Universidade de São Paulo
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**"Caracterização da distribuição subcelular e tecidual da
proteína KIAA0090 e estudos de seu envolvimento em
câncer e resposta a estresses"**

Roberto Augusto Silva Molina

Dissertação de Mestrado a ser apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de Mestre em Ciências: Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Enilza Maria Espreafico

RIBEIRÃO PRETO
2010

Ficha Catalográfica

Molina, Roberto Augusto Silva

"Caracterização da distribuição subcelular e tecidual da proteína KIAA0090 e estudos de seu envolvimento em câncer e resposta a estresses", Ribeirão Preto, 2010.

85p.: il.; 30cm

Dissertação de mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Espreafico, Enilza Maria.

1- câncer; 2- KIAA0090; 3- estresse; 4- chaperona; 5- anticorpo.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Roberto Augusto Silva Molina

"Caracterização da distribuição subcelular e tecidual da proteína KIAA0090 e estudos de seu envolvimento em câncer e resposta a estresses"

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre. Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular.

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Professor Dr. Daniel Guimarães Tiezzi

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP

Assinatura: _____

Professor Dr. Roger Frigério de Castilho

Instituição: Faculdade de Ciências Médicas /UNICAMP

Assinatura: _____

Professora Dra. Enilza Maria Espreafico

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP

Assinatura: _____

Dedico esta dissertação à minha madrinha Rita Maria Silva,
a quem Deus chamou para junto de si, por todo seu amor,
ensinamentos e por me mostrar que jamais devemos deixar de
lutar por aquilo que queremos...

Agradecimentos...

Primeiramente a Deus, que me concedeu o dom da vida e a quem devo todo o mérito deste trabalho.

À Profa. Dra. Enilza Maria Espreafico, por me receber de portas abertas em seu laboratório, por todo ensinamento e ajuda sempre que precisei e pela sua empolgação contagiante pela ciência.

À Josane de Freitas Souza, por todo empenho em me auxiliar sempre que precisei, pela orientação e colaboração na realização deste trabalho.

Aos professores Dr. Roy Edward Larson, Dra. Maria Luíza Paçó-Larson, Dras. Constance Oliver, Maria Célia Jamur e Dra. Maria Cristina Roque Barreira, pela disponibilidade, equipamentos e reagentes cedidos.

À Silmara, mais que uma exímia técnica, uma grande amiga que tive o privilégio de conhecer, agradeço todo seu ensinamento e ajuda durante estes anos, e a seus incontáveis lanchinhos da tarde que trazia sempre quando eu estava com mais fome.

À Benedita de Oliveira de Souza - Joana, pelo seu trabalho competente, disposição em ajudar sempre que precisei e contagiar a todos com seu bom humor.

À Milene Mantovani Lopes, por toda ajuda e paciência em me ensinar quando cheguei ao laboratório.

Ao Dr. Daniel Tiezzi, pela colaboração neste trabalho, pelas amostras cedidas de TMA e por toda ajuda e empenho.

Ao Dr. Gilles Landman, do Hospital do Câncer A. C. Camargo, pelas amostras tumorais de melanoma cedidas, pela ajuda e acompanhamento durante meu treinamento no Departamento de Anatomia Patológica no Hospital do Câncer.

Aos amigos do laboratório Antônio, Milene, Cleidson, Rodrigo, Cristiano, Kamila, Raul, Driele, Denise e Guilherme, e aos recém chegados, Ana Paula, Bruno, Cibele e Anelisa, por toda nossa convivência durante este período, pelos ensinamentos e momentos compartilhados.

Em especial ao meu amigo e colega de laboratório Rodrigo Ribeiro e à Noemi, pela colaboração nos experimentos de Realtime-PCR e pelas nossas incansáveis discussões sobre a KIAA0090...

Aos demais amigos do departamento de biologia celular e molecular, pela troca de conhecimentos, festas, momentos divertidos, e inesquecíveis.

Aos grandes amigos que fiz no mestrado, **Fausto, Anderson (Lobão), André Miotello, Nilmar, Nerry, Fernando (Trovão), Aline, Tony (Beraba)**, por nossa amizade e momentos vividos.

Aos demais técnicos do departamento: **Waldir, Cirlei, Cláudia, Izilda, Tuca, Tereza, Vani, Mara, Zé, Domingos, Pitta, Sílvia, Patrícia e Anderson**.

Às secretárias do departamento **Lúcia e Denise** e secretária da pós-graduação **Rosângela** pelos serviços prestados.

A todos da minha república **Cueca Virada, Maller, André Damásio, William e Raphael**, e agora ao recém chegado **Wallax**, por serem nestes dois anos meus grandes amigos, uma verdadeira família e pelas inesquecíveis *Quinta dos Amigos!*

Aos amigos do **Centro Cultural Boa Vista, Maurício, Luis Fernando, Luciano, Paulo, José Luiz e Pe. Alexandre**, por toda amizade, companheirismo, ensinamentos e grandes momentos compartilhados.

Aos meus amigos, **Pedro, Du, Rodolfo, Léo e Tadeu**, pelo companheirismo e pelos momentos inesquecíveis que passamos em Roma.

Aos meus grandes irmãos que fiz em Uberlândia, **Guilherme, Paulo e Maca**, compartilhando meus quatro anos de faculdade, e se tornaram meus eternos amigos.

A meus pais **Roberto e Maria José**, a meu irmão **Rafael** e à minha avó **Geralda**, que mesmo distantes sempre estiveram presentes, me incentivando e dando forças para seguir em frente.

À **FAPESP, Capes, CNPq, Faepa, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos** por fornecerem todo o suporte financeiro e de infraestrutura para que essa dissertação fosse realizada.

E enfim a todos aqueles que vibraram juntos pela realização e conquista deste trabalho, muito obrigado!!

Quanto mais conheço a biologia molecular, mais convicto fico da existência de Deus, tamanha a ordem e perfeição de como as coisas funcionam e foram feitas!

