pela Prof. Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler do Departamento de Análises Clínicas e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

2.2. Tratamento das linhagens WM278, WM1617, WM793, 1205Lu.

As linhagens celulares WM278, WM1617, WM793 e 1205Lu foram cultivadas em meio TU 2% até atingirem confluência de 80%, quando foram tratadas com 3 µM da droga inibidora de metilação do DNA 5-aza-2'-desoxicitidina (5'-AZA) por 96h,

trocando-se o meio de cultura a cada 24h. Após esse período procedeu-se com a extração de RNA.

Em uma segunda abordagem, estas mesmas linhagens celulares foram cultivadas em meio TU 2% até atingirem confluência de 80%, quando foram tratadas com 3 μ M da droga 5-aza-2'-desoxicitidina por 96h, trocando-se o meio de cultura a cada 24h, e após 96h adicionamos juntamente com a droga 5-aza-2'-desoxicitidina, 500nM da droga inibidora de deacetilação de histonas Tricostatina A (TSA), mantendo as células em cultura por mais 24h. Após esse período procedeu-se com a extração de RNA.

Para controle, tratamos estas linhagens celulares com 0,1% de etanol, solvente da droga TSA, concentração esta representando a quantidade final de etanol no meio de cultura quando administramos a droga. As linhagens WM278, WM1617, WM793 e 1205Lu foram cultivadas em meio TU 2% até atingirem confluência de 80%. Após este período trocamos o meio de cultura a cada 24h durante um período de cultivo de 96h. Adicionamos então 0,1% de etanol, mantendo as células em cultura por mais 24hs, quando procedemos com a extração de RNA.

2.3.Extração de RNA total das linhagens celulares

A extração de RNA total foi realizada utilizando o reagente Trizol® (*Invitrogen, Life Technologies*). O meio de cultura foi retirado do frasco e foram acrescentados 1,0 mL de Trizol® para cada 10 cm² de diâmetro da placa de cultivo, no caso de células aderentes. Para células que crescem em suspensão, após centrifugação e descarte do sobrenadante, foram adicionados 1,0 mL de Trizol® para cada 10⁷ células. As células foram lisadas e o material foi transferido para um tubo de 15 mL, ao qual foram acrescentados 0,2 mL de clorofórmio para cada 1mL de Trizol® utilizado, agitando-se vigorosamente por 15 segundos. Após incubação à temperatura ambiente por 5 minutos, o material foi centrifugado a 6500xg por 5 minutos 4°C. O sobrenadante incolor foi transferido para

outro tubo, ao qual foi adicionado igual volume de fenol hidratado e de clorofórmio isoamílico (49:1) agitando-se vigorosamente por 15 segundos. Procedeu-se com uma centrifugação a 6500xg por 5 minutos 4°C. O sobrenadante incolor foi transferido para outro tubo de centrifuga, adicionando-se igual volume de isopropanol gelado. O material foi mantido no freezer a -20°C por 18h, para precipitação do RNA. Em seguida, o material foi centrifugado a 6500 xg por 40 minutos 4°C. Após descartar o sobrenadante, acrescentou-se 2,0 mL de etanol 75% ao pellet e o material foi centrifugado a 6500 xg por 30 minutos; esse passo foi repetido mais uma vez para garantir que o RNA estivesse livre de contaminação com os reagentes usados na extração. Após a segunda lavagem com etanol 75%, o sobrenadante foi desprezado e o tubo ficou sobre a bancada aberto por alguns minutos para a secagem do pellet. O RNA foi diluído em 30µL de água tratada com DEPC (Dietil pirocarbonato – Sigma), sendo armazenado a - 80°C. A quantificação do RNA foi feita no Biophotometer (Eppendorf).

2.4. Tratamento com DNase (*DNA-free^{TM} kit* – Ambion)

Usamos duas diferentes condições dependendo da quantidade de DNA contaminante e da concentração de ácido nucléico na amostra: tratamento de rotina para ≤ 200 µg de ácido nucléico por mL e tratamento rigoroso para > 200 µg de ácido nucléico por mL.

No tratamento de rotina, usamos 1µL rDNase I (2 U) para 5µg de RNA total em tampão DNase I 10X em 20 µL de reação por 30 minutos a 37°C. Para RNAs com mais de 200 µg de ácido nucléico por mL, as amostras foram diluídas para 10 µg de ácido nucléico por 50 µL antes da adição do tampão de DNase I 10X e rDNase. Neste caso adicionamos metade da rDNase I inicialmente, incubamos por 30 minutos a 37°C , e depois adicionamos o restante da enzima e incubamos por outros 30 minutos 37°C.

Após este período foram adicionados 2 µL do reagente inativador e incubamos por 2 minutos a temperatura ambiente. Seguimos com uma centrifugação a 10.000xg por 1 minuto e 30 segundos. O RNA tratado presente no sobrenadante foi transferido para um tubo novo.

2.5.Síntese de cDNA

Para síntese de cDNA utilizamos o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems)*. 1µg de RNA total tratado com DNase (descrito no item anterior) foi transferido para um tubo de microcentrífuga e o volume ajustado para 10µL com H₂O tratada com DEPC. Adicionamos 2 µL do Tampão de Reação (10X) da Transcriptase Reversa, 0,8 µL do mix de dNTPs (25X), 1 µL de oligo (dT) 25 (250 ng/µL), 1 µL de inibidor de RNase, 2 µL de random primer (10X) e 1 µL da enzima *Multiscrib RT*, num volume final de 20µL. A reação foi incubada a 25°C por 10 minutos, 37°C por 2 horas, após isso a enzima foi inativada a 85°C por 5 segundos.

2.6.PCR em Tempo Real

Os experimentos para análise de expressão foram realizados no equipamento *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System*, utilizando o kit *Power SYBR® Green PCR Master Mix 2X (Applied Biosystems)*. Os primers foram gerados para um *amplicon* entre 80-150pb, na intenção de obter maior especificidade. Inicialmente foi desenhado um par de primers para o gene *KIAA0090* entre éxons 16 e 17, região bem conservada entre os possíveis transcritos alternativos depositados em bancos de dados. A sequência para estes *primers* são as seguintes:

KIAA0090 E16-17:

S – 5' GATCAAGACTACGCCAAGGTG 3'

AS – 5' GAAGAAGATGGAAGGGGCAAG 3'

Utilizamos como controle endógeno a quantificação do transcrito do gene *TBP* (*TATA Box Binding Protein*), um fator de transcrição geral que age no centro de um

fator multiprotéico de ligação ao DNA, TFIID. A ligação de TFIID ao “TATA Box” é o passo inicial da formação do complexo de pré-iniciação da transcrição, ativando genes eucariotos transcritos pela RNA polimerase II. Este gene foi escolhido por apresentar uma expressão similar ao gene alvo na maioria das amostras analisadas, além de apresentar uma expressão pouco variável entre as amostras.

Os experimentos iniciaram-se com uma reação de PCR em tempo real com três diferentes diluições dos primers, para testarmos a melhor concentração a ser utilizada na reação. Assim, fizemos um mix dos cDNAs das linhagens celulares WM278 (melanoma vertical) e WM1617 (melanoma metastático) diluído 20 vezes e adicionamos 2 µL como DNA molde para a reação. Utilizamos três diferentes concentrações finais de cada primer nas reações, 200nM, 400nM e 600nM. Aos 2µL do DNA molde adicionamos mais 2µL de cada primer e 6µL de *Power SYBRGreen PCR Master Mix (2X)*. Uma reação para cada diferente concentração final de primer foi realizada. As reações foram submetidas às condições de ciclagem mostradas na figura abaixo (Figura 3).

O primeiro estágio de incubação a 50°C por 2 minutos é adicionado ao programa antes da ativação da DNA polimerase. Durante este estágio, a enzima Uracil N-

glicosilase (UNG) remove uracilas de dUMP incorporados em qualquer molécula contaminante, deixando sítios apirimídicos. Durante o próximo passo de ativação da DNA Polimerase (10 minutos a 95°C), a enzima UNG é inativada e moléculas contaminantes são destruídas. Durante os passos subsequentes (40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos / anelamento dos primers e extensão a 60°C por 1 minuto – estágios 2 e 3), apenas ácidos nucleicos alvos, e não contaminantes, serão amplificados.

Após a reação de amplificação, adicionamos uma curva de dissociação, no intuito de checarmos a ocorrência de dímeros de primers ou ainda a especificidade para um único “*amplicon*”. O estágio de dissociação (estágio 4) foi realizado com um ciclo de 95°C por 15 segundos (desnaturação), 60°C por 20 segundos (anelamento e extensão) e 95°C por 15 segundos.

Posteriormente avaliamos a eficiência da reação usando como DNA molde 2 µL de um mix de cDNA das linhagens WM278 e WM1617 em diferentes diluições, 1:20, 1:200, 1:2000 e 1:20000. Neste experimento foram usados 2 µL de cada primer na melhor concentração obtida do experimento anterior, neste caso 600nM. Adicionamos ainda 6 µL de *Power SYBRGreen PCR Master Mix (2X)*. As mesmas condições de corrida mostradas na Figura 3 foram usadas nestes experimentos.

Após padronização das concentrações de primers e cDNAs para a análise de expressão de transcritos do gene *KIAA0090*, realizamos os experimentos utilizando as melhores concentrações de DNA molde para cada conjunto de amostras analisadas. Em todos os experimentos utilizamos 2 µL de cDNA, 2 µL de cada primer para uma concentração final na reação de 600nM, e 6 µL de *Power SYBRGreen PCR Master Mix (2X)*. Novamente, as mesmas condições de ciclagem foram utilizadas nestes experimentos.

Os dados obtidos foram analisados pelos valores do *Cycle Threshold* (*Ct*), que foi convertido em expressão relativa de acordo com o método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak *et al.*, 2001). Utilizamos os valores de *Ct* dos transcritos do gene *TBP* (controle endógeno) para normalização.

2.7.RT-PCR em Tempo Real dos transcritos do gene *KIAA0090* em amostras derivadas de pele, nevos e tumores do tipo melanoma humanos.

Procedemos com um ensaio piloto para analisarmos a expressão dos transcritos do gene em estudo em amostras de tumores do tipo melanoma e amostras de pele humanas, obtidas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Obtivemos duas amostras de pele normal (PN1 e PN2), duas amostras de melanoma em fase de progressão vertical (MP1 e MP2) e duas amostras de melanoma metastático (MM1 e MM2).

Ainda, em colaboração com o Laboratório de Oncologia Experimental da Faculdade de Medicina de São Paulo - USP sob responsabilidade do Prof. Dr. Roger Chammas, e com o Grupo de Melanoma do Hospital AC Camargo, obtivemos amostras de cDNAs obtidas a partir de amostras de pacientes. Foram cedidas 19 amostras de Nevos (N01, N05, N06, N10, N11, N13, N15, N17, N22, N23, N24, N25, N27, N29, N31, N32, N35, N36, N38), 20 amostras de Melanoma Primário (P14, P20, P28, P38, P49, P51, P53, P54, P55, P56, P57, P62, P72, P91, P95, P103, P114, P115, P119, P129, P887, P889), 18 amostras de Melanoma Metastático (M30, M50, M79, M80, M81, M82, M83, M93, M96, M105, M106, M108, M113, M116, M117, M127), além de uma amostra de cDNA de queratinócito que utilizamos como calibrador para este conjunto de amostras.

Neste caso, utilizamos cDNA diluído 20 vezes como DNA molde para a reação, utilizando as mesmas quantidades de reagentes descritos anteriormente. Da mesma

forma, a análise dos dados obtidos foi realizada utilizando os valores do *Cycle Threshold* (*Ct*), convertido em expressão relativa de acordo com o método de $2^{-\Delta\Delta CT}$. Novamente utilizamos os valores de *Ct* dos transcritos do gene *TBP* (controle endógeno) para normalização.

2.8.RT-PCR em Tempo Real dos transcritos do gene *KIAA0090* em amostras de Substância Branca, Glioblastoma e Leucemia Linfóide Aguda.

Para avaliarmos o comportamento do gene em estudo em outros tipos de cânceres humanos, obtivemos em colaboração com o Dra. Valéria Valente, pós-doutoranda no laboratório do Prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Júnior, amostras de cDNAs derivados de biópsias de Substância Branca e Glioblastoma. Realizamos também um estudo piloto em pacientes com Leucemia Linfóide Aguda (LLA). Obtivemos amostras de cDNAs provenientes de pacientes com LLA atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone do Departamento de Puericultura e Pediatria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

A análise dos dados obtidos foi realizada utilizando os valores do *Cycle Threshold* (*Ct*), que foi convertido em expressão relativa de acordo com o método de $2^{-\Delta\Delta CT}$. Os valores de *Ct* dos transcritos do gene *TBP* (controle endógeno) foram utilizados para normalização.

2.9.Análise do efeito do silenciamento do gene *KIAA0090* sobre a viabilidade celular e a ativação da resposta ao mal-enovelamento protéico no retículo endoplasmático (UPR).

Para promover o *knockdown* do gene *KIAA0090* utilizamos oligonucleotídeos sintéticos de RNA (*Invitrogen*), para o efeito de interferência (RNAi). Estes oligonucleotídeos foram transfectados utilizando o kit *Hiperfect Transfection Reagent*

(*Qiagen*), segundo protocolo descrito comercialmente. Para análise do efeito do silenciamento sobre a viabilidade celular utilizamos a linhagem celular WM9 (melanoma metastático), que foi plaqueada em poços de 6-*wells* 24 horas antes da transfecção. Os RNAs foram isolados nos tempos de 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas após a transfecção, procedendo com a síntese de cDNA e análise por RT-PCR em Tempo-Real, seguindo os mesmos protocolos descritos anteriormente, no intuito de verificar o silenciamento. Análise de viabilidade celular através da marcação com iodeto de propídeo (PI) e leitura em citômetro de fluxo foi realizada nos períodos de 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas após a transfecção. Ainda, ensaio com Anexina V (*BD Bioscience*) e leitura em citômetro de fluxo foi realizado nos períodos de 72, 96, 120 e 144 horas após transfecção. Para verificar a ativação da resposta ao mal-enovelamento protéico no retículo endoplasmático (UPR), as células, 40 horas após a transfecção com siRNA, foram tratadas com 5µg/mL de Brefeldina A e 1µM de MG132 por 8 horas, seguindo com isolamento de RNA, síntese de cDNA. Analisamos a expressão de duas moléculas chave na ativação desta resposta, GRP78 e CHOP por RT PCR em tempo-real, conforme descrito acima.