Roberto Molina

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ALTERAÇÕES MOLECULARES ASSOCIADAS A PROGRESSÃO DO MELANOMA.	3
FIGURA 2. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS DOMÍNIOS ESTRUTURAIS PREDITOS PARA A KIAA0090.....	5
FIGURA 3. ANÁLISE DE HIDROFOBICIDADE IN SILICO PREVÊ QUE A KIAA0090 É INSOLÚVEL.....	28
FIGURA 4. ANÁLISES DE TOPOLOGIA IN SILICO MOSTRAM QUE A KIAA0090 POSSUI DUAS POTENCIAIS REGIÕES TRANSMEMBRANA..	28
FIGURA 5. A ANÁLISE IN SILICO ACERCA DE MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUÇIONAIS MOSTROU QUE A KIAA0090 POSSUI UM POTENCIAL SÍTIO DE N-GLICOSILAÇÃO NO RESÍDUO 913.....	29
FIGURA 6. A KIAA0090 É UMA PROTEÍNA GLICOSILADA PRESENTE NA MEMBRANA.	29
FIGURA 7. A KIAA0090 POSSUI UM SÍTIO DE CLIVAGEM E SECREÇÃO ENTRE OS AMINOÁCIDOS 1-21..	30
FIGURA 8. A PROTEÍNA DE FUSÃO HIS-K2 NÃO É VISÍVEL POR COOMASSIE..	31
FIGURA 9. A PROTEÍNA DE FUSÃO GST-K2 É EXPRESSA NA FORMA DE CORPOS DE INCLUSÃO.....	31
FIGURA 10. PURIFICAÇÃO DE GST-K2.	32
FIGURA 11. O ANTI-K1 RECONHECE COM ESPECIFICIDADE AS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EXPRESSAS EM BACTÉRIA.	34
FIGURA 12. O SORO A-K2 RECONHECE COM ESPECIFICIDADE A REGIÃO C-TERMINAL DA KIAA0090.	36
FIGURA 13. ANTICORPOS A-K2 APÓS PURIFICAÇÃO POR AFINIDADE RECONHECEM O DOMÍNIO C-TERMINAL KIAA0090 EM FUSÃO COM EGFP.....	37
FIGURA 14. O ANTI-K2 RECONHECE COM ESPECIFICIDADE AS PROTEÍNAS DE FUSÃO EXPRESSAS EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS	38
FIGURA 15. AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DOS ANTICORPOS A-K1 E INTEGRIDADE DAS PROTEÍNAS DE FUSÃO DA KIAA0090..	38
FIGURA 16. ESPECTRO DE MASSA PARA A PROTEÍNA DE FUSÃO GST-K1.....	40
FIGURA 17. ESPECTRO DE MASSA PARA A PROTEÍNA DE FUSÃO GST-K2.....	40
FIGURA 18. RESULTADOS DA ANÁLISE DOS PEPTÍDIOS DAS PROTEÍNAS DE FUSÃO GST-K ₁ E GST-K ₂	40
FIGURA 19. RESULTADOS DA ANÁLISE DOS PEPTÍDIOS CONFIRMA A PRESENÇA DE GST NAS PROTEÍNAS DE FUSÃO.	41
FIGURA 20. MARCAÇÃO DA KIAA0090 ENDÓGENA PELO ANTICORPO CONTRA O DOMÍNIO N-TERMINAL COLOCALIZA-SE COM A CHAPERONA MITOCONDRIAL HSP70 EM TODAS AS LINHAGENS CELULARES ESTUDADAS.	42
FIGURA 21. A KIAA0090 TAMBÉM ESTÁ ASSOCIADA A MITOCÔNDRIAS EM CÉLULAS TUMORAIS.....	42
FIGURA 22. A KIAA0090 PARECE SE ASSOCIAR TAMBÉM À MEMBRANA CELULAR.	43
FIGURA 23. A KIAA0090 TAMBÉM ESTÁ ASSOCIADA AO COMPLEXO DE GOLGI EM TODAS AS LINHAGENS ESTUDADAS.....	44
FIGURA 24. A KIAA0090 PODE SOFRER RÁPIDA DEGRADAÇÃO.....	45
FIGURA 25. TESTE DE SOLUBILIDADE PARA A PROTEÍNA KIAA0090 EM FUSÃO COM EGFP	45

FIGURA 26. A KIAA0090 ESTÁ PRESENTE NO EPITÉLIO DE REVESTIMENTO DA LÍNGUA.....	47
FIGURA 27. A KIAA0090 FOI DETECTADA NO TIMO	47
FIGURA 28. LOCALIZAÇÃO DA KIAA0090 NA REGIÃO DE TRANSIÇÃO ESÔFAGO-GÁSTRICA.....	48
FIGURA 29. A KIAA0090 ESTÁ PRESENTE NA TRAQUÉIA	49
FIGURA 30. WESTERN BLOT DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS E INSOLÚVEL DE DIFERENTES LISADOS TECIDUAIS	50
FIGURA 31. MARCAÇÃO PARA KIAA0090 EM MÚSCULO CARDÍACO DE RATO	51
FIGURA 32. MARCAÇÃO PARA KIAA0090 NO ESÔFAGO	52
FIGURA 33. MARCAÇÃO PARA KIAA0090 EM INTESTINO DELGADO DE RATO	52
FIGURA 34. MARCAÇÃO PARA KIAA0090 EM TESTÍCULO DE RATO.....	52
FIGURA 35. MARCAÇÃO DA KIAA0090 NA TRAQUÉIA.	53
FIGURA 36. A KIAA0090 TEM EXPRESSÃO AUMENTADA EM TECIDO TUMORAL.	54
FIGURA 37. A KIAA0090 ESTÁ PRESENTE EM GLÂNDULAS MAMÁRIAS E APRESENTA AUMENTO DE EXPRESSÃO EM CARCINOMA DE MAMA.	55
FIGURA 38. CLASSIFICAÇÃO DOS SUBGRUPOS DE AMOSTRAS DE CARCINOMA INVASIVO DE MAMA SEGUNDO O GRAU DE INTENSIDADE DE MARCAÇÃO DA KIAA0090	56
FIGURA 39. A KIAA0090 TEM SUA DISTRIBUIÇÃO ALTERADA EM RESPOSTA AO ESTRESSE	59
FIGURA 40. EFEITO DE DIFERENTES AGENTES INDUTORES DE ESTRESSE SOBRE OS NÍVEIS DE MRNA <i>KIAA0090</i>	59
FIGURA 41. EFEITOS DA BREFELDINA A SOBRE A KIAA0090 E MITOCÔNDRIA.	61
FIGURA 42. A BREFELDINA TAMBÉM REDUZIU A QUANTIDADE DE PROTEÍNA NA CÉLULA.	61
FIGURA 43. ESQUEMA ILUSTRATIVO DAS RELAÇÕES FUNCIONAIS DESEMPENHADAS PELA KIAA0090.....	70