IV) RESULTADOS

1. Análises *in silico* e *in vitro* de transcritos alternativos do gene *KIAA0090*

O gene *KIAA0090* está localizado em uma região associada a freqüentes alterações em tumores humanos, incluindo melanoma. Nesta mesma região encontramos outros genes vizinhos. *CAPZB* (*actin filament capping protein muscle Z-line, beta*), *UBR4* (*E3 ubiquitin-protein ligase*), duas proteínas hipotéticas (LOC100288987 e LOC644083) sem caracterização e *PQLC2* (*PQ loop repeat containing 2*). Ainda nesta região estão localizados três membros da família 7 de aldo-ceto redutases (*AKR7*), *MRT04* (*mRNA turnover 4 homolog - S. cerevisiae*). A posição do gene *KIAA0090* e seus vizinhos estão mostrados na Figura 4A.

Como descrito anteriormente, este gene possui 4253 pb divididos em 23 éxons, segundo a única RefSeq anotada (Figura 4B). Analisando os dados do *AceView* apresentados na Figura 4C, e ainda o resultado da análise de transcritos que mapeiam na região do gene em estudo através da ferramenta disponibilizada no *Human BLAT Search* (<http://genome.ucsc.edu/index.html>) mostrado na Figura 5, selecionamos os transcritos que apresentavam-se completos em suas extremidades 5' e 3', listados na Tabela I. O transcrito “a [NM]” (Figura 4C) possui dois sítios alternativos de poliadenilação e a proteína predita, anotada usando como metionina um códon de iniciação CTG (*Kozak-compatible*), desta forma acrescentando 88 aminoácidos N-terminal ao primeiro ATG, possui 1080 aminoácidos (120.6 kDa) e é predita localizar na membrana. Caso seja considerado que a tradução ocorra de forma canônica, a proteína gerada a partir deste transcrito corresponde exatamente à sequência obtida a partir da tradução do transcrito depositado como RefSeq [NM]. O transcrito identificado como “b” possui uma região 3'UTR muito longa e a proteína predita possui 992 aminoácidos (111.7kDa), diferente do esperado para a RefSeq que possui 993 aminoácidos, podendo estar localizada também na

membrana. O transcrito “c” difere do anterior apenas na sua região 3’ UTR. O transcrito “d” codifica 971 aminoácidos, possui quatro sítios diferentes de poliadenilação e não possui o éxon 3 (65 bp) presente na RefSeq. Já os transcritos “m”, “o”, “p” codificam 75 aminoácidos e a proteína é predita ser secretada ou extracelular. Os transcritos “o” e “p” diferem apenas em suas extremidades 5’UTR e 3’UTR, codificando a mesma sequência de aminoácidos, que é diferente daquela codificada por “m”. O transcrito “i”, apesar de não apresentar uma extremidade 5’ capeada e uma cauda poli A, foi selecionado para análise devido à possibilidade de ser alvo de “*nonsense mediated mRNA decay*”.

Tabela I – Transcritos do *locus* do gene *KIAA0090* definidos por análises de bioinformática.

Transcrito (AceView)	Número de clones	Tamanho (pb)	Número de éxons	5' UTR	3' UTR	Tecidos*	Proteína predita (aa)	Localização predita
a	186	4476	23	capeada	poli-A validada	testículo, cérebro, pulmão, hipocampo, placenta cerebelo, tálamo, traquéia, amígdala, medula óssea, língua, timo	1086	ER (44%), Golgi (33%), membrana plasmática (22%)
b	12	6627	23	clones agregados	poli-A validada	cérebro, glioblastoma, fígado, baço, glândula mamária	992	ER (44%), Golgi (33%), membrana plasmática (22%)
c	35	5416	23	capeada	3' stop	paratireóide normal e tumoral, célula-tronco embrionária, placenta, testículo	992	ER (44%), Golgi (33%), membrana plasmática (22%)
d	152	4254	22	capeada	poli-A validada	pâncreas, células tumorais germinativas, pulmão placenta, âmnio normal, fígado, baço, testículo, cérebro, condrossarcoma, carcinoma epitelioide, rim, adenocarcinoma osso, mama, cólon, carcinoma ductal, ovário, tireóide	971	ER (44%), Golgi (33%), membrana plasmática (22%)
m	3	582	2	capeada	3' stop	cérebro, nasofaringe normal, timo. #	75	secretada (55%), vacúolos (22%), mitocôndria (11%), ER (11%)
o	20	4839	3	capeada	3' stop	cérebro, cólon	75	secretada (77%), vacúolos (11%), ER (11%)
i	1	583	1 ⁺	clones agregados	3' stop	medula óssea	134	citoplasma (34%), mitocôndria (26%), núcleo (13%), ER (13%), secretada (8%), vacúolos (4%)
p	5	2164	2	capeada	3' stop	útero, olho#, testículo#	75	secretada (77%), vacúolos (11%), ER (11%)

*suportado por mais de 2 clones

ER – retículo endoplasmático

apenas 1 clone

+ possível alvo de “*nonsense mediated mRNA decay*”

Após este estudo *in silico* dos transcritos que mapeiam na região do gene *KIAA0090*, desenhamos seis pares de primers para amplificação e verificação da presença ou ausência dos 23 éxons que compõem a RefSeq do gene. Utilizamos o primeiro par de primers (INÍCIO ALT. – E3) para avaliarmos se realmente ocorria um início alternativo de transcrição baseado em um códon não ATG (*Kozak-compatible*), como descrito no caso do transcrito “a” da Figura 4C. Este transcrito possui uma adição de nucleotídeos na porção 5’ do transcrito referência, e este par de primers foi

desenhado para anelar justamente nessa região adicional. Não detectamos a presença deste transcrito alternativo, que adicionaria 88 aminoácidos na proteína codificada, em nenhuma das células analisadas: uma leucêmica (Jurkat), uma cultura primária de melanócito (FM308) e duas linhagens de melanoma humano, WM793 vertical e 1205Lu metastática (Figura 6). Com o próximo par de primers (ATG NM – E3), verificamos que em todas as amostras analisadas, o transcrito que possui o início correto da tradução, segundo a RefSeq, está expresso e possui o tamanho de *amplicon* esperado (280 pb). Porém, na linhagem celular Jurkat, encontramos outros dois *amplicons* maiores, apesar do transcrito esperado para a RefSeq ser expresso em quantidades significativamente maiores. Estes dois *amplicons* maiores parecem estar presentes também nas linhagens celulares WM793 e 1205Lu, porém em baixa abundância. De acordo com os dados disponíveis no *AceView*, não possui nenhum transcrito alternativo que explique esta aparente adição de algum éxon alternativo à RefSeq. Após este achado, resolvemos ampliar o estudo *in silico* para tentarmos encontrar transcritos que mapeiam na região do gene de interesse e que pudessem explicar a ocorrência destes transcritos maiores. Utilizando a Ferramenta *Human Blat UCSC Genome Browser* (<http://www.ncrna.org>) encontramos outros transcritos que mapeiam nesta região e não estavam representados no *AceView*, mostrados na Figura 5.

Os dados mostrados na Figura 6 mostram os resultados dos experimentos de amplificação dos fragmentos de cDNA do gene *KIAA0090*. Utilizando um par de primers entre éxons três e oito, encontramos um *amplicon* com tamanho esperado para o transcrito referência (699 pb) nas amostras de melanócito e melanoma, o que não observamos na amostra de Jurkat, na qual não obtivemos nenhum produto de PCR. Este poderia ser o caso do transcrito identificado como “d” de acordo com o *AceView* (AK_075563 na Figura 5), que apresenta uma exclusão do éxon três, já que seria o local de anelamento do primer sense. No entanto, se o transcrito detectado não possuísse o éxon três, não ocorreria amplificação com o par de primers anterior (ATG NM – E3). Este experimento está sendo repetido para tentarmos esclarecer qual transcrito está expresso na linhagem celular Jurkat.

Utilizando os dois pares de primers seguintes, E8 – E14 e E14 – E19, amplificamos um fragmento de tamanho esperado para a RefSeq (714 pb e 773 pb respectivamente) em todas as amostras analisadas. No caso do último conjunto de

primers, E19 – E23, novamente encontramos um fragmento de tamanho esperado (655 pb), com exceção novamente da amostra de cDNA de Jurkat. A partir destes resultados podemos concluir que as linhagens celulares de melanoma humano e melanócitos expressam o transcrito que é considerado referência para o gene *KIAA0090*, já que todos os 23 éxons parecem estar presentes neste transcrito.

Figura 6. Eletroforese em gel de agarose, corado com brometo de etídeo, utilizando pares de primers que mapeiam todos os éxons presentes na RefSeq. Utilizamos como molde cDNAs das linhagens celulares Jurkat, FM308 (melanócito), WM793 e 1205Lu. Tamanhos esperados dos *amplicons* baseados na RefSeq: INÍCIO ALT. – E3 522 pb; ATG NM – E3 280 pb; E3 – E8 699 pb; E8 – E14 714 pb; E14 – E19 773 pb; E19 – E23 655 pb. As setas estão indicando os fragmentos esperados com base no transcrito referência para o gene *KIAA0090*.

2. Análise da expressão do gene *KIAA0090*, através de RT-PCR em tempo real, em linhagens celulares de melanoma humano e amostras de tumores de pacientes.

Como mostrado na Figura 7, observamos maior expressão do gene *KIAA0090* em todas as linhagens celulares de melanoma humano analisadas, quando comparadas com a expressão em uma amostra de melanócito (FM308). Apesar da heterogeneidade característica de células tumorais, verificamos uma tendência de aumento de expressão nas células que representam as fases mais avançadas da progressão do melanoma humano. Se considerarmos duas linhagens celulares, WM793 de fase vertical e 1205Lu, célula derivada de uma metástase induzida em camundongo pela inoculação da primeira, observamos uma indução significativa na transcrição do gene em estudo.

Continuando a avaliação do papel deste gene na progressão do melanoma humano, obtivemos cDNAs de duas amostras de pele normal, duas de melanoma primário e duas de melanoma metastático, em parceria com outro projeto do nosso laboratório, sob responsabilidade da doutoranda Kamila Chagas Peronni. Pelo que observamos na Figura 8, a expressão do gene *KIAA0090* é reduzida na transição de pele normal (PN) para o melanoma primário (MP). No caso das amostras de melanoma metastático (MM), ocorreu uma grande variação, com uma amostra (MM2) apresentando níveis similares a melanomas primários, ou seja, reduzida em relação à pele normal. No entanto, a outra amostra de melanoma metastático (MM1) mostrou uma expressão muito elevada do gene *KIAA0090*, em torno de 48 vezes maior que a amostra de pele normal utilizada como calibrador.

Para ampliarmos a caracterização da expressão do gene *KIAA0090* na progressão do melanoma humano, obtivemos em parceria com o Laboratório de Oncologia Experimental da Faculdade de Medicina de São Paulo – USP, sob coordenação do Prof. Dr. Roger Chammas, e com o Grupo de Melanoma do Hospital AC Camargo, cDNAs gerados a partir de amostras de pacientes que foram submetidos a cirurgia para retirada de nevos, melanoma primário e melanoma metastático. Como mostrado na Figura 9, há maior expressão do gene nas amostras de nevos, quando comparada com as mostras de melanomas primários e metastáticos. Ou seja, ocorre uma clara queda de expressão durante a transição de nevos para melanoma primário, assim como observado nas amostras da Figura 8. Não houve diferença significativa de expressão entre melanoma primário e metastático, apesar de algumas variações entre amostras individuais, semelhante ao que ocorreu com as amostras de melanoma metastático mostradas na Figura 8.

Após observarmos uma maior expressão do gene *KIAA0090* em amostras de nevos obtidos de pacientes, e considerando que mutações ativantes de *BRAF* (*BRAFV600E*) estão presentes em aproximadamente 82% dos nevos melanocíticos (Pollock *et al.*, 2003), decidimos avaliar se existia alguma relação entre a mutação de *BRAF* e a expressão do gene em estudo. Obtivemos, em parceria com a Prof. Dra. Silvyia Stuchi Maria-Engler do Departamento de Análises Clínicas e Toxicologia da

Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, amostras de cDNA de outras linhagens celulares de melanoma humano (SK-Mel 19, SK-Mel 28, SK-Mel 29, SK-Mel 94, UACC62, G361, SK-Mel 103, SK-Mel 147, SK-Mel 173, UACC257) já analisadas para presença ou ausência de mutação em *BRAF*. Como mostrado na Figura 10, não encontramos um padrão de expressão do gene *KIAA0090* em relação à mutação BRAFV600E, porém o número de amostras analisadas não permitiu uma conclusão sobre esta relação.

Para ampliarmos esta análise verificamos o status de *BRAF* nas amostras de tumores apresentados na Figura 9. Os experimentos de verificação de mutação foram realizados pelo grupo do Laboratório de Oncologia Experimental da Faculdade de Medicina de São Paulo – USP, sob coordenação do Prof. Dr. Roger Chammas. Como observamos na Figura 11, não encontramos uma associação entre presença ou ausência

da mutação BRAFV600E e expressão do gene *KIAA0090*, em nenhum dos grupos de amostras analisadas, nevos, melanoma primário e melanoma metastático.

Figura 11. Análise da relação entre expressão do gene *KIAA0090* e mutação BRAFV600E. As amostras de nevos (A), melanoma primário (B) e melanoma metastático (C) apresentadas na Figura 9 foram sequenciadas para verificar presença ou ausência de mutação no proto-oncogene *BRAF* (BRAFV600E). A expressão relativa foi calculada pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$, utilizando o valor de Ct do transcrito do gene *TBP* (controle endógeno) para normalização.

3. Efeito do tratamento com as drogas inibidoras de metilação do DNA (5-AZA 2'desoxicitidina, 5-AZA2dC) e/ou desacetilação de histonas (Tricostatina-A, TSA) sobre a expressão do gene *KIAA0090*, em células de melanoma humano – Análise por RT-PCR em tempo real.

Alterações epigenéticas como modificações de histonas e metilação do DNA são fatores contribuintes para a tumorigênese e progressão tumoral (Kelly *et al.*, 2002, Hake *et al.*, 2004). Portanto resolvemos analisar a influência destas alterações no controle da expressão do gene *KIAA0090*. De acordo com o programa *EMBOSS CpGPlot* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/es/cgi-bin>), o gene *KIAA0090* apresenta uma concentração de dinucleotídeos CG na região promotora (considerando 1000 pares de bases *upstream* ao códon de iniciação), caracterizando uma ilha CpG, passível de controle por meio de metilação (Figura 12).

Como apresentado na Figura 13, quando tratamos a linhagem de melanoma vertical WM278 com o agente inibidor de metilação do DNA (5-AZA2dC), não observamos uma diferença de expressão de transcritos do gene *KIAA0090* quando comparada com a célula sem tratamento. Porém, quando tratamos simultaneamente com o agente inibidor de metilação do DNA e com o agente inibidor de desacetilação de histonas (TSA), observamos uma clara indução na expressão do gene em estudo. Já para outra linhagem celular, WM1617 derivada de uma metástase do mesmo paciente de onde foi estabelecida a linhagem vertical WM278, não observamos o mesmo comportamento. Ao ser tratada com 5-AZA2dC observamos uma clara indução na expressão do gene *KIAA0090*, sugerindo que a metilação do DNA parece ser um importante mecanismo de controle da expressão do gene nesta linhagem celular. Porém, a inibição simultânea de metilação do DNA e desacetilação de histonas, reverte em parte o efeito observado de indução transcricional observado com o tratamento com 5-AZA2dC isoladamente. As linhagens de crescimento vertical WM793 e metastática 1205Lu apresentaram efeito semelhante ao observado para a linhagem WM1617. Quando tratadas com 5-AZA2dC observamos uma indução na expressão do gene *KIAA0090*, novamente sugerindo que o processo de metilação do DNA é um importante mecanismo de modulação de expressão gênica nestes tipos celulares. Porém o tratamento combinado 5-AZA2dC + TSA reverteu parte do processo de indução de expressão.

Figura 13. Perfil de expressão dos transcritos do gene *KIAA0090*, após tratamento com as drogas 5-AZA2dC e TSA. A expressão relativa foi calculada pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$, utilizando o valor de Ct do transcrito do gene *TBP* (controle endógeno) para normalização. As amostras WM278, WM1617, WM793 e 1205Lu correspondem as amostras não tratadas usadas como referência para o tratamento com 5-AZA2dC (5 Aza) e as amostras WM278/ETOH, WM1617/ETOH, WM793/ETOH e 1205Lu/ETOH foram usadas como referência para o tratamento com 5-AZA2dC e TSA (5-AZA+TSA).

4. Análise da expressão do gene *KIAA0090*, através de PCR em tempo real, em amostras provenientes de Substância Branca e Glioblastoma.

De acordo com a ferramenta *Cancer Biomedical Informatics Grid* ^{TM}, encontramos uma relação interessante. Pacientes com glioblastoma que superexpressam o gene *KIAA0090* parecem possuir menor probabilidade de sobrevivência, comparados com pacientes que possuem baixa expressão do gene (Figura 14).

Após esta observação avaliamos a expressão do gene em estudo em amostras de tumores de pacientes com glioblastoma, e comparamos com amostras de substância branca. As amostras de cDNA foram obtidas em parceria com a Dra. Valéria Valente, pós-doutoranda no laboratório do Prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Júnior. Como mostrado na Figura 15, encontramos uma grande variação na expressão do gene, e não há diferença significativa entre substância branca e glioblastoma ($p > 0,05$).

Figura 15. Expressão do gene *KIAA0090* em amostras provenientes de Substância Branca (SB) e Glioblastoma (GBM) humanos. A expressão relativa foi calculada pelo método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilizando o valor de C_t do transcrito do gene *TBP* (controle endógeno) para normalização.

A Figura 16 representa a relação entre a expressão do gene *KIAA0090* e a sobrevida destes pacientes com glioblastoma. Ao separarmos as amostras de GBM em dois grupos diferentes, o primeiro com expressão do gene *KIAA0090* $< 1,5$ vezes após normalização com uma amostra referência de SB, e o segundo grupo que engloba as amostras com expressão maior que 1,5 também após a mesma normalização observamos uma menor probabilidade de sobrevida nos pacientes com GBM que possuem uma maior expressão do gene *KIAA0090*. Porém alguns pacientes com alta

expressão apresentaram uma sobrevida maior, fazendo com que a linha de sobrevida destes pacientes se alongue por um tempo maior.

5. Expressão do gene *KIAA0090* em amostras provenientes de pacientes com Leucemia Linfóide Aguda.

A via de sinalização de *Notch* foi relacionada com leucemia desde sua descoberta (Bray, 2006). De acordo com dados de expressão baseados em ESTs (<http://genome.ewha.ac.kr/ECgene/>), o gene *KIAA0090* apresenta uma expressão considerável em leucemias. Ainda, análises de células leucêmicas tratadas com um inibidor da via de *Notch1*, mostram uma diminuição de expressão de transcritos de gene *KIAA0090*, quando comparado com células não tratadas (Dohda *et al.*, 2007). Isto indica que esta via de sinalização intracelular pode de alguma forma estar envolvida na regulação da expressão do gene em estudo. Amostras de cDNA de pacientes com Leucemia Linfóide Aguda foram cedidas pelo Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone do

Departamento de Puericultura e Pediatria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Como podemos observar na Figura 17, encontramos uma grande variação de expressão entre as amostras analisadas. Não encontramos relação entre a expressão do gene *KIAA0090* e idade, sexo, contagem de glóbulos brancos, risco, imunofenótipo, resposta e situação atual do paciente.

6. Efeito do silenciamento do gene *KIAA0090* sobre a viabilidade celular e ativação de UPR.

Estudos anteriores realizados por nosso grupo mostraram que a superexpressão da proteína *KIAA0090* fusionada a EGFP interfere com a viabilidade celular. Para complementar a análise deste efeito realizamos o *knockdown* do gene, utilizando a ferramenta do RNA de interferência, através da transfecção com oligonucleotídeos de

siRNA. O processo de *knockdown* foi eficiente em todos os períodos analisados, ou seja, encontramos redução significativa no mRNA do gene *KIAA0090* na linhagem celular de melanoma humano metastático WM9 (Figura 18). Esta redução mostrou-se eficiente até seis dias (144h) após a transfecção dos oligonucleotídeos. Redução dos níveis de proteína também foi detectada, através da marcação com um anticorpo anti-KIAA0090 e leitura em citômetro de fluxo, em aproximadamente 15 - 25% das células nas amostras tratadas com o siKIAA0090, como mostrado na Figura 19.

Figura 18. Análise do knockdown do gene *KIAA0090* na linhagem celular de melanoma humano da fase metastática. Os RNAs foram isolados nos tempos acima indicados, convertidos em cDNA e analisados por RT-PCR em Tempo Real. A expressão relativa foi calculada pelo método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilizando o valor de Ct do transcrito do gene *TBP* (controle endógeno) para normalização.

Figura 19. Análise do *knockdown* da proteína KIAA0090 por citometria de fluxo.

As células foram transfectadas com o siKIAA0090 e analisadas para a marcação pelo anticorpo anti-KIAA0090 120 horas após a transfecção. O primeiro quadrante mostra as células sem a marcação pelo anticorpo (No Ab), seguido pelas células não-transfectadas (NT), transfectadas com siRNA negativo (siNEG) e células transfectadas com siKIAA0090 (siK).

Durante a realização destes experimentos, observamos uma alteração no fenótipo das células. Encontramos um maior número de células em suspensão nas culturas transfectadas com siKIAA0090 em comparação com culturas não transfectadas e células transfectadas com siNEG (Figura 20). Notamos também que as culturas tratadas com siKIAA0090 não atingem o mesmo grau de confluência das culturas controles e ainda apresentavam células morfológicamente distintas, parecendo, em geral, mais achatadas que as controles.

Figura 20. Efeito do silenciamento do gene *KIAA0090* sobre a morfologia da linhagem celular de melanoma metastático (WM9) 48h e 120h após a transfecção com os siRNA negativo (siNEG), siKIAA0090 e células não-transfectadas (WM9 NT).

As células em suspensão provavelmente corresponderiam a células inviáveis, e a hipótese foi que o silenciamento do gene em estudo levaria a um aumento na morte celular. Conduzimos, então, ensaios de viabilidade através de marcação com iodeto de propídeo (PI) e análise por citometria de fluxo. Com isso, observamos que o *knockdown* do gene *KIAA0090* levou a um aumento na morte celular (células positivas para PI) em comparação com culturas não-transfectadas ou transfectadas com siRNA negativo, em todos os tempos analisados (Figura 21).

Em seguida, decidimos verificar se a morte celular observada era do tipo apoptótica. Como indicado na Figura 22, esta morte parece ser do tipo apoptótica, já que encontramos um maior número de células positivas para anexina V, 72, 96, 120 e 144 horas após transfecção, nas culturas silenciadas para o gene *KIAA0090*, comparando-as com culturas não-transfectadas ou transfectadas com siRNA controle, na mesma proporção do aumento de células iodeto positivas.

Já que a deleção do ortólogo (YCL045C, EMC1) do gene *KIAA0090* em *S. cerevisiae* leva à ativação da resposta ao estresse de retículo endoplasmático (UPR), analisamos aqui se ocorreria ativação desta via de resposta também nas células humanas silenciadas para este gene, através da análise de expressão de duas moléculas-chave na ativação desta resposta, GRP78 e CHOP. Como indicado na Figura 23 e 24, não encontramos um padrão consistente de ativação ou inibição da resposta ao estresse de retículo nas células estudadas em todos os tempos analisados.

Figura 23. Expressão do gene *GRP78*. Células de melanoma humano não-transfectadas (WM9 NT), transfectadas com siRNA negativo (WM9 siNEG) e com siKIAA0090 foram analisadas para a expressão do gene *GRP78* nos tempos indicados. A expressão relativa foi calculada pelo método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilizando o valor de Ct do transcrito do gene *TBP* (controle endógeno) para normalização.

Figura 24. Expressão do gene *CHOP*. Células de melanoma humano não-transfectadas (WM9 NT), transfectadas com siRNA negativo (WM9 siNEG) e com siKIAA0090 foram analisadas para a expressão do gene *CHOP* nos tempos indicados. A expressão relativa foi calculada pelo método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilizando o valor de Ct do transcrito do gene *TBP* (controle endógeno) para normalização.

No entanto, estas células não foram estimuladas para ativação de UPR. Desta forma, as células WM9 não-transfectadas, transfectadas com siRNA negativo (siNEG) e siKIAA0090 foram tratadas com duas drogas que induzem ativação e UPR, Brefeldina A (BFA) e MG132. O resultado apresentado na Figura 25 mostra que o tratamento com estas drogas não interferiu no processo de silenciamento. O tratamento das células não-transfectadas com BFA aumentou a expressão do gene *KIAA0090*, o que não ocorreu com a droga MG132, que apresentou uma pequena redução nos níveis de mRNA *KIAA0090*. Conforme apresentado na Figura 18, o próprio processo de transfecção induziu expressão do gene em estudo no tempo analisado, e o tratamento com as drogas reverteu esta indução. Células silenciadas para o gene *KIAA0090* não sofreram alteração significativa após o tratamento com as drogas, ou seja, o processo de *knockdown* continua eficiente independente do tratamento das células.

Figura 25. Análise do silenciamento do gene *KIAA0090* na linhagem celular de melanoma humano da fase metastática, antes e após tratamento com as drogas Befeldina A (BFA) e MG132. Os RNAs foram isolados 48h após a transfecção antecedido ou não pelo tratamento com as drogas, convertidos em cDNA e analisados por RT-PCR em Tempo Real. A expressão relativa foi calculada pelo método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilizando o valor de Ct do transcrito do gene *TBP* (controle endógeno) para normalização.

O silenciamento do gene *KIAA0090* por si só não induz aumento de expressão de *GRP78*, diferente do tratamento com as drogas, que foi eficiente em ativar *GRP78*. Esta ativação foi maior após o tratamento com BFA, em comparação ao tratamento com MG132. Ainda, células silenciadas para o gene *KIAA0090* apresentaram maior ativação de *GRP78* que as células não transfectadas e transfectadas com siRNA negativo (siNEG) após tratamento com BFA, o que não foi observado após tratamento com MG132 (Figura 26).

Para a outra molécula chave na ativação da resposta a proteínas mal-enoveladas no retículo endoplasmático, *CHOP*, o tratamento com as drogas induziu a expressão deste

gene, sendo bem mais acentuado no tratamento com BFA. Da mesma forma, o silenciamento do gene *KIAA0090* por si só não foi capaz de induzir expressão de *CHOP*. O tratamento com BFA diminuiu a expressão de *CHOP* nas células tratadas com siRNA controle (siNEG) e não alterou a expressão nas células silenciadas para o gene *KIAA0090*, quando comparadas às células não-transfectadas. Houve maior indução de *CHOP* nas células silenciadas para o gene *KIAA0090*, quando comparamos com as células não-transfectadas e transfectadas com siNEG (Figura 26).