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. PURIFICAÇÕES PARA O ANTICORPO CONTRA A REGIÃO N-TERMINAL DA KIAA0090.....	33
TABELA 2. PADRÃO DE MARCAÇÃO DA KIAA0090 EM CARCINOMA MAMÁRIO	56
TABELA 3. CORRELAÇÃO ENTRE OS CASOS KIAA0090 (+) E O GRAU DE DESENVOLVIMENTO HISTOLÓGICO DO TUMOR.....	56
TABELA 4. CORRELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE INTENSIDADE DA KIAA0090 E O DESENVOLVIMENTO TUMORAL.....	56
TABELA 5. ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA EM CÂNCER DE MAMA, PARA OS DIFERENTES MARCADORES UTILIZADOS.	57
TABELA 6. CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DE CÂNCER DE MAMA COM A KIAA0090	57
TABELA 7. AGENTES INDUTORES DE ESTRESSE UTILIZADOS NA LINHAGEM CELULAR DE MELANOMA WM278	58

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
I. INTRODUÇÃO	1
1.1 Câncer: aspectos epidemiológicos e moleculares.....	1
1.2 Identificação de genes envolvidos na progressão tumoral do melanoma: a descoberta do KIAA0090	5
1.3 Estudos sobre a KIAA0090 desenvolvidos em nosso laboratório.....	6
1.4 Abordagens em larga escala reforçando o envolvimento da KIAA0090 em câncer e na resposta ao estresse	8
II. OBJETIVOS	12
2.1 Objetivos Gerais	12
2.2 Objetivos Específicos	12
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1 Expressão das proteínas recombinantes (fusão com GST e His-tag) em culturas bacterianas	13
3.2 Purificação das proteínas recombinantes.....	13
3.2.1 Proteínas recombinantes em fusão com GST	13
3.2.2 Proteínas recombinantes em fusão com His-tag.....	15
3.3 Dosagem Protéica.....	16
3.4 Purificação e produção de anticorpo contra a KIAA0090 região C-terminal	16
3.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) ..	17
3.6 Imunodeteção de proteínas (Western Blot)	18
3.7 Cultivo das linhagens celulares	19
3.8 Transfecção celular.....	20
3.9 Verificação da localização e do perfil de expressão da proteína KIAA0090 por imunohistoquímica e imunoblotting, utilizando os anticorpos policlonais contra as porções amino- e carboxi-terminais da proteína	21
3.10 Indução de estresse	23

3.11 Imunocitoquímica.....	23
3.12 Anticorpos Secundários e Marcadores Fluorescentes	24
3.13 Extração de RNA total das linhagens celulares.....	25
3.14 Síntese de cDNA	25
IV. RESULTADOS.....	27
4.1. A KIAA0090 é uma proteína de membrana altamente insolúvel.....	27
4.1.1 Análises "in silico" da proteína KIAA0090	27
4.1.2 Purificação das proteínas recombinantes.....	30
4.1.3 Purificação do anticorpo contra a região N-terminal (α -K ₁)	33
4.1.4 Produção e caracterização do anticorpo contra a região C-terminal (α -K ₂).....	34
4.1.5 Análise das proteínas recombinantes em fusão com GST por western blot e espectrometria de massa	38
4.2. A KIAA0090 é expressa em vários tecidos e está associada à mitocôndria e Golgi	41
4.2.1 Marcação do domínio N-terminal (α -K ₁)	41
4.2.2 Marcação do domínio C-terminal (α -K ₂)	43
4.2.3 A KIAA0090 pode sofrer rápida degradação	44
4.2.4 Perfil de distribuição da KIAA0090 em tecidos murinos	46
4.2.4.1 Marcação do domínio N-terminal (α -K ₁)	46
4.2.4.2 Marcação do domínio C-terminal (α -K ₂)	50
4.3. A KIAA0090 tem expressão aumentada em tecidos tumorais	53
4.4. A KIAA0090 responde ao estresse celular.....	56
V. DISCUSSÃO	62
5.1. A KIAA0090 é uma proteína altamente insolúvel	62
5.2. Anticorpos gerados contra a KIAA0090 - revelações e limitações.....	64
5.3. A KIAA0090 pode estar envolvida em ERAD e na homeostase celular	66
5.4. A KIAA0090 e o câncer: perspectivas futuras	72
VI. CONCLUSÕES	76
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

RESUMO

Molina, R. A. S. **"Caracterização da distribuição subcelular e tecidual da proteína KIAA0090 e estudos de seu envolvimento em câncer e resposta a estresses"**. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, Ribeirão Preto, 2010.

O gene humano KIAA0090 mapeia uma região cromossômica (1p36.13) com freqüentes aberrações em cânceres humanos e é superexpresso em muitos tipos de tumores. É um gene altamente complexo cujas seqüências de cDNA oriundas de bases de dados públicas apóiam a existência de mais de 20 transcritos alternativos. Sua RefSeq prediz a codificação de uma proteína altamente conservada com 993aa, cujo ortólogo em *S. cerevisiae* (ECM1) foi proposto recentemente atuar no enovelamento de proteínas transmembrana no retículo endoplasmático (RE). O objetivo deste trabalho foi adquirir conhecimento sobre a localização e função da proteína KIAA0090, em células e tecidos normais e tumorais, bem como em células expostas a estresse. Geramos anticorpos policlonais (anti-K₂) contra a metade C-terminal da proteína e comparamos seu padrão ao tratamento obtido com o anticorpo (anti-K₁), previamente gerado contra a metade N-terminal. A proteína endógena foi localizada primariamente no Golgi e na mitocôndria, dependendo se o anticorpo utilizado foi contra a região N- ou C-terminal, respectivamente. Observamos também, embora menos notável, uma marcação sobreposta com a rede do RE e na margem celular, e variáveis graus de marcação dentro do núcleo e associada a pequenas partículas citoplasmáticas. A análise imunohistoquímica forneceu evidências que a KIAA0090 é ubiquamente expressa. O anti-K₂ marcou estruturas semelhantes a Golgi em todo tipo celular, predominando assim naquelas com Golgi mais visíveis, como células secretórias. Observamos para a maioria dos tecidos uma marcação leve a moderada para o anti-K₁, mas uma forte marcação foi encontrada em grupos restritos de células, como as células reticulares do timo, epitélio ductal das glândulas da língua e na lâmina basal do epitélio escamoso na zona de transição esôfago-gástrica. Em cortes histológicos de melanoma primário, observamos uma forte marcação para o anti-K₁, principalmente em vasos e em células invasoras na margem do tumor, enquanto o anti-K₂ mostrou um padrão sugestivo de infiltrado inflamatório e/ou células mesenquimais. Em tecidos de câncer de mama, vimos uma forte marcação nas células de carcinoma ductal em comparação ao epitélio ductal normal para o anti-K₂, ao passo que o anti-K₁, marcou fortemente vasos e células basais no epitélio de revestimento glandular, tanto no tecido normal como no tumoral. Utilizando uma matriz com amostras teciduais de câncer de mama obtidas de 96 pacientes, observamos uma marcação forte a moderada para o anti-K1 em 84% dos casos, enquanto 16% dos casos não apresentaram marcação. Notamos que os casos positivos para o anti-K1 estavam 100, 85 e 71% entre os casos de grade 1, 2 e 3, respectivamente, sugerindo uma tendência de perda da KIAA0090 associada à progressão do câncer de mama. Foi interessante notar que a brefeldina A e MG132 alteraram os níveis de RNAm da KIAA0090 e levaram à redistribuição da proteína endógena. Outros tratamentos de estresse, incluindo tunicamicina, complexo de rutênio doador de óxido nítrico e etoposídeo, também alteraram o padrão de distribuição da proteína. Este estudo fornece evidências preliminares que corroboram os resultados obtidos de estudos de expressão gênica em larga escala, fortalecendo os indícios de que a KIAA0090 desenvolve um papel na homeostase celular e está envolvida no câncer.