V) DISCUSSÃO

1. Análises de transcritos alternativos do gene *KIAA0090*.

O gene *KIAA0090* humano está localizado na região cromossômica 1p36.13. Alterações no cromossomo 1 representam os sítios mais frequentes de anormalidades cromossômicas estruturais em tumores humanos, incluindo melanoma. Neste tipo de tumor, quebras envolvendo o cromossomo 1 acumulam mais frequentemente na região paracentromérica e também na região 1p36 (Zhang *et al.*, 1999). Nesta mesma região encontramos outros genes vizinhos ao *KIAA0090* (Figura 4A). *CAPZB* (*actin filament capping protein muscle Z-line, beta*) é um membro da família de proteínas capeadoras de F-actina e codifica a subunidade beta da proteína de ligação à “extremidade em barbela”, regulando o crescimento dos filamentos de actina. Análises em amostras de metástases de melanoma que regrediram completamente após o tratamento mostraram uma expressão aumentada de *CAPZB* (Wang *et al.*, 2002). *UBR4* (*E3 ubiquitin-protein ligase*) reconhece e liga-se a proteínas que possuem resíduos específicos na porção N-terminal, levando à ubiquitinação e degradação. Regula a sinalização mediada por integrinas e tem um papel na ativação de FAK em resposta à interação célula-matriz, importante no processo de migração e invasão celular. Encontramos ainda duas proteínas hipotéticas (LOC100288987 e LOC644083) sem caracterização e *PQLC2* (*PQ loop repeat containing 2*) que codifica uma proteína de membrana também sem caracterização funcional. Estão também localizados nesta mesma região três membros da família 7 de aldo-ceto redutases (*AKR7*), que possuem um papel importante na desintoxicação de compostos contendo carbonil, incluindo aldeídos aromáticos e alifáticos. Estes compostos induzem quebras no DNA, um dos principais estímulos ambientais causadores de neoplasias, sendo desta forma importante na manutenção da integridade genômica. *MRT04* (*mRNA turnover 4 homolog - S. cerevisiae*) codifica uma proteína que

compartilha alto grau de similaridade com a proteína ribossomal P0, e possui indícios do seu envolvimento no *turnover* de mRNA e montagem do ribossomo.

O *locus* do gene *KIAA0090* é complexo e parece produzir várias proteínas sem sobreposição de sequência. Análises dos transcritos depositados em banco de genes permitem gerar previsões de que a transcrição do gene *KIAA0090* produz 21 diferentes mRNAs, dos quais 20 são por *splicing* alternativo e outros que se distinguem por estarem truncadas nas extremidades 5' e 3'. As diferentes formas de transcritos distinguem-se pela presença ou ausência de seis diferentes éxons através de *splicing* alternativo ou ainda retenção de quatro íntrons. Alguns mRNAs codificam para proteínas, com 8 diferentes isoformas, sendo duas delas anotadas usando como metionina um códon de iniciação não-AUG (*Kozak-compatible*). Encontramos diferentes pontos de início de tradução, alteração e exclusão de alguns éxons, o que pode interferir em alguns domínios da proteína e diferenciar seu padrão de localização e interação, e mesmo seu papel funcional (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly>).

Entre todos os transcritos apresentados, não há nenhuma relação de expressão tecido ou célula específica, já que todos os transcritos são expressos em diferentes tecidos (Tabela I). Após desenharmos primers para mapearem a presença dos éxons que compõem a RefSeq, observamos alguns *amplicons* que possuíam tamanho diferente do esperado, e não estavam representados nos dados disponíveis no *AceView*. Então seguimos com uma nova análise *in silico* utilizando a ferramenta *Human Blat UCSC Genome Browser* (<http://www.ncrna.org>), onde encontramos outros transcritos que mapeiam nesta região e não estavam representados no *AceView*, mostrados na Figura 5. O transcrito identificado como DA_102732 possui uma adição de um éxon alternativo (237 pb) entre os éxons um e dois da RefSeq, e o *amplicon* de maior tamanho identificado nas amostras de cDNA de Jurkat, WM793 e 1205Lu podem representar este transcrito, apesar

de estar presente em pequenas quantidades quando comparados com o transcrito referência. Porém o fragmento intermediário observado nestas amostras não está representado em nenhum dos bancos de dados analisados.

Não há transcrito depositado nos bancos de dados públicos que justifiquem estes achados, e como dito anteriormente, estamos repetindo estes experimentos para definir qual transcrito está presente na linhagem celular Jurkat. Porém, dos resultados obtidos destes experimentos, podemos concluir que as linhagens celulares de melanoma humano e melanócitos provavelmente expressam, pelo menos em maior abundância, o transcrito que é considerado referência para o gene *KIAA0090*, já que todos os 23 éxons parecem estar presentes neste transcrito. Em seguida, direcionamos nosso trabalho para o próximo objetivo, isto é, analisar a expressão do gene em amostras de linhagens celulares e tumores humanos, com atenção especial para o melanoma, modelo de estudo de nosso grupo.

2. Expressão do gene *KIAA0090* nas linhagens celulares de melanoma humano e amostras de tumores de pacientes.

Ao analisar a expressão de transcritos do gene *KIAA0090* nas linhagens celulares de melanoma humano disponíveis em nosso laboratório, encontramos uma tendência de aumento de expressão nas linhagens celulares que representam as fases mais tardias da progressão tumoral (Figura 7). Isto está de acordo com dados preliminares de nosso laboratório, onde análises por *Northern blotting* mostraram um aumento de expressão nas linhagens metastáticas. (Sousa, 2005).

Para estudarmos melhor a relação da expressão do gene em estudo com a progressão tumoral e se há alguma relação com o prognóstico clínico, obtivemos amostras de cDNAs de tumores de pacientes com melanoma, e comparamos com uma amostra de pele normal. Na classificação do melanoma tanto o nível de Clark (Clark *et al.*, 1969)

como a medição de Breslow (Breslow, 1970) são freqüentemente utilizados para o estadiamento do tumor, sendo os indicadores de prognóstico mais importantes em melanomas cutâneos. O nível de Clark obtém-se pela comparação entre o nível de invasão tumoral com as camadas da pele. No nível I as células tumorais estão confinadas à epiderme (*in situ*). No nível II o tumor invade a derme papilar, atravessando a membrana basal. Nível III, o tumor estende-se entre a derme papilar e reticular. Já no nível IV o tumor invade a derme reticular, e no nível V o tumor extravasa para o tecido subcutâneo. A espessura de Breslow é a medição da profundidade da lesão em milímetros, desde a base da superfície de ulceração até ao ponto mais profundo de envolvimento tumoral. No geral, quanto maior esta espessura, pior o prognóstico clínico do paciente. Muitos estudos têm comprovado que a espessura de Breslow possui maior nível de significância de prognóstico clínico que o nível de Clark (Barnhill *et al.*, 1996; Schuchter *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1997; Balch *et al.*, 1978).

O resultado apresentado na Figura 8 mostra que a expressão do gene *KIAA0090* é maior em pele normal (PN) que nas amostras de melanoma primário (MP), e no caso das metástases observamos uma amostra (MM1) com expressão consideravelmente aumentada e a outra (MM2) com expressão reduzida em relação à pele normal. As amostras MP1 e MP2 foram derivadas de melanomas primários invasivos, no entanto os pacientes apresentavam ausência de sinais de malignidade angio-linfática. A amostra MP1 apresentou uma espessura de Breslow de 0,5 mm (nível de Clark III), enquanto que a amostra MP2 apresentou espessura de Breslow 4,4 mm (nível de Clark IV). Considerando, como descrito acima, que a espessura de Breslow possui maior significância de prognóstico clínico, o paciente MP2 possui um pior prognóstico clínico, assim como apresentou uma expressão do gene *KIAA0090* maior que a outra amostra de melanoma primário. A amostra MM1 apresentou espessura de Breslow 6 mm, enquanto

que MM2 apresentou espessura de Breslow 1,4 mm. Novamente, o paciente que continha a lesão MM1 apresentava um pior prognóstico clínico, e também mostrou uma expressão do gene em estudo maior que a amostra MM2. Estes dados sugerem que pacientes que possuam alta expressão do gene *KIAA0090* podem apresentar um pior prognóstico clínico, mas devido a o número reduzido de amostras analisadas, devemos considerar apenas como uma hipótese a ser investigada com mais critério.

Com este resultado não foi possível determinar com precisão o comportamento da expressão do gene durante a progressão do melanoma, já que variações individuais é uma característica marcante em amostras tumorais. Ampliando este estudo em tumores de pacientes, apresentado na Figura 9, verificamos redução da expressão durante a transição de nevos para melanoma primário, assim como observado nas amostras da Figura 8. Não há diferença significativa entre melanoma primário e metastático, apesar de algumas variações entre amostras individuais, semelhante ao que ocorreu com as amostras de melanoma metastático mostradas na Figura 8. Como o número de amostras analisadas permitiu uma análise mais abrangente do comportamento do gene, o aumento de expressão na transição melanoma primário – metástase observado anteriormente parece refletir apenas uma variação entre amostras, mais que uma diferença entre estas fases da progressão tumoral. Dentre as amostras de melanoma primário, algumas apresentaram uma expressão relativamente alta e outras relativamente baixas em comparação ao restante correspondente ao mesmo grupo. O paciente P53 apresentava um melanoma invasivo de fase de crescimento vertical, com ausência de sinais de malignidade angio-linfática e metástases distantes, espessura de Breslow menor que 1 mm (Clark III). Como descrito acima, considerando a espessura de Breslow como um bom indicador de prognóstico clínico, este paciente não mostrava ter um prognóstico ruim, mesmo assim apresentou uma expressão do gene em estudo quatro vezes maior que a média das

amostras do mesmo grupo. No entanto, outros três pacientes, P72 (melanoma vertical invasivo com malignidade linfática, espessura de Breslow maior que 4 mm e nível de Clark V), P119 (melanoma vertical invasivo, sem disseminação em linfonodos, espessura de Breslow maior que 4 mm e nível de Clark IV) e P62 (melanoma vertical invasivo, sem linfonodos comprometidos, espessura de Breslow maior que 4 mm e nível de Clark IV) apresentaram uma expressão do gene em estudo de 2-3 vezes maior que a média do grupo, assim como não possuíam um bom prognóstico clínico. Em resumo, considerando todas as amostras de melanoma primário com expressão do gene *KIAA0090* acima da média do grupo correspondente (MP2, P53, P72, P119, P62), todos apresentaram um prognóstico clínico ruim baseado na espessura de Breslow, com exceção da amostra P53.

Já as amostras P54 (melanoma vertical invasivo, sem linfonodos comprometidos, espessura de Breslow maior que 4 mm e nível de Clark III), P14 (melanoma vertical invasivo, com disseminação para linfonodos, espessura de Breslow maior que 4 mm e nível de Clark V), P91 (melanoma vertical invasivo, sem disseminação para linfonodos, espessura de Breslow entre 2-4 mm e nível de Clark IV) e P20 (melanoma vertical invasivo, disseminação para linfonodos, espessura de Breslow de 2-4 mm e nível de Clark IV) apresentaram uma expressão do gene *KIAA0090* de 4 a 8 vezes menor que a média do respectivo grupo de amostras. Porém não observamos o comportamento inverso entre expressão do gene e prognóstico clínico, isto é, a baixa expressão do gene *KIAA0090* não parece indicar um melhor prognóstico para o paciente. Baseado nos dados de expressão e no quadro clínico dos pacientes, não foi possível indicar uma relação concludente entre o nível de expressão do gene e o prognóstico clínico dos pacientes com melanoma.

Como mutações ativantes de *BRAF* (BRA_FV600E) estão presentes em aproximadamente 82% dos nevos (Pollock *et al.*, 2003), resolvemos checar se havia relação entre a mutação de *BRAF* e a expressão do gene em estudo. Analisando linhagens

celulares de melanoma humano, já conhecidas para o status de BRAF, observamos que três linhagens celulares com a mutação apresentaram uma maior expressão do gene, ao passo que apenas uma linhagem sem mutação apresentou uma expressão elevada. Isto poderia indicar que a presença da mutação em BRAF induziria a expressão do gene *KIAA0090*, porém devido ao reduzido número de linhagens celulares analisadas, não foi possível estabelecer uma relação clara. Com o intuito de verificar melhor essa relação entre mutação BRAFV600E e expressão do gene *KIAA0090*, decidimos verificar o status desta mutação no painel de tumores derivados de pacientes, apresentados na Figura 9. O grupo do Prof. Roger Chammas determinou a presença da mutação no painel de nevos e melanomas e nos enviou os resultados, propiciando a realização desta análise. Em nenhum dos grupos de amostras analisadas, nevos, melanoma primário e metastático, encontramos uma relação entre expressão do gene em estudo e mutação BRAF V600E. Os resultados indicam que a expressão elevada do gene *KIAA0090* em amostras de nevos não está relacionada com a atividade de BRAF.

Um melhor e mais aprofundado estudo da base molecular de tumores benignos será de muita relevância para entender por que tumores benignos, diferente dos malignos, não progridem e não são invasivos. Diferente do melanoma maligno, nevos são uma forma benigna de hiperproliferação dos melanócitos (Leikam *et al.*, 2008), que leva a um estado conhecido como estresse hiperproliferativo, e atualmente muitos trabalhos estão investigando a resposta celular a estes e outros tipos de estresses como uma defesa contra a progressão tumoral. Como o ortólogo do gene *KIAA0090* em *Saccharomyces cerevisiae* (YCL_045C – EMC1) foi caracterizada como uma proteína da membrana do retículo ativada em resposta ao acúmulo de proteínas mal-enoveladas (UPR) (Jonikas *et al.*, 2009), a alta expressão do gene em amostras de nevos pode indicar uma resposta ao estresse hiperproliferativo, mais que alguma relação com a mutação BRAFV600E. Este

estado de proliferação descontrolada gera um acúmulo de proteínas mal enoveladas, e desta forma a alta expressão do gene *KIAA0090* em amostras de nevus provavelmente corresponde à ativação desta via de UPR.

A maioria dos trabalhos até o momento gerou informações sobre genes que desempenham um papel importante em melanomas de estágios mais avançados. Estes estudos foram conduzidos em linhagens celulares estabelecidas, das fases de crescimento vertical e metastática, e comparados com culturas primárias de melanócitos humanos. Vários genes e algumas citocinas relacionadas com indução de apoptose e vias de transdução de sinais regulados por *TGF β* , *EGF*, *fos* e *β -catenina* podem ser alterados em culturas de células (Mazzatti *et al.*, 2007). Ainda, Luo e colaboradores mostraram, em um trabalho de análise de expressão em larga escala, indução na expressão de *KIAA0090* em resposta ao tratamento com *TGF β* (Luo *et al.*, 2005). Muito menos informações são geradas sobre genes que são regulados em estágios mais precoces do desenvolvimento do melanoma. Bibliotecas de expressão (SAGE) gerados a partir de amostras de melanomas VGP e metástases levam a identificação de um número significativo de genes os quais não conhecíamos a expressão em nevus ou melanomas, e sugerem que o perfil molecular de VGP e melanomas metastáticos são muito similares (Smith *et al.*, 2004; Weeraratna *et al.*, 2004). Smith e colaboradores (Smith *et al.*, 2005) mostraram a primeira evidência para a existência de dois perfis moleculares muito distintos que dirigem a progressão do melanoma. Um que é específico para e compreende nevus benigno, nevus atípico e melanoma *in situ*. Outro incluindo melanomas VGP, metastáticos e linfonodos positivos para melanomas metastáticos. Segundo estes autores, a mudança de um perfil para outro ocorre precisamente na transição de melanoma *in situ* para melanoma primário, e os grupos de genes mais claramente associados com essa troca estão envolvidos em ciclo celular

mitótico e proliferação celular. Vários estudos mostram que tumores primários e suas metástases possuem similaridades no perfil de expressão gênica (Weigelt *et al.*, 2005; Perou *et al.*, 2000). Porém van't Veer (van't Veer *et al.*, 2002) e Ramaswamy (Ramaswamy *et al.*, 2003) descobriram que alguns tumores primários e mesmo lesões pré-neoplásicas contêm assinaturas de genes que podem prever sua propensão a metástase. Estas observações levantam a possibilidade da capacidade de metástase ser determinada precocemente no desenvolvimento tumoral.

Avanços recentes na biologia molecular têm aumentado nosso entendimento da patologia das lesões melanocíticas. Tecnologias de alta resolução para análises de genomas, como análise de expressão gênica e mutações, análises fenotípicas e funcionais, assim como o uso de animais modelos, têm permitido melhorias tanto no diagnóstico como no tratamento do câncer. Padrões de expressão gênica estão sendo usados para classificar subtipos de tumores primários e para prever o prognóstico clínico, adequação e resposta ao tratamento (Ramaswamy *et al.*, 2003; Sorlie *et al.*, 2001).

De acordo com os dados obtidos em amostras de linhagens celulares de melanoma humano, observamos uma tendência de aumento de expressão do gene *KIAA090* nas linhagens celulares que representam as fases mais avançadas da progressão tumoral. Isto sugere um papel pró-oncogênico do gene estudado. Porém, quando analisamos a expressão em amostras de tumores derivados de pacientes, verificamos que a expressão é significativamente reduzida na transição de nevos para melanoma primário, e parece não haver alteração na transição deste para melanoma metastático, apesar da heterogeneidade que encontramos entre as amostras analisadas. Estes dados em amostras de tumores sugerem um comportamento semelhante a um gene supressor tumoral.

Em um trabalho de análise de expressão em larga escala Hoek e colaboradores (Hoek *et al.*, 2004) não encontraram uma diferença clara entre as amostras de culturas celulares na expressão do gene *TMBIM4*, com uma amostra de melanoma primário e outra de metastático exibindo alta expressão, porém o restante de amostras de melanoma com expressão similar a melanócito normal. Já no trabalho realizado por Smith (Smith *et al.*, 2005) em amostras provenientes de biópsias de tecidos representando nevos benigno, nevos atípico, melanoma *in situ*, melanoma vertical e melanoma metastático, observaram uma clara tendência de aumento de expressão deste gene com a progressão tumoral. O gene *TMBIM4* (*transmembrane BAX inhibitor motif containing 4*) participa na regulação da morte celular por meio de interação com proteínas da família Bcl-2, promovendo metástase (Zhou *et al.*, 2008). São residentes no Golgi e descritas inibir a apoptose induzida por uma ampla variedade de estímulos (Gubser *et al.*, 2007), provavelmente pela ligação e comprometimento da função das proteínas da família Bcl-2. *TMBIM4* foi mostrado interagir fisicamente com a proteína objeto de estudo deste trabalho, KIAA0090 (Ewing *et al.*, 2007).

No mesmo trabalho, Hoek também mostra um comportamento semelhante ao que encontramos na expressão do gene *KIAA0090* para o gene *TCS22*, ou seja, mostrou ser mais expresso em amostras de culturas celulares de melanoma quando comparado com melanócitos normais. Porém, no trabalho de Smith e colaboradores citado anteriormente (Smith *et al.*, 2005), este mesmo gene não apresentou diferença significativa entre as fases da progressão tumoral, com uma amostra de cultura celular metastática, uma de pele normal e outra de nevos atípico mostrando uma alta expressão de *TSC22*. O gene *TSC22* (*Transforming growth factor- β stimulated clone-22*) foi originalmente caracterizado como um gene induzido por *TGF- β* (Shibanuma *et al.*, 1992; Uchida *et al.*, 2003) e codifica um regulador transcricional que contém um

domínio zíper de leucina, sendo estimulado por sinais que induzem diferenciação (Shibanuma *et al.*, 1992). Kawamata e colaboradores (Kawamata *et al.*, 2004) mostraram que este gene regula negativamente o crescimento uma linhagem celular de glândula salivar humana (TYS), e que a diminuição da expressão desenvolve papel importante na tumorigênese. Ainda, interações entre as vias de sinalização de *TGF- β* e *Ras* desempenham um papel importante no desenvolvimento do câncer. De acordo com Ewing e colaboradores (Ewing *et al.*, 2007), os quais mostraram um estudo em larga escala de interação proteína-proteína, a proteína KIAA0090 interage com TSC22 (*TGF- β 1*). Bae e colaboradores (Bae *et al.*, 2008) mostraram que a atividade pró-oncogênica de *TGF- β 1* pode ocorrer no início da carcinogênese de pele, antes da perda de sua função de supressor tumoral. Portanto, uma mesma proteína pode exercer tanto uma atividade pró-oncogênica como supressora tumoral, dependendo da fase de progressão tumoral.

Outro trabalho já citado anteriormente (Wajapeyee *et al.*, 2007) mostra que 82% dos nevos, contra aproximadamente 50% dos melanomas, possuem uma mutação ativadora no oncogene *BRAF*, mas isso por si só não é capaz de induzir uma proliferação descontrolada, pelo contrário induz senescência e altas taxas de apoptose em melanócitos com a mutação citada. Neste trabalho os autores mostram que *IGFBP7* é altamente expresso em nevos e é o responsável por controlar a proliferação deste tipo de célula. Porém quando analisaram melanomas positivos para a mutação *BRAF*, não encontraram expressão de *IGFBP7*, e a sua re-expressão nestas células induziram morte por apoptose. Portanto existe a necessidade da perda de expressão do gene *IGFBP7* para a progressão deste tipo de melanomas. Este mesmo comportamento foi apresentado pelo gene em estudo, já que ocorre uma clara queda de expressão na transição de nevos para melanomas (Figura 9). Desta forma, alterações adicionais à indução de um oncogene ou perda de um

supressor tumoral são necessárias para que a célula escape dos pontos de controle de crescimento e continue proliferando, e este pode ser o caso do gene *KIAA0090*.

3. Efeito do tratamento com as drogas inibidoras de metilação do DNA e/ou desacetilação de histonas sobre a expressão do gene *KIAA0090*.

Modificações epigenéticas consistem em múltiplos mecanismos que interagem para estabelecer coletivamente estados alternados de estrutura de cromatina. Estes mecanismos consistem em modificações de histonas, composição de proteínas, atividades transcricionais e, em mamíferos, metilação de citosinas do DNA em dinucleotídeos CG, mecanismos estes que não interferem nas seqüências de DNA (Ordway *et al.*, 2002; Jaenisch *et al.*, 2003). Modificações epigenéticas são reconhecidas como significantes fatores contribuintes para a tumorigênese humana e progressão tumoral (Kelly *et al.*, 2002, Hake *et al.*, 2004). É sabido que células cancerosas sofrem mudanças na distribuição de 5-metilcitosinas, incluindo hipometilação global e hipermetilação de ilhas CpG na região promotora associada a genes supressores tumorais (Jones *et al.*, 1999; Bird, 1996). Foi constatado que hipermetilação em ilhas CpG é apenas uma faceta de uma mudança integrada na estrutura da cromatina e modificações nas histonas (Jones *et al.*, 2002; Lund *et al.*, 2004), incluindo desacetilação de histonas H3 e H4 (Johnstone, 2002), metilação da lisina 9 da histona H3 (Kondon *et al.*, 2003), entre outras, resultando coletivamente em um estado transcricional silenciado.

Para avaliar a influência de alterações epigenéticas na expressão do gene *KIAA0090*, as linhagens celulares de melanoma humano WM278, WM1617, WM793 e 1205Lu foram tratadas com um agente inibidor de metilação do DNA (5-aza-2'-desoxicitidina) e outro inibidor de desacetilação de histonas (Tricostatina A), conforme protocolo descrito anteriormente. Como amostra referência para o tratamento com a droga 5-AZA2dC, utilizamos células não tratadas, uma vez que essa droga foi dissolvida em

água; e como amostra referência para o tratamento concomitante com 5-AZA2dC e TSA, utilizamos células tratadas com etanol (ETOH), solvente da droga TSA. O tratamento da linhagem de melanoma vertical WM278 com o agente inibidor de metilação do DNA (5-AZA2dC) não altera o padrão de expressão do gene *KIAA0090* quando comparada com a célula sem tratamento. Porém, no tratamento simultâneo com o agente inibidor de metilação do DNA mais o agente inibidor de desacetilação de histonas (TSA), ocorre indução na expressão do gene em estudo. Isto sugere que exista um balanço entre estas duas modificações epigenéticas para o controle da expressão do gene, nesta linhagem celular. Ou seja, ao inibir o processo de metilação do DNA isoladamente, a desacetilação de histonas pode ter contribuído para contrabalancear o efeito de indução de expressão que seria observado pelo efeito de hipometilação de ilhas CpG. Porém, quando os dois processos epigenéticos foram inibidos simultaneamente, gerou um estado transcrricional ativo, induzindo transcrição do gene. As linhagens celulares WM1617 (metastática), WM793 (vertical) e 1205Lu (metastática) apresentaram indução na expressão após inibição da metilação do DNA, e este efeito foi em parte revertido após inibição simultânea de metilação do DNA e deacetilação de histonas, mostrando que estas modificações participam de um mecanismo integrado de alterações epigenéticas que contribuem para o controle de expressão gênica, podendo um evento ser influenciado pela atividade do outro.

Bird (Bird, 2002) suporta a hipótese que metilação do DNA e desacetilação de histonas podem ser mecanicamente ligadas no processo de silenciamento de genes. Por exemplo, genes de RNAs ribossômicos silenciados podem ser re-expressos após tratamento ou com 5-AZA2dC ou com TSA (Chen *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 2002), mas o tratamento simultâneo com as duas drogas não resultou em re-expressão adicional, sugerindo que metilação do DNA e desacetilação de histonas podem atuar de maneira

independente para silenciar expressão de genes do rRNA. Este mesmo efeito foi observado nas linhagens celulares de melanoma humano na análise de expressão de transcritos do gene *KIAA0090*, com exceção da linhagem WM278, onde observamos um efeito sinérgico entre inibição de metilação do DNA e de desacetilação de histonas. Estes dados em conjunto suportam a hipótese que modificações epigenéticas, tais como metilação do DNA e desacetilação de histonas, podem ser responsáveis pela modulação da transcrição do gene em estudo. Porém, uma análise mais fidedigna, tal como a reação de modificação com bissulfito de sódio (Frommer *et al.*, 1992) em conjunto com amplificação da região promotora do gene alvo e sequenciamento, deve ser realizada para avaliarmos especificamente o gene de interesse, já que o tratamento das células com as drogas citadas promove uma efeito global, e o silenciamento de um gene pode interferir na expressão de outro que participe da mesma via de sinalização, ou ainda de vias redundantes.