ABSTRACT

Molina, R. A. S. **“Characterization of the subcellular and tissue distribution of KIAA0090 protein and studies on its involvement in cancer and stress response”**.

Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, Ribeirão Preto, 2010.

Human KIAA0090 gene maps to a chromosomal region (1p36.13) with frequent aberrations in cancer and is overexpressed in many tumor types. It is a highly complex gene with cDNA sequences in databases supporting the occurrence of more than 20 alternative transcripts. The RefSeq transcript is predicted to encode a highly conserved 993 aa transmembrane protein whose *S. cerevisiae* ortholog (EMC1) was recently proposed to function on transmembrane protein folding in the endoplasmic reticulum (ER). The aim of this work was to gain insight into the localization and function of KIAA0090 protein, in normal and tumor cells and tissues, as well as in cells exposed to stress treatments. We raised a polyclonal antibody (anti-K₂) to the C-terminal half of the protein and compared its pattern of staining with an antibody (anti-K₁) previously generated in our laboratory to the N-terminal half. The endogenous protein was primarily localized either to mitochondria or Golgi, depending whether the antibody used was to the N- or C-terminal, respectively. Also, less conspicuous staining overlapped with the ER network and cell margin, and variable degrees of labeling was observed within the nucleus and associated to small cytoplasmic particles. Immunohistochemistry survey provided evidence that the KIAA0090 protein is ubiquitously expressed. Anti-K₂ labeled in a Golgi-like pattern in every cell type, predominating in those with more conspicuous Golgi, such as secretory cells. Faint to moderate anti-K₁ staining was found in most tissues, but very strong staining was seen in restricted groups of cells, such as thymus reticular cells, ductal epithelium of salivary lingual glands and the basal layer of the squamous epithelium in the esophagus-gastric transition zone. In histological sections of primary melanomas, we observed a strong staining for the anti-K₁, mostly in vessels and at the invasive tumor margin, while the anti-K₂ showed a staining pattern suggestive of infiltrating inflammatory and mesenchymal cells. In breast tissues, stronger staining was seen in ductal carcinoma cells in comparison to normal ductal epithelium for anti-K₂ antibody, whereas anti-K₁ strongly marked vessels and basal cells in epithelia lining glandular ducts both in normal and tumor tissues. Using a tissue array of breast cancer samples obtained from 96 patients, we observed strong to moderate staining for anti-K₁ in 84% of the samples and lack of staining in 16%, interestingly anti-K₁ positive cases were 100, 85 and 71% among cases of grades 1, 2 and 3, respectively, suggesting a tendency of KIAA0090 loss associated with breast cancer progression. A positive correlation was found with estrogen receptor expression and the opposite for HER2. Interestingly, Brefeldin A and MG132 altered KIAA0090 mRNA levels and caused endogenous KIAA0090 protein to redistribute. Other stress treatments, including tunicamycin, a ruthenium complex nitric oxide donor and etoposide, also altered KIAA0090 distribution. This study supports the notion that KIAA0090 play a role in cellular homeostasis and is involved in cancer.

I. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer: aspectos epidemiológicos e moleculares

Com o advento da globalização, foram claros os efeitos de amplo impacto que surtiram não só na economia de países desenvolvidos e em desenvolvimento como também na saúde e no estilo de vida da população como um todo, trazendo à tona doenças emergentes como o câncer.

O câncer surge do acúmulo de alterações genéticas ou epigenéticas no DNA ao longo do tempo e tem como resultado o crescimento desordenado de células, que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas (Alberts *et al.*, 2004), e permanece ainda como a principal causa de mortalidade em todo o mundo.

Em uma interessante revisão sobre o tema, Kanavos (2006) mostra que para muitos tipos de cânceres, as taxas de incidência devem aumentar substancialmente no futuro, com estimativa prevista de até 15 milhões de novos casos em 2020, o que corresponde a um aumento de 104%, sendo a maioria destes em países em desenvolvimento. O autor ainda ressalta que as causas e tipos de câncer variam globalmente. O background histórico, genética, ambiente, estilo de vida, fatores sócio-culturais e comportamentais desenvolvem juntos um papel crítico, sendo que esses elementos podem interagir contribuindo em maior ou menor risco para tipos específicos de câncer. As estimativas são de que em 2020 aumente em 29% o número de novos casos em países desenvolvidos ao passo que em países em desenvolvimento esta taxa é esperada em 73%, como resultado do envelhecimento populacional, urbanização e mudanças nos hábitos alimentares.

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (2007), o câncer afeta cerca de 7,6 milhões de pessoas por ano e preocupa muito a humanidade, representando cerca de 13% do total de mortes no mundo. No Brasil, é a segunda maior causa de morte por doença, sendo que no mundo, esta mortalidade é projetada em um aumento contínuo, com uma estimativa da Organização Mundial da Saúde de 9 milhões de pessoas morrendo em 2015 e 11,4 milhões em 2030. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (2007), o tipo mais incidente é o câncer de pele não-melanoma (116 mil casos), seguido pelos tumores de mama (49 mil), próstata (47 mil), pulmão (27 mil), cólon e reto (25 mil), estômago (23 mil) e cólon do útero (19 mil).

Atualmente têm-se também relacionado o câncer a muitas doenças infecciosas, mostrando que a infecção é responsável por aproximadamente 25% dos cânceres em países em desenvolvimento. Por exemplo, uma fração considerável de tumores causados pelo HPV oncogênico é a mesma em países desenvolvidos e em desenvolvimento, porém, o percentual de toda a malignidade resultante é aproximadamente cinco vezes maior no mundo em desenvolvimento (Parkin, 2006). Há agora evidências convincentes de que a infecção por *Helicobacter pylori* está associada com o aumento de duas a três vezes no risco de câncer, incluindo carcinoma do estômago e linfoma gástrico (Rastogi, 2004).

As pesquisas que vêm sendo realizadas em nosso laboratório têm focado no melanoma, um tipo de câncer que tem origem nos melanócitos (células produtoras de melanina, substância que determina a cor da pele), por ser uma das neoplasias mais agressivas e resistentes às terapias, impondo grandes desafios ao controle da doença (Sousa; Espreafico, 2006). Embora o melanoma seja responsável por apenas 4% de todos os cânceres dermatológicos, ele é o mais grave devido à sua alta possibilidade de metástase, sendo responsável por 80% das mortes dos pacientes com câncer de pele (Miller; Mihm, 2006). Sabe-se que o principal fator de risco para este tipo de câncer é a exposição intensa aos raios ultravioletas emitidos pelo sol, e que pessoas de pele clara e com histórico genético na família possuem maior predisposição em desenvolver o tumor.

No entanto, os mecanismos pelos quais a luz do sol inicia um melanoma e essas células adquirem a capacidade invasiva ainda não estão muito bem compreendidos (Chudnovsky *et al.*, 2005). Até que sejam estabelecidas as metástases, a progressão tumoral envolve processos complexos com a participação de muitos genes (Fig. 1), sendo que alterações nesses genes podem acarretar o aumento ou diminuição de seu nível de expressão e ainda causar mutações alterando a estrutura e atividade das proteínas. O modelo mais aceito para explicar a progressão do melanoma é que ele inicia-se como um nevo benigno, que consiste de uma população de melanócitos que apresenta uma proliferação aberrante, porém não progride devido à senescência celular. Uma vez quebrada essa barreira da senescência, o nevo se torna displásico e pode progredir para uma fase de espalhamento superficial, caracterizando a fase de crescimento radial (RGP) do melanoma, que é confinada à epiderme e possui baixo potencial invasivo. As células em RGP podem então adquirir a capacidade de invadir a derme, estabelecendo desta forma a fase de crescimento vertical (VGP) e conseqüentemente intravasalar e ser transportada através da corrente sangüínea para tecidos e órgãos distantes, caracterizando assim a fase metastática (Zaid *et al.*, 2008).

Figura 1. Alterações moleculares associadas a progressão do melanoma.

Fonte: Zaid, 2008.

Têm-se mostrado que o melanoma está fortemente associado com a inativação de p16^{INK4}, uma molécula envolvida no controle do ciclo celular. P16^{INK4}, também denominada CDKN2A, seqüestra CDK4 e CDK6, bloqueando desta forma a fosforilação de pRb por estas quinases, mantendo pRb no seu estado ativo, inibindo conseqüentemente a progressão do ciclo celular. Portanto, mutações em CDKN2A, afetam drasticamente o ciclo celular estimulando uma proliferação descontrolada das células (Chudnovsky *et al.*, 2005).

Outras vias moleculares também têm sido intensamente caracterizadas no desenvolvimento do melanoma, embora ainda não se tenha descoberto uma molécula que seja 100% específica ou sensível para um diagnóstico mais preciso ou focado em terapias direcionadas para este tipo de tumor.

Oncogenes associados ao melanoma atuam como freqüentes alvos da molécula Ras e de suas vias efectoras, MAP quinase e PI3K-Akt. Estima-se que cerca de 10% a 20% dos melanomas abrigam mutações em NRAS (Russo *et al.*, 2009). A primeira evidência do envolvimento da via PI3K-Akt na progressão do melanoma foi a descoberta em lesões melanocíticas com freqüente perda de PTEN, uma fosfatase de lipídeo que inibe a ativação de Akt por PI3K, estando associada a aproximadamente 30% a 50% dos casos de melanoma (Wu *et al.*, 2003). Recentemente, mostrou-se também que Akt está constitutivamente ativo em mais de 60% dos melanomas, principalmente em estágios mais avançados da doença (Stahl *et al.*, 2004). Russo *et al.* (2009) ressaltam ainda que o papel da via Raf-MEK-ERK na progressão do melanoma têm recebido grande interesse nos últimos anos devido a identificação de mutações no gene BRAF em alta freqüência neste tipo de tumor, chegando a cerca de 70% dos casos (Davies *et al.*, 2002).

Desta forma, o desenvolvimento de terapias racionais centradas em mediadores chaves das vias envolvidas na progressão tumoral serão certamente o foco da pesquisa em câncer nos próximos anos.

1.2 Identificação de genes envolvidos na progressão tumoral do melanoma: a descoberta do KIAA0090

Em uma abordagem de expressão diferencial desenvolvida em nosso laboratório, no projeto de doutorado de Josane de Freitas Sousa, foram selecionados fragmentos ORESTES (*Open Reading Frames ESTs*), gerados pelo Projeto Genoma Humano do Câncer, que alinham em regiões cromossômicas nas quais rearranjos são freqüentemente associados com melanoma. Utilizando *dot blots* contendo 137 fragmentos ORESTES que mapeiam nas regiões cromossômicas 1p36, 1p11-12 e 1q21, foram detectados, e posteriormente confirmados por *Northern blot*, quatro genes diferencialmente expressos em linhagens de melanoma metastático, dentre eles o KIAA0090, o qual foi selecionado como foco deste trabalho.