4. Expressão do gene *KIAA0090* em Substância Branca e Glioblastoma.

O gene *KIAA0090* está descrito com envolvimento em câncer, de acordo com o Atlas de Genética e Citogenética em Oncologia e Hematologia (<http://atlasgeneticsoncology.org>). Dados de um grupo de pesquisadores no Japão ainda não publicados (*Proceedings of the Japanese Cancer Association Annual Meeting – 2002*) indicam a superexpressão do gene em vários tipos de tumores humanos. Decidimos então analisar a expressão deste gene em outros tipos de tumores humanos. Um estudo *in silico* utilizando a ferramenta *Cancer Biomedical Informatics Grid TM* mostrou que pacientes com glioblastoma que superexpressam o gene *KIAA0090* possuem menor probabilidade de sobrevivência, comparados com pacientes que possuem baixa expressão do gene (Figura 14). Os resultados de PCR em Tempo-Real não mostraram diferença significativa na expressão do gene em estudo comparando

substância branca e glioblastoma (Figura 15), no entanto estes pacientes com GBM que apresentam uma maior expressão do gene *KIAA0090* apresentam menor probabilidade de sobrevida (Figura 16), assim como indicou a análise *in silico*. Porém, encontramos algumas variações, pacientes com alta expressão do gene em estudo que ainda estão em fase de tratamento da doença. Estes resultados sugerem que pode haver uma associação entre a expressão gênica e sobrevida destes pacientes, porém este estudo deve ser ampliado para uma melhor caracterização desta relação, e outras relações como resposta a diferentes quimioterápicos e associação com outras alterações genéticas importantes no desenvolvimento e manutenção do glioblastoma. Por exemplo, desregulação das vias de *RB*, *p53* e *RTK/RAS/PI(3)K* já foram descritas como eventos obrigatórios em grande parte dos glioblastomas, e os padrões de mutação podem direcionar a abordagem terapêutica. Pacientes com deleções ou mutações inativantes em *CDKN2A* ou pacientes com amplificação em *CDK4/CDK6* seriam candidatos para o tratamento com inibidores de *CDKs*, uma estratégia que não seria eficiente para o tratamento de pacientes com mutações em *RBI*. Outro importante biomarcador para glioblastoma é a situação da metilação de *MGMT*, o que prediz sensibilidade ao quimioterápico Temozolomida, droga padrão para o tratamento do glioblastoma. Pacientes recém-diagnosticados com metilação em *MGMT* respondem bem ao tratamento com este quimioterápico (*The Cancer Genome Atlas Research Network*, 2008). Portanto, uma análise integrativa de expressão gênica, mutações, metilação do DNA, juntamente com os dados clínicos, podem mostrar uma série de eventos inter-relacionados que tem um grande impacto na abordagem terapêutica e resposta clínica do paciente. E pelos dados obtidos até agora, pode ser que o gene *KIAA0090* indique uma característica importante que possa direcionar a abordagem dos pacientes com glioblastoma.

5. Expressão do gene *KIAA0090* em pacientes com Leucemia Linfóide Aguda.

A via de sinalização induzida por *Notch* controla muitos aspectos do desenvolvimento e homeostase tecidual. Esta proteína participa como receptor em uma via de transdução de sinais que induz translocação de *Notch* para o núcleo, onde age como um fator de transcrição para muitos genes-alvo envolvidos em proliferação celular e diferenciação (Milner *et al.*, 1999; Ohishi *et al.*, 2003). Em adição ao papel no desenvolvimento e homeostase, esta via de sinalização foi relacionada com leucemia desde sua descoberta (Bray, 2006). Weng e colaboradores (Weng *et al.*, 2004), mostraram que freqüentemente ocorre mutações com ganho de função de *Notch1* em leucemia, indicando que esta via tem um importante papel na patogênese deste tipo de câncer, sendo este um exemplo de câncer humano onde *Notch* age como uma oncoproteína. Foi mostrado também que esta via de sinalização é requerida para manutenção do crescimento de uma linhagem celular leucêmica gerada por indução de *Notch* (Weng *et al.*, 2003). Também, uma ligação direta foi encontrada entre ativação de *Notch1* e proteção das células tumorais da apoptose induzida por quimioterápicos (Jundt *et al.*, 2003; Nefedova *et al.*, 2004), o que pode estar relacionado com uma pior resposta clínica ao tratamento. Em tumores sólidos, alto nível de expressão de *Notch1* foi associado com um estágio avançado, metástase e prognóstico ruim em câncer de mama (Parr *et al.*, 2004). Portanto, sendo a via de *Notch* importante na patogênese, manutenção e prognóstico clínico da leucemia, e o gene *KIAA0090* ser alterado por intervenção nesta via (Dohda *et al.*, 2007), decidimos realizar um ensaio piloto para analisar se há alguma relação entre expressão do gene em estudo e o prognóstico clínico de paciente com Leucemia Linfóide Aguda. Para isso, obtivemos amostras de cDNAs derivados de pacientes diagnosticados com este tipo tumoral. Não observamos relação entre a expressão do gene em estudo e idade, sexo, contagem de glóbulos brancos, risco,

imunofenótipo, resposta e situação atual do paciente. Análises moleculares destas amostras não disponíveis até o momento, como mutações e expressão de genes já conhecidos importantes no desenvolvimento e manutenção deste tipo tumoral, permitiria avaliar com mais precisão o papel do gene *KIAA0090* em leucemia, e sua relação com vias moleculares tais como a via de *Notch* citada acima.

6. Efeito do silenciamento do gene *KIAA0090*.

Dados anteriores do nosso grupo indicam que a superexpressão da proteína KIAA0090 fusionada à EGFP interfere com a viabilidade de células de melanoma humano, induzindo morte celular apoptótica, já que as células são positivas para Anexina V. Porém, dependendo da posição que EGFP é fusionada à proteína de interesse, observamos diferentes padrões de distribuição celular, mesmo assim as duas construções interferem com a viabilidade. Se a proteína fluorescente é fusionada à região N-terminal da KIAA0090 (EGFP-KIAA0090), esta proteína de fusão se localiza na mitocôndria. Já fusionada à região C-terminal (KIAA0090-EGFP), esta proteína de fusão localiza-se no retículo endoplasmático. Pelos dados obtidos, parece haver um enovelamento incorreto da proteína de fusão, que pode impedir o endereçamento correto, desta forma interferindo com sua função. Esta proteína de fusão, por estar em quantidades maiores que a proteína endógena, poderia agir como um dominante negativo, e o efeito indutor de morte que observamos pela superexpressão pode ser, na verdade, consequência da ausência de função da proteína KIAA0090.

Para investigarmos essa possibilidade utilizamos siRNA para promovermos o *knockdown* do gene, e desta forma avaliarmos o efeito sobre a viabilidade celular. Assim como no caso da superexpressão das proteínas fusionadas à EGFP, o silenciamento do gene *KIAA0090* causa aumento na taxa de morte na linhagem celular de melanoma metastático WM9 (Figura 21), morte essa que parece ser do tipo

apoptótica, já que as células são positivas para Anexina V (Figura 22). Portanto, o efeito indutor de morte que tínhamos observado com a superexpressão das proteínas de fusão é na verdade consequência da ausência de função promovida pela superexpressão de um dominante negativo nestas células, e a proteína de fusão interfere com sua localização e possivelmente com a função.

Como dito anteriormente, o ortólogo do gene *KIAA0090* em *S. cerevisiae* foi caracterizado como um gene cuja deleção ativa a via de resposta ao mal-enovelamento de proteína do retículo endoplasmático (UPR). Jonikas e colaboradores (Jonikas *et al.*, 2009) usaram um sensor endógeno de resposta a proteínas mal enoveladas, para identificar genes com função no enovelamento protéico no ER, avaliando esta resposta em mutantes simples e duplos de *Saccharomyces cerevisiae*, identificando fatores conservados críticos para enovelamento de proteína no ER. Entre eles, identificaram um complexo transmembrana composto por seis proteínas, YCL045C, YJR088C, YKL207W, YGL231C, KRE27, YLL014, a primeira correspondendo ao ortólogo do gene *KIAA0090* em *S. cerevisiae*. Os autores o nomearam de Complexo Protéico da Membrana do ER (EMC), e os genes de EMC1 a EMC6, sendo o ortólogo do gene em estudo chamado de EMC1.

Enovelamento protéico no ER é um processo complexo implicado em várias doenças, e seu funcionamento eficiente é essencial para a maioria das atividades e sobrevivência celular. Condições que interferem com a função do ER levam à acumulação e agregação de proteínas mal enoveladas, que são detectadas por receptores e iniciada uma resposta a proteínas mal enoveladas (UPR), para resgatar a função normal do ER. Se o estresse é prolongado ou a resposta UPR falha, ocorre indução da morte celular apoptótica (Szegezdi *et al.*, 2006). Os dados do estudo de Jonikas e colaboradores sugerem que a perda dos genes do EMC leva à acumulação de proteínas

mal enoveladas no ER e, portanto, indução de UPR. Este e outros tipos de estresses no ER levam à ativação de JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*) e indução de CHOP (*C/EBP homologous protein*), e ambas eliminam o efeito anti-apoptótico de BCL2. JNK também fosforila Bim, liberando-a do citoesqueleto e ativando-a. Em conjunto, estas alterações permitem a ativação de Bax e Bak, transmitindo sinais do ER para a mitocôndria, induzindo a fase de execução da morte. As caspases são ativadas possivelmente na membrana do ER, assim como no apoptossomo, após transmissão do sinal de morte para a mitocôndria e liberação de citocromo c (Szegezdi *et al.*, 2006). Portanto, a apoptose que observamos em decorrência do silenciamento do gene *KIAA0090* provavelmente é resultante do acúmulo de proteínas mal enoveladas no ER, ativação de UPR e sinalização de morte via mitocondrial, conforme descrito acima.

Para checarmos se nestas células silenciadas havia ativação de UPR, analisamos a expressão de duas moléculas-chave na indução desta resposta, GRP78 e CHOP. Não encontramos um padrão de ativação de UPR quando comparamos as células não-transfectadas, siRNA negativo e siKIAA0090 (Figuras 23 e 24). No entanto, para melhor avaliarmos o efeito do silenciamento do gene *KIAA0090* sobre a ativação de UPR, deveríamos induzir esta resposta e compararmos os níveis de ativação nas células silenciadas ou não. Desta forma, as células de melanoma metastático WM9 foram tratadas com duas drogas capazes de induzir UPR. Brefeldina A que inibe o transporte de proteínas do retículo endoplasmático para o aparelho de Golgi e induz um transporte retrógrado, levando ao acúmulo de proteínas no retículo e ativação de UPR. MG132 é uma droga inibidora de proteassomo, que prejudica a degradação de proteínas associada ao retículo endoplasmático (ERAD), aumenta a carga de proteínas no retículo e ativa UPR. Liu e colaboradores (Liu *et al.*, 1992) mostraram que o tratamento com BFA induz aumento na expressão de *GRP78*, ao passo que no trabalho de Kwok e

colaboradores (Kwok *et al.*, 2008) BFA mostrou-se capaz de induzir expressão de *CHOP*. No trabalho de Wang (Wang *et al.*, 2006), o tratamento com MG132 mostrou-se capaz de induzir *GRP78* e *CHOP*. Da mesma forma que nos trabalhos citados acima, a indução da resposta ao mal-enovelamento protéico do retículo endoplasmático foi eficiente após o tratamento por oito horas com as drogas BFA e MG132, pois as células WM9 não-transfectadas tratadas com as drogas apresentaram uma expressão de *GRP78* e *CHOP* consideravelmente maior que as células WM9 não transfectadas e não-tratadas (Figuras 26 e 27, respectivamente). O silenciamento do gene *KIAA0090* por si só não foi capaz de induzir expressão de *GRP78* e *CHOP*, ou seja, de ativar UPR, pois não houve diferença na expressão destas duas moléculas quando comparamos células silenciadas ou não (Figuras 23 e 24). Isto pode ser justificado pela presença de outras moléculas e vias de sinalização redundantes, isto é, a ausência de função de uma proteína pode ser complementada por outra que faça parte do mesmo processo celular. Três diferentes moléculas presentes na membrana do retículo endoplasmático (*PERK*, *IRE1 α* e *ATF6 α*) são responsáveis por ativar UPR, induzindo expressão de *GRP78* e *CHOP*, portanto caso a proteína *KIAA0090* faça parte de uma destas vias, as duas outras podem suprimir o efeito da alteração na outra.

No entanto, quando tratamos estas células silenciadas ou não com duas drogas capazes de induzir UPR, observamos que as células com *knockdown* *KIAA0090* foram mais sensíveis à ativação de UPR. No caso das células tratadas com BFA, houve maior indução de *GRP78* nas células siKIAA0090 quando comparada com os controles. O tratamento com MG132 não gerou diferença significativa na expressão de *GRP78* entre as células silenciadas ou não para *KIAA0090*. Para ativação de *CHOP*, observamos um efeito inverso. Não houve diferença na indução de *CHOP* entre as células silenciadas ou não para *KIAA0090* após o tratamento com BFA, porém as células siKIAA0090

apresentaram maior indução de *CHOP* após tratamento com MG132 (Figuras 26 e 27). Destes resultados concluímos que células silenciadas para o gene *KIAA0090* são mais sensíveis à indução de UPR após tratamento com as drogas Brefeldina A e MG132, reforçando o possível envolvimento desta proteína na resposta a proteínas mal-enoveladas no retículo endoplasmático, assim como ocorre no ortólogo em *S. cerevisiae*. Este envolvimento pode ser direto, ou através de outra via que interfira na UPR, como a via de degradação protéica associada ao retículo endoplasmático (ERAD).

No trabalho descrito por Jonikas (Jonikas *et al.*, 2009), quando realizaram dupla mutação do ortólogo *KIAA0090* (*EMC1*) em combinação com outros genes, identificaram alguns genes que agravavam a ativação de UPR, isto é, genes que provavelmente estão envolvidos na mesma via molecular. Dentre estes genes merecem destaque *RPN4*, *UBC7* e *CUE1*. *RPN4* é um fator de transcrição que estimula a expressão de genes de proteassomo e o principal responsável pela indução de degradação protéica associada ao retículo endoplasmático (ERAD). *UBC7* é uma enzima conjugadora de ubiquitina também envolvida em ERAD, que por sua vez requer *CUE1* (proteína de membrana do retículo endoplasmático) para o recrutamento das proteínas a serem degradadas para a membrana do retículo endoplasmático e subsequente translocação destas para o citosol, onde são ubiquitinadas e degradadas. Desta forma, todos os dados indicam que *EMC1* tem uma importante participação no mecanismo de enovelamento e/ou degradação de proteínas de membrana no ER, e os dados de localização da proteína humana indicam sua localização no retículo endoplasmático, reforçando a hipótese de participação na via UPR - ERAD.

Este mecanismo de ERAD é ativado para remover proteínas mal-enoveladas no retículo endoplasmático e direcioná-las para degradação, desta forma diminuindo a carga protéica no lúmen do ER e permitindo que a UPR resgate a função normal do

retículo. Se a via de ERAD encontra-se prejudicada, pode ocorrer maior indução de UPR devido ao acúmulo de proteínas no lúmen do ER, as quais normalmente seriam degradadas. Se ao mesmo tempo falta um chaperona, a situação se agrava e a célula morre. Portanto, a ativação de UPR na deleção EMC1 mostra que a ortóloga KIAA0090 parece realmente agir como uma proteína que auxilia o enovelamento de outras proteínas no ER. Contudo, outra possibilidade é que ela faça parte da via de degradação protéica associada ao retículo endoplasmático (ERAD), pois a indução aumentada de UPR, no mutante duplo, poderia ser decorrente da função prejudicada de degradação.

Experimentos de superexpressão e *knockdown* confirmam o papel pró-apoptótico das proteínas envolvidas em UPR e ERAD, agindo principalmente sobre proteínas da família BCL2. Sinais liberados do ER para a mitocôndria estimulam apoptose induzida por estresse do ER que, similar ao que ocorre para a apoptose mediada pela mitocôndria, também é controlada pelas proteínas da família BCL-2 (Boya *et al*, 2002; Hacki *et al*, 2000; Zong *et al*, 2003). Porém muitas questões sobre apoptose induzida por estresse no ER ainda não são compreendidas, como por exemplo, quais caspases são envolvidas, se há algum evento pró-apoptótico que controla os outros ou se existem diversas vias pró-apoptóticas que funcionam simultaneamente para induzir a morte, e outras mais. O que sabemos é que a morte celular induzida por estresse do ER é uma nova via apoptótica, mas não sabemos o impacto desta via na patologia de algumas doenças, incluindo o câncer. Um enfoque mais aprofundado neste tema é de grande importância para decifrarmos as complexidades desta via de morte celular.

VI) CONCLUSÕES

- ✓ Os resultados de RT-PCR indicam que melanócitos e linhagens celulares de melanoma humano provavelmente expressam, pelo menos em maior abundância, o RNA correspondente à RefSeq do gene *KIAA0090*.
- ✓ Verificamos uma tendência de aumento de expressão nas linhagens celulares de melanoma humano que representam as fases mais avançadas da progressão tumoral
- ✓ Interessantemente, ocorre uma queda de expressão do gene *KIAA0090* durante a transição de nevos para melanoma primário, e não houve diferença significativa de expressão entre melanoma primário e metastático
- ✓ Não há relação entre mutação BRAFV600E e expressão do gene *KIAA0090*, em nenhum dos grupos de amostras analisadas, linhagens celulares de melanoma humano e amostras de biópsias de nevos, melanoma primário e melanoma metastático
- ✓ O gene *KIAA0090* apresenta uma ilha CpG na região promotora, e o tratamento de linhagens celulares de melanoma humano com drogas inibidora de metilação do DNA e desacetilação de histonas interferiu com a expressão do gene, sugerindo que modificações epigenéticas podem controlar a expressão do gene em estudo
- ✓ Análises *in silico* e *in vitro* sugerem uma relação direta entre superexpressão do gene *KIAA0090* e menor probabilidade de sobrevida em pacientes com glioblastoma, apesar de não haver diferença de expressão entre substância branca e glioblastoma

✓ Em amostras de Leucemia Linfóide Aguda não encontramos relação entre a expressão do gene *KIAA0090* e idade, sexo, contagem de glóbulos brancos, risco, imunofenótipo, resposta e situação atual do paciente.

✓ O processo de *knockdown* do gene *KIAA0090* foi eficiente em todos os períodos analisados.

✓ O *knockdown* do gene *KIAA0090* levou a um aumento na morte celular (células positivas para PI), morte que parece ser do tipo apoptótica, já que as células inviáveis são positivas para Anexina V

✓ O silenciamento do gene *KIAA0090* por si só não foi capaz de induzir expressão de *GRP78* e *CHOP*, ou seja, de ativar UPR. No entanto, quando tratamos estas células silenciadas ou não com duas drogas capazes de induzir UPR, observamos que as células com *knockdown* *KIAA0090* foram mais sensíveis à ativação de UPR.

VII) BIBLIOGRAFIA

- ALBERTS B., BRAY D., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WATSON JD. (2004). *Biologia Molecular da Célula. 4ª edição. Artmed editora, Porto Alegre.*
- AL-HAJJ M, BECKER MW, WICHA M, WEISSMAN I, AND CLARKE MF (2004) Therapeutic implications of cancer stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 14, 43-47.
- BAE DS, BLAZANIN N, LICATA M, LEE J, GLICK AB. Tumor suppressor and oncogene actions of TGFbeta1 occur early in skin carcinogenesis and are mediated by Smad3. *Mol Carcinog.* 2008 Oct 21
- BALCH CM, MURAD TM, SOONG SJ, INGALLS AL, HALPERN NB, MADDOX WA. A multifactorial analysis of melanoma. Prognostic histopathological features comparing Clark's and Breslow's staging methods. *Ann Surg* 1978;188:732–42.
- BANDYOPADHYAY D, MISHRA A, MEDRANO EE (2004) Overexpression of histone deacetylase 1 confers resistance to sodium butyrate-mediated apoptosis in melanoma cells through a p53-mediated pathway. *Cancer Res* 64: 7706–10
- BAO, S., WU, Q., SATHORNSUMETEE, S., HAO, Y., LI, Z., HJELMELAND, A.B., SHI, Q., MCLENDON, R.E., BIGNER, D.D., AND RICH, J.N. (2006b). Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor. *Cancer Res.* 66, 7843–7848.
- BARNHILL RL, FINE JA, ROUSH GC, BERWICK M. Predicting fiveyear outcome for patients with cutaneous melanoma in a population-based study. *Cancer* 1996;78:427–32.
- BENNETT DC. Human melanocyte senescence and melanoma susceptibility genes. *Oncogene.* 2003;22:3063–3069
- BERNARDS, R. AND WEINBERG, R.A. (2002). Metastasis genes: A progression puzzle. *Nature*, 418, 823.
- BHOWMICK N A NEILSON E G AND MOSES H L. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression; *Nature (London)* 2004.432 332–337

- BIRD A: DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002, 16:6-21.
- BIRD, A.P. (1996). The relationship of DNA methylation to cancer. *Cancer Surv.*, 28, 87–101.
- BOYA P, COHEN I, ZAMZAMI N, VIEIRA HL, KROEMER G (2002) Endoplasmic reticulum stress-induced cell death requires mitochondrial membrane permeabilization. *Cell Death Differ* 9: 465–467
- BRAY SJ. 2006. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 7:678–89
- BRESLOW A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* 1970;172:902–8.
- BRYKSIN AV, LAKTIONOV PP.(2008). Role of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in vesicular transport from golgi apparatus to endoplasmic reticulum. *Biochemistry (Mosc).* 2008 Jun;73(6):619-25
- CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK. <http://cancergenome.nih.gov/>
- CHEN ZJ, PIKAARD CS: Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription: a role for DNA methylation and histone modification in nucleolar dominance. *Genes Dev* 1997, 11:2124-2136
- CHIN L, MERLINO G, DEPINHO RA. Malignant melanoma: modern black plague and genetic black box. *Genes Dev.* 1998;12:3467–3481
- CLARK WH JR., FROM L, BERNARDINO EA, MIHM MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res* 1969;29:705–26.
- CLEIKAM, A HUFNAGEL, M SCHARTL AND S MEIERJOHANN. Oncogene activation in melanocytes links reactive oxygen to multinucleated phenotype and senescence. *Oncogene.* 2008 Nov 27;27(56):7070-82.
- DAVIES H, BIGNELL GR, COX C, STEPHENS P, EDKINS S, CLEGG S ET AL. (2002) Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417:949–54

- de SNOO FA, HAYWARD NK (2005) Cutaneous melanoma susceptibility and progression genes. *Cancer Lett* 230:153–86
- DOHDA T, MALJUKOVA A, LIU L, HEYMAN M ET AL. Notch signaling induces SKP2 expression and promotes reduction of p27Kip1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Exp Cell Res* 2007 Aug 15;313(14):3141-52.
- DONNENBERG, V.S. AND DONNENBERG, A.D. (2005) Multiple drug resistance in cancer revisited: the cancer stem cell hypothesis. *J. Clin. Pharmacol.* 45:872-877.
- DOU J, PAN M, WEN P, LI Y, TANG Q, CHU L, ZHAO F, JIANG C, HU W, HU K, GU N. Isolation and identification of cancer stem-like cells from murine melanoma cell lines. *Cell Mol Immunol.* 2007;4:467–472.
- ENA WANG, LANCE D. MILLER, GALEN A. OHNMACHT, SIMONE MOCELLIN, AINHOA PEREZ-DIEZ, DAVID PETERSEN, YINGDONG ZHAO, RICHARD SIMON, JOHN I. POWELL, ESTHER ASAKI, H. RICHARD ALEXANDER, PAUL H. DURAY, MEENHARD HERLYN, NICHOLAS P. RESTIFO, EDISON T. LIU, STEVEN A. ROSENBERG, AND FRANCESCO M. MARINCOLA (2002). Prospective Molecular Profiling of Melanoma Metastases Suggests Classifiers of Immune Responsiveness. *Cancer Res.* July 1; 62(13): 3581–3586
- EVA SZEGEZDI, SUSAN E. LOGUE, ADRIENNE M. GORMAN & AFSHIN SAMALI. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO reports* VOL 7 / NO 9 / 2006
- EWING RM, CHU P, ELISMA F, LI H, TAYLOR P, CLIMIE S, MCBROOM-CERAJEWSKI L, ROBINSON MD, O'CONNOR L, LI M, TAYLOR R, DHARSEE M, HO Y, HEILBUT A, MOORE L, ZHANG S, ORNATSKY O, BUKHMAN YV, ETHIER M, SHENG Y, VASILESCU J, ABU-FARHA M, LAMBERT JP, DUEWEL HS, STEWART II, KUEHL B, HOGUE K, COLWILL K, GLADWISH K, MUSKAT B, KINACH R, ADAMS SL, MORAN MF, MORIN GB, TOPALOGLOU T, FIGEYS D.

- Large-scale mapping of human protein-protein interactions by mass spectrometry. *Mol Syst Biol.* 2007;3:89.
- FANG, D., NGUYEN, T.K., LEISHEAR, K., FINKO, R., KULP, A.N., HOTZ, S., VAN BELLE, P.A., XU, X., ELDER, D.E., HERLYN, M.: A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res* 65:9328-9337, 2005.
- FIDLER IJ, KIM SJ, LANGLEY RR. The role of the organ microenvironment in the biology and therapy of cancer metastasis. *J Cell Biochem.* 2007;101:927–936.
- FIDLER, I.J. Critical determinants of metastasis. *Semin. Cancer Biol.* (2002) 12, 89–96.
- FIDLER, I.J. The pathogenesis of cancer metastasis: the ‘seed and soil’ hypothesis revisited *Nat. Rev. Cancer* (2003)3, 453–458.
- FROMMER, M., MCDONALD, L.E., MILLAR, D.S., COLLIS, C.M., WATT, F., GRIGG, G.W., MOLLOY, P.L. AND PAUL, C.L. (1992) A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 1579–1583.
- GALLAGHER WM, BERGIN OE, RAFFERTY M, KELLY ZD, NOLAN IM, FOX EJ ET AL. (2005) Multiple markers for melanoma progression regulated by DNA methylation: insights from transcriptomic studies. *Carcinogenesis* 26:1856–67
- GARNIS C, BUYS TPH, LAM WL. Genetic alteration and gene expression modulation during cancer progression. *Molecular Cancer* 2004, 3:9
- GRAY-SCHOPFER VC, CHEONG SC, CHONG H, CHOW J, MOSS T, ABDEL-MALEK ZA ET AL. (2006). Cellular senescence in naevi and immortalization in melanoma: a role for p16? *Br J Cancer* 95:496–505
- GRICHNIK JM, BURCH JA, SCHULTEIS RD, SHAN S, LIU J, DARROW TL, VERVAERT CE, SEIGLER HF. Melanoma, a tumor based on a mutant stem cell? *J Invest Dermatol* 2006; 126: 142-153.