Esse gene está localizado no cromossomo 1 (1p36.13), codificando uma proteína de 993 resíduos de aminoácidos, com massa molecular predita de 101.957 (111,8) KDa, que não apresenta similaridade com outras proteínas humanas. A proteína é altamente conservada, sendo encontrada em todas as espécies de eucariotos. Através de uma análise *in silico* em consultas no banco de dados do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), Gene Card (<http://www.genecards.org>), ECGene (<http://genome.ewha.ac.kr/ECgene>) e pelo programa PSORT II (<http://psort.nibb.ac.jp>) foi possível prever a estrutura linear de domínios da proteína.

Figura 2. Representação esquemática dos domínios estruturais preditos para a KIAA0090:peptídeo sinal (PS); repetição WD40-like; região rica em serina (RRS); sítio de fosforilação de tirosina (Y); zíper de leucina (ZL); um sinal de localização nuclear RKPR (SLN); domínio DUF1620; motivo dileucina (LL); um sinal de endereçamento mitocondrial (Mts) e um domínio transmembrana (TM). Os números em parênteses representam os aminoácidos correspondentes aos domínios da proteína.

O gene *KIAA0090* possui 4253 pb, divididos em 23 éxons. Apresenta uma região 5'UTR de 43 pb dentro do éxon 1, e uma região 3'UTR de 1227 pb dentro do éxon 23. De acordo com o esquema, a proteína apresenta os seguintes domínios preditos: um peptídeo sinal (SP), na porção amino, que define se a proteína é secretada ou parte integralmente da membrana; ainda na porção N-terminal apresenta um sinal de endereçamento mitocondrial (Mts), importante no direcionamento de pré-proteínas para a mitocôndria; um domínio altamente conservado de repetições WD40-like, indicativo de participação na transdução de sinais, regulação da transcrição, controle do ciclo celular ou apoptose; similaridade, dentro do domínio WD40-like (β -propeller), com enzimas que utilizam pirroloquinolina quinona como grupo prostético e outras enzimas bacterianas que apresentam o mesmo domínio; sítio de fosforilação de tirosina (Y) e uma região rica em serina (SRR) que são sítios de fosforilação e glicosilação; zíper de leucina (LZ), que é uma seqüência envolvida na dimerização de proteínas, presente em proteínas ligantes de DNA com função em regulação da transcrição; sinal de localização nuclear (NLS) usado para importação de proteínas ao núcleo celular através do poro nuclear; DUF1620, domínio conservado de função desconhecida; motivo dileucina (LL), envolvido na distribuição de proteínas do trans-Golgi para lisossomo e internalização de proteínas e um domínio transmembrana (TM) α -hélice ou folha- β no interior da membrana.

1.3 Estudos sobre a KIAA0090 desenvolvidos em nosso laboratório

Durante o trabalho de doutorado de Josane de Freitas Sousa e a iniciação científica de Milene Mantovani Lopes, em nosso laboratório, a região codificadora do gene foi clonada, seqüenciada, e transferida para vetores de expressão bacteriana (pGEX1 e pQE81) e vetores de expressão em células de mamíferos (pEGFP-C3; pEGFP-C2; pEGFP-N1 e pcDNA3). Estudos baseados na transfecção dessas construções mostraram que o padrão de distribuição da proteína recombinante varia de acordo com a posição da EGFP na proteína de fusão.

A construção EGFP-KIAA0090 (com a EGFP fusionada à extremidade amino-terminal da KIAA0090) quando expressa em diferentes linhagens de melanoma acarreta um acúmulo perinuclear da proteína, o que pode estar relacionado a uma desorganização da rede de microtúbulos e do Complexo de Golgi. Além disso, induz uma agregação das mitocôndrias na mesma região de agregação da proteína, e leva a uma notável degradação de DNA nuclear e morte celular, com indícios de apoptose, uma vez que as células inviáveis são positivas para anexina V, e a morte é prevenida parcialmente por um inibidor de caspase 3. Já a proteína KIAA0090-EGFP (com a EGFP fusionada à extremidade carboxi-terminal da KIAA0090) colocaliza-se com a calreticulina, um marcador de retículo endoplasmático, induzindo grande expansão da rede tubular desta organela e ainda um aumento significativo na expressão de calreticulina, não se notando colocalização com marcadores de mitocôndrias nem alterando a distribuição destas organelas nas células que a superexpressam. É interessante notar que a localização restrita ao retículo endoplasmático foi também observada em levedura para o ortólogo da KIAA0090 (YCL045c) em fusão com EGFP na extremidade C-terminal (Huh *et al.*, 2003).

Foram ainda desenvolvidos e purificados por afinidade, em nosso laboratório, anticorpos policlonais contra a região N-terminal da KIAA0090, funcionando como uma valiosa ferramenta que permitiu os estudos de localização subcelular da proteína. Este anticorpo mostra marcação predominantemente associada às mitocôndrias, tanto em células de melanoma, células de carcinoma uterino HeLa, como em células linfoblásticas derivadas de leucemia linfóide (linhagem Jurkat) ou mielóide (linhagem HL60), embora uma marcação não associada à mitocôndria também seja detectada, colocalizada em parte com marcador de retículo endoplasmático.

Vimos que a KIAA0090 está presente em diversos tecidos com intensidade de marcação variável. Corroborando estes resultados, foi realizado um alinhamento múltiplo de todas as possíveis isoformas com a RefSeq (NM_015047) do gene utilizando o programa *ClustalW* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw>), revelando a inclusão e exclusão de alguns éxons, o que pode interferir em alguns domínios protéicos e diferenciar o

padrão de localização e interação da proteína, bem como seu papel funcional. Como o anticorpo que tínhamos até então foi gerado contra a porção amino-terminal da KIAA0090, possíveis isoformas da proteína que apresentem essa porção de forma não acessível ou mesmo que não contenham essa porção podem não ser detectadas.

1.4 Abordagens em larga escala reforçando o envolvimento da KIAA0090 em câncer e na resposta ao estresse

Dados de estudos utilizando tecnologias de larga escala confirmam os indícios de associação da KIAA0090 com o câncer, apontados pelos estudos em andamento em nosso laboratório, e, mais ainda, sugerem que essa proteína seja envolvida em respostas ao estresse. Sabe-se que a célula cancerosa é marcada por aneuploidias, desbalanço do número de cromossomos e rearranjos, funcionando como uma fonte permanente de estresse, tornando a sobrevivência da célula dependente de uma resposta segura para reequilibrar a homeostase. Gowrishankar *et al.* (2006) afirmam que a resposta celular ao estresse causa reprogramação da expressão gênica, que em células de mamíferos inclui uma rápida e elevada expressão de proteínas pró-inflamatórias, nas quais mecanismos pós-transcricionais desenvolvem um importante papel.