- GUBSER C, BERGAMASCHI D, HOLLINSHEAD M, LU X, VAN KUPPEVELD FJ, SMITH GL. A new inhibitor of apoptosis from vaccinia virus and eukaryotes. *PLoS Pathog.* 2007 Feb;3(2):e17.
- HACKI J, EGGER L, MONNEY L, CONUS S, ROSSE T, FELLAY I, BORNER C (2000). Apoptotic crosstalk between the endoplasmic reticulum and mitochondria controlled by bcl-2. *Oncogene* 19: 2286–2295
- HAKE SB, XIAO A, ALLIS CD (2004). Linking the epigenetic “language” of covalent histone modifications to cancer. *Br J Cancer*;90:761–9.
- HOCKER T, TSAO H (2007) Ultraviolet radiation and melanoma: a systematic review and analysis of reported sequence variants. *Hum Mutat* 28:578–88
- HOEK K, RIMM DL, WILLIAMS KR, ZHAO H ET AL. Expression profiling reveals novel pathways in the transformation of melanocytes to melanomas. *Cancer Res* 2004 Aug 1;64(15):5270-82
- HOON DS, SPUGNARDI M, KUO C, HUANG SK, MORTON DL, TABACK B (2004) Profiling epigenetic inactivation of tumor suppressor genes in tumors and plasma from cutaneous melanoma patients. *Oncogene* 23:4014–22
- HUANG X, SOONG SJ, MCCARTHY WH, URIST MM, BALCH CM. Classification of localized melanoma by the exponential survival trees method. *Cancer* 1997;79:1122–8.
- HUSSEIN MR, HAEMEL AK, WOOD GS (2003) Apoptosis and melanoma: molecular mechanisms. *J Pathol* 199:275–288
- INCE TA, RICHARDSON AL, BELL GW, SAITOH M, GODAR S, KARNOUB AE, IGLEHART JD, WEINBERG RA. Transformation of different human breast epithelial cell types leads to distinct tumor phenotypes. *Cancer Cell.* 2007;12:160–170.
- JAENISCH, R. AND BIRD, A. (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat. Genet.*, 33, 245–254
- JI ZHANG, ARTHUR A. GLATFELTER, RAYMOND TAETLE AND JEFFREY M. TRENT (1999). Frequent Alterations of Evolutionarily Conserved Regions of Chromosome 1 in

Human Malignant Melanoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, Volume 111, Issue 2,
Pages 119-123

- JOHNSTONE, R.W. (2002). Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 1, 287–299.
- JONES, P.A. AND BAYLIN, S.B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat. Rev. Genet.*, 3, 415–428.
- JONES, P.A. AND LAIRD, P.W. (1999). Cancer epigenetics comes of age. *Nat. Genet.*, 21, 163–167.
- JONIKAS MC, COLLINS SR, DENIC V, OH E, QUAN EM, SCHMID V, WEIBEZAHN J, SCHWAPPACH B, WALTER P, WEISSMAN JS, SCHULDINER M. Comprehensive characterization of genes required for protein folding in the Endoplasmic Reticulum. *Science* 323, 1693 (2009)
- JUNDT F, ANAGNOSTOPOULOS I, FORSTER R, MATHAS S, STEIN H, DORKEN B. Activated Notch1 signaling promotes tumor cell proliferation and survival in Hodgkin and non-Hodgkin large cell lymphoma. *Blood* 2002;99:3398–403.
- KAWAMATA H, FUJIMORI T, IMAI Y. TSC-22 (TGF- β Stimulated Clone-22): A Novel Molecular Target for Differentiation-Inducing Therapy in Salivary Gland Cancer. *Current Cancer Drug Targets*, Volume 4, Number 6, September 2004, pp. 521-529(9)
- KELLY WK, O'CONNOR OA, MARKS PA. (2002) Histone deacetylase inhibitors: from target to clinical trials. *Expert Opin Investig Drugs*;11:1695–713
- KLEIN WM, WU BP, ZHAO S, WU H, KLEIN-SZANTO AJ, TAHAN SR. Increased expression of stem cell markers in malignant melanoma. *Mod Pathol* 2007;20:102-107
- KONDO Y., SHEN L. AND ISSA J.P. (2003). Critical role of histone methylation in tumor suppressor gene silencing in colorectal cancer. *Mol. Cell. Biol.*, 23, 206–215.
- KWOK SCM, DASKAL I (2008). Brefeldin A activates CHOP promoter at the AARE, ERSE and AP-1 elements. *Mol Cell Biochem* (2008) 319:203–208

- LEIKAM C, HUFNAGEL A, SCHARTL M AND MEIERJOHANN S. Oncogene activation in melanocytes links reactive oxygen to multinucleated phenotype and senescence. *Oncogene* (2008) 27, 7070–7082.
- LIU ES., OU JH, LEE AS (1992). Brefeldin A as a Regulator of grp78 Gene Expression in Mammalian Cell. *The journal of biological chemistry* vol. 267, no. 10, issue of april 5, pp. 7128-7133, 1992
- LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Method. *Methods* 25, 402–408
- LOPES MM (2008). Caracterização da proteína KIAA0090 sugere sua associação com mitocôndria e retículo endoplasmático e seu envolvimento em apoptose. *Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP*.
- LUND A.H. AND VAN LOHUIZEN, M. (2004). Epigenetics and cancer. *Genes Dev.*, 18, 2315–2335.
- LUO X, DING L, XU J, CHEGINI N. Gene expression profiling of leiomyoma and myometrial smooth muscle cells in response to transforming growth factor-beta. *Endocrinology*. 2005 Mar;146(3):1097-118.
- MARTIN C. JONIKAS, SEAN R. COLLINS, VLADIMIR DENIC, EUGENE OH, ERIN M. QUAN, VOLKER SCHMID, JIMENA WEIBEZAHN, BLANCHE SCHWAPPACH, PETER WALTER, JONATHAN S. WEISSMAN, AND MAYA SCHULDINER. Comprehensive Characterization of Genes Required for Protein Folding in the Endoplasmic Reticulum. *Science* 27 March 2009:Vol. 323. no. 5922, pp. 1693 - 1697
- MAZZATTI DJ, WHITE A, FORSEY RJ, POWELL JR, PAWELEC G. Gene expression changes in long-term culture of T-cell clones: genomic effects of chronic antigenic stress in aging and immunosenescence. *Aging Cell*. 2007 April 1; 6(2): 155–163
- MILLER AJ, MIHM MC JR (2006) Melanoma. *N Engl J Med* 355:51–65
- MILNER LA, BIGAS A. Notch as a mediator of cell fate determination in hematopoiesis: evidence and speculation. *Blood* 1999;93:2431–48.

- MONZANI E, FACCHETTI F, GALMOZZI E, CORSINI E, BENETTI A, CAVAZZIN C, GRITTI A, PICCININI A, PORRO D, SANTINAMI M, INVERNICI G, PARATI E, ALESSANDRI G, LA PORTA CA: Melanoma contains CD133 and ABCG2 positive cells with enhanced tumorigenic potential. *Eur J Cancer* 2007, 43:935-946.
- MOOI WJ, PEEPER DS (2006) Oncogene-induced cell senescence—halting on the road to cancer. *N Engl J Med* 355:1037–46
- MUTHUSAMY V, DURAISAMY S, BRADBURY CM, HOBBS C, CURLEY DP, NELSON B ET AL. (2006). Epigenetic silencing of novel tumor suppressors in malignant melanoma. *Cancer Res* 66:11187–93
- NEFEDOVAY, CHENG P, ALSINAM, DALTONWS, GABRILOVICH DI. Involvement of Notch-1 signaling in bonemarrow stroma-mediated de novo drug resistance of myeloma and other malignant lymphoid cell lines. *Blood* 2004;103:3503–10.
- OHISHI K, KATAYAMA N, SHIKU H, VARNUM-FINNEY B, BERNSTEIN ID. Notch signalling in hematopoiesis. *Semin Cell Dev Biol* 2003;14:143–50.
- ORDWAY, J.M. AND CURRAN, T. (2002) Methylation matters: modeling a manageable genome. *Cell Growth Differ.* 13, 149–162.
- OSHITA F, MATSUKUMA S, YOSHIHARA M, SAKUMA Y, OHGANE N, KAMEDA Y, SAITO H, YAMADA K, TSUCHIYA E AND MIYAGI Y. Novel heteroduplex method using small cytology specimens with a remarkably high success rate for analysing EGFR gene mutations with a significant correlation to gefitinib efficacy in non-small-cell lung cancer. *British Journal of Cancer* (2006) 95, 1070–1075.
- PARR C, WATKINS G, JIANG WG. The possible correlation of Notch-1 and Notch-2 with clinical outcome and tumour clinicopathological parameters in human breast cancer. *Int J Mol Med* 2004;14:779–86.
- PEROU CM, SORLIE T, EISEN MB, ET AL. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;406:747–52

- POLLOCK PM, HARPER UL, HANSEN KS, YUDT LM, STARK M, ROBBINS CM, MOSES TY, HOSTETTER G, WAGNER U, KAKAREKA J, ET AL. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat. Genet.* 2003;33:19–20
- RAMASWAMY S, ROSS KN, LANDER ES, GOLUB TR. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet* 2003;33:49–54
- REYA, T., MORRISON, S. J., CLARKE, M. F., & WEISSMAN, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414:105–111
- ROTHHAMMER T, BOSSERHOFF AK (2007) Epigenetic events in malignant melanoma. *Pigment Cell Res* 20:92–111
- SCHUCHTER L, SCHULTZ DJ, SYNNESTVEDT M, TROCK BJ, GUERRY D, ELDER DE, ET AL. A prognostic model for predicting 10-year survival in patients with primary melanoma. *Ann Intern Med* 1996;125:369–75.
- SHIBANUMA, M., KUROKI, T. AND NOSE, K. (1992) Isolation of a gene encoding a putative leucine zipper structure that is induced by transforming growth factor beta 1 and other growth factors. *J. Biol. Chem.* 267, 10219–10224.
- SMITH AP, HOEK K, BECKER D. Whole-genome expression profiling of the melanoma progression pathway reveals marked molecular differences between nevi/melanoma in situ and advanced-stage melanomas. *Cancer Biol Ther* 2005 Sep;4(9):1018–29.
- SMITH AP, WEERARATNA AT, SPEARS JR, MELTZER PS, BECKER D. SAGE identification and fluorescence imaging analysis of genes and transcripts in melanomas and precursor lesions. *Cancer Biol Ther* 2004; 3: 104–09.
- SORLIE T, PEROU CM, TIBSHIRANI R, ET AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:10869–74.
- SOTILLO R, GARCIA JF, ORTEGA S, MARTIN J, DUBUS P, BARBACID M ET AL. (2001) Invasive melanoma in Cdk4-targeted mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:13312–7

- SOUSA JF (2005). Microarranjo de cDNA ORESTES e bibliotecas subtrativas aplicados a modelo de melanoma humano indicam novos genes com potencial importância na progressão tumoral. *Tese de doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP*
- SUSAN E. ZABIEROWSKI AND MEENHARD HERLYN. Learning the ABCs of Melanoma-Initiating Cells. *Cancer Cell* 13, March 2008
- SZEGEZDI E, LOGUE SE, GORMAN AM, SAMALI A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO reports* 7, 9, 880–885 (2006)
- THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455, 1061–1068 (23 October 2008)
- THIERY, J.P. (2002). *Nat. Rev. Cancer* 2, 442–454
- UCHIDA, D., OMOTEHARA, F., NAKASHIRO, K., TATEISHI, Y., HINO, S., BEGUM, N.M., FUJIMORI, T. AND KAWAMATA, H. (2003). Posttranscriptional regulation of TSC-22 gene by TGF-beta 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305, 846–854.
- VAN DOORN R, GRUIS NA, WILLEMZE R, VAN DER VELDEN PA, TENSEN CP (2005) Aberrant DNA methylation in cutaneous malignancies. *Semin Oncol* 32:479–87
- VAN 'T VEER LJ, DAI H, VAN DE VIJVER MJ, ET AL. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002;415:530–6
- WAJAPYEE N, SERRA RW, ZHU X, MAHALINGAM M, GREEN MR. Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7. *Cell*. 2008 Feb 8;132(3):363–74.
- WANG C, WANG MW, TASHIRO S, ONODERA S, IKEJIMA T (2005) Roles of SIRT1 and phosphoinositide 3-OH kinase/protein kinase C pathways in evodiamine-induced human melanoma A375-S2 cell death. *J Pharmacol Sci* 97:494–500

- WANG HQ, DU ZX, ZHANG HY, GAO XD (2006). Different Induction of GRP78 and CHOP as a Predictor of Sensitivity to Proteasome Inhibitors in Thyroid Cancer Cells. *Endocrinology* 148(7):3258–3270
- WEERARATNA AT, BECKER D, CARR KM, DURAY PH, ROSENBLATT KP, YANG S, CHEN Y, BITTNER M, STRAUSBERG RL, RIGGINS GJ, WAGNER U, KALLIONIEMI OP, TRENT JM, MORIN PJ, MELTZER PS. Generation and analysis of melanoma SAGE libraries: SAGE advice on the melanoma transcriptome. *Oncogene* 2004; 23: 2264-74.
- WEIGELT B, HU Z, HE X, ET AL. Molecular portraits and 70-gene prognosis signature are preserved throughout the metastatic process of breast cancer. *Cancer Res* 2005;65:9155–8.
- WENG AP, FERRANDO AA, LEE W, MORRIS JP, SILVERMAN LB, ET AL. 2004. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* 306:269–71
- WENG AP, NAM Y, WOLFE MS, PEAR WS, GRIFFIN JD, ET AL. 2003. Growth suppression of pre-T acute lymphoblastic leukemia cells by inhibition of Notch signaling. *Mol. Cell. Biol.* 23:655–64
- WICHA, M.S., LIU, S., AND DONTU, G. Cancer Stem Cells: An Old Idea—A Paradigm Shift. *Cancer Res.* (2006) 66, 1883–1890.
- ZAIDI MR, DAY CP, MERLINO G. From UVs to metastases: modeling melanoma initiation and progression in the mouse. *J Invest Dermatol.* 2008 Oct;128(10):2381-91
- ZHOU J, ZHU T, HU C, LI H, CHEN G, XU G, WANG S, ZHOU J, MA D. Comparative genomics and function analysis on B11 family. *Comput Biol Chem.* 2008 Jun;32(3):159-62.
- ZHOU Y, SANTORO R, GRUMMT I: The chromatin remodeling complex NoRC targets HDAC1 to the ribosomal gene promoter and represses RNA polymerase I transcription. *EMBO J* 2002, 21:4632-4640.

ZONG WX, LI C, HATZIVASSILIOU G, LINDSTEN T, YU QC, YUAN J, THOMPSON CB

(2003). Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis.

J Cell Biol 162: 59–69.