Embora o ortólogo em levedura da KIAA0090, YCL045C, não seja um gene essencial, seu perfil de expressão e as interações detectadas sugerem seu envolvimento na resposta a vários estímulos de estresse, particularmente arsênico (<http://db.yeastgenome.org/cgi-bin/locus.pl?locus=YCL045c>). Ahn *et al.* (2004), visando a detecção de genes induzidos por arsênico, mostraram que KIAA0090 foi detectado entre os genes com maior nível de indução, com um aumento de 12,7 vezes, em células provenientes de câncer cervical humano infectado com HPV16.

A superexpressão da KIAA0090 em câncer foi demonstrada em diversos outros estudos, dentre os quais podemos citar Wachi *et al.* (2005), que compararam células de câncer de pulmão com células pulmonares normais e Gebhard *et al.* (2006), comparando

células de leucemia mielóide com monócitos normais. Há ainda outras evidências interessantes. Fukada *et al.* (2004), utilizando linhagens celulares de neuroblastoma murino, buscavam identificar proteínas mitocondriais que são alteradas na esclerose amiotrófica lateral, uma doença neurodegenerativa fatal, por mutação na enzima superóxido dismutase. Neste estudo, a proteína KIAA0090 foi identificada apenas em frações mitocondriais da linhagem celular selvagem, sugerindo que a KIAA0090 é uma das proteínas cuja localização na mitocôndria é afetada por esta mutação. Portanto, a deficiência de KIAA0090 na mitocôndria poderia ser um dos fatores que acarretam disfunções mitocondriais que acabam por desencadear a morte celular observada na doença neurodegenerativa.

Vale ressaltar ainda um provável papel da atividade do gene *KIAA0090* em resposta à estímulos pró-inflamatórios, uma vez que vários dos genes co-regulados com KIAA0090 são genes de resposta à interferon- α envolvidos em inflamação (Valencia *et al.*, 2004). Lee *et al.* (2001) analisaram os efeitos globais da interleucina-13 sobre a expressão gênica em células que poderiam contribuir para as características fenotípicas da asma. Eles relataram uma queda da expressão da KIAA0090 em células de músculo liso bronquial após seis horas de indução com interleucina-13, indicando que de algum modo, essa citocina tem um efeito negativo sobre a expressão da proteína.

Vasilescu *et al.* (2005) realizaram uma análise em larga escala de proteínas nativas ubiquitinadas de uma linhagem celular de câncer de mama (MCF-7) através de purificação por imunoafinidade e espectrometria de massa, a qual permitiu identificar 70 proteínas ubiquitinadas após o tratamento com inibidor de proteassoma (MG132). Dentre estas proteínas, estava a KIAA0090, ressaltando ainda mais sua importância, uma vez que a progressão do ciclo celular, resposta à choque térmico e apresentação de antígenos estão dentre os vários processos regulados pela proteólise de proteínas dependentes de ubiquitina.

As interações moleculares desenvolvem um papel crítico na vasta maioria dos processos celulares. Compreender o papel e a consequência das interações entre

proteínas é fundamental para o desenvolvimento de sistemas biológicos bem como para o desenvolvimento de redes terapêuticas. Estudos destas interações permitem identificar moléculas envolvidas em processos biológicos básicos como transdução de sinal, formação de complexos macromoleculares e metabolismo primário e secundário, permitindo ainda o desenvolvimento de métodos de leitura e identificação de compostos com atividade farmacológica, que podem inibir ou amplificar interações específicas de proteínas (Cogswell, 2003).

Ewing *et al.*, (2007) combinando uma abordagem de imunoprecipitação com espectrometria de massa, em larga escala, identificaram mais de 6000 interações com 338 proteínas pouco caracterizadas, selecionadas como alvos segundo predições de envolvimento em doenças. Dentre estas interações, detectou-se a associação com a KIAA0090 para cinco proteínas diferentes, que participam de processos celulares vitais.

TSC-22 (conhecido também como G6IBU1 ou TGF β 1I4) é um fator de transcrição com atividade repressora, membro da família das proteínas com zíper de leucina, superexpresso em células de Sertoli em resposta ao hormônio FSH. Estudos sugerem que essa proteína tenha um papel regulatório na diferenciação do epitélio intestinal (Gupta *et al.*, 2003). **CENPH** é proteína centromérica H, que juntamente com outras proteínas formam a base do complexo do cinetócoro que inclui proteínas necessárias para iniciação, manutenção e monitoramento da junção dos microtúbulos, bem como o bloqueio da segregação cromossômica até que todas as ligações são propriamente formadas (Liao *et al.*, 2007). **ARF6**, membro do fator de ribosilação das famílias GTPases, uma proteína que fornece uma conexão entre o tráfego de membrana e a regulação do citoesqueleto de actina. A ARF6 regula o tráfego de membrana na periferia celular e estimula o rearranjo de actina, sendo este um requisito para a proliferação celular (Radhakrishna, 1999). **TNIK**, proteína reguladora do citoesqueleto que inibe a proliferação celular (Fu *et al.*, 1999). **CGI-119**, tido como um gene *housekeeping*, foi proposto, por Gubser *et al.* (2007), codificar uma proteína anti-apoptótica associada ao Golgi. Os autores identificaram e caracterizaram uma nova proteína anti-apoptótica

isolada de poxvirus, que se localiza no Golgi da célula hospedeira, sendo assim denominada *viral Golgi anti-apoptotic protein* (v-GAAP). Esta proteína apresentou o maior nível de conservação (identidade de 73%) com o produto do gene humano CGI-119, por isso denominada h-GAAP em uma comparação realizada com os produtos de genes de variadas espécies, levando os autores a propor que este gene fora incorporado ao genoma viral.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Os objetivos gerais deste trabalho consistiram em ampliar nosso conhecimento acerca da proteína KIAA0090, ainda não caracterizada, reunindo assim dados capazes de fornecerem pistas sobre suas possíveis funções e processos em que está envolvida.

2.2 Objetivos Específicos

- 1) Purificar a proteína e produzir um anticorpo policlonal contra a porção C-terminal;
- 2) Verificar a localização e o perfil de expressão da proteína KIAA0090 por imunohistoquímica e imunoblotting, utilizando os anticorpos policlonais contra as porções amino- e carboxi-terminais da proteína.
- 3) Analisar o perfil de expressão da proteína em células e tecidos tumorais.
- 4) Verificar o efeito do estresse celular sobre a localização e o perfil de expressão da proteína endógena.

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Expressão das proteínas recombinantes (fusão com GST e His-tag) em culturas bacterianas

Inoculou-se 100µL da cultura estoque em 10mL de meio LB suplementado com os antibióticos apropriados, cultivando-se por 18 h sob agitação a 37°C. Para a indução, a mini-cultura foi expandida para 1L de meio LB, acrescido de 1mL dos antibióticos apropriados e 10mL de glicose 20%, incubando-se sob as mesmas condições de 2 a 4 h até atingir a absorbância entre 0,5 e 0,7 a 600nm; quando então foi retirado 1mL da cultura não induzida. Para indução, acrescentou-se 300µL de IPTG 1M (isopropiltiogalactosídeo), continuando o cultivo em *shaker* a 37°C, por 3 horas, a 180rpm.

Completado o tempo de indução, uma amostra de 1mL da cultura induzida, assim como a amostra da cultura não induzida, foram centrifugadas a 4000xg por 10 min a 4°C. O volume restante da cultura induzida também foi centrifugado para ser, posteriormente, submetido à lise. Se necessário o sedimento poderia ser armazenado a -80°C. Os sedimentos bacterianos das amostras de 1mL não induzida e induzida foram então analisados por meio SDS-PAGE.

3.2 Purificação das proteínas recombinantes

3.2.1. Proteínas recombinantes em fusão com GST

Ressuspendeu-se o sedimento de 1L de cultura, na câmara fria (10°C), em 20mL de Tampão de Lise gelado pH 7,4 (Tris-HCl 10mM, NaCl 100mM, MgCl₂ 1mM, DTT 1mM, EGTA 1mM, deoxicolato 2%, Azida 0,2 mM), contendo os inibidores de proteases: benzamidina 1mM (SIGMA); aprotinina 2µg/mL (SIGMA); pefabloc 1mM (Calbiochem®).

Homogeneizou-se primeiramente no homogeneizador de vidro tipo *Dounce* e em seguida procedeu-se à lise bacteriana na *French Press* por alta pressão (1800 PSIG), quando então o lisado foi coletado. Após a lise, o lisado foi centrifugado a 16.500xg por 10 min a 4°C. Retirou-se então amostras para posterior análise por SDS-PAGE do precipitado (P) e sobrenadante (S1). Com o sobrenadante contendo as proteínas solúveis procedeu-se à purificação. Obs.: o sedimento foi armazenado a -80°C até confirmação de que a proteína de interesse era realmente solúvel.

A purificação das proteínas recombinantes em fusão com GST foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna com resina acoplada à glutationa. Esta purificação ocorre por afinidade química, a qual é reversível: a GST em fusão com a proteína de interesse liga-se à glutationa imobilizada na resina. A eluição consiste em adicionar à coluna o Tampão Tris-HCl contendo glutationa reduzida, o qual faz com que a proteína de interesse desligue-se da resina e ligue-se à glutationa reduzida livre, a qual está em excesso. Portanto, a proteína de fusão ligada à glutationa reduzida, sai da coluna.

Procedimento:

- Incubou-se o sobrenadante com 2,5 – 3,0mL de resina glutationa (Amersham Biosciences) úmida, a 4°C, *overnight*, sob agitação. A resina deverá estar previamente recuperada (quando já estiver pronta) e equilibrada com tampão de lise (mesmo que tenha acabado de ser confeccionada);

- Em gelo, colocou-se a suspensão resina + sobrenadante (previamente incubados na câmara fria, sob agitação) na coluna para que ocorresse o empacotamento. Coletou-se o flow-trough em tubo limpo.

- Lavou-se a coluna com 3 volumes (3V) de Tampão de Renaturação (TR) pH 8,2 (Tris-HCl 100mM, NaCl 500mM, EGTA 1mM) acrescido de Tween 0,25%;

- Lavou-se a coluna com 5V de TR sem Tween, coletando e dosando em espectrofotômetro cada 1mL do fluido, numa absorbância de 280nm, até se obter densidade óptica zero, iniciando a eluição da proteína.

- Eluiu-se a proteína de interesse com Tris-HCl 50mM pH 8,0 contendo 10mM de glutathione reduzida. As amostras dosadas que apresentarem as maiores leituras de densidade óptica (DO) são unidas e colocadas em saquinho de diálise contra 2 litros de PBS pH 7,4 para saída da glutathione reduzida, a 4°C, sob agitação. Foram realizadas duas trocas do tampão de diálise, a cada 12 h.

- Recuperou-se a coluna GST e armazenando-a em 3V de NaCl 1M + azida 0,2mM.

Resina de glutathione: Para obtenção de 2mL de resina glutathione (Sigma) úmida, 172,6mg do produto liofilizado foi inchado em 35mL de água deionizada por 2 h à temperatura ambiente e em repouso. Após esse período a coluna foi montada e lavada com água (10V da resina úmida).

Recuperação da Coluna GST:

1. lavar com 5V de tampão borato 0,1M
2. lavar com 5V de água
3. lavar com 5V de tampão acetato 0,1M pH 4,0 com 0,5M de NaCl
4. lavar com 5V de água
5. lavar com 5V de tampão de lise GST

3.2.2. Proteínas recombinantes em fusão com His-tag

A purificação das proteínas recombinantes em fusão com His-tag foi realizada sob condições desnaturantes de acordo com o protocolo "TheKiaExpressionist" (Qiagen). O pellet referente a 500ml de cultura foi ressuspenso em tampão de lise contendo uréia (NaH₂PO₄ 100mM, Tris-HCl 10mM, uréia 8M pH 8,0) e deixado por 1h à temperatura ambiente. O extrato foi submetido à centrifugação por 14.000xg e as frações solúveis e insolúveis em 8M de uréia foram analisadas em SDS-PAGE.

À fração solúvel foi adicionado 1ml de resina de Ni²⁺ previamente equilibrada no mesmo tampão e incubou-se sob agitação por 1h à temperatura ambiente. A resina foi compactada e o flow-through coletado. A lavagem da resina foi realizada em tampão de

lise com uréia, com pH ajustado para 6,3. Em seguida a eluição da proteína foi realizada primeiramente no mesmo tampão ajustando o pH para 5,9, e em seguida ajustando o pH para 4,5. Este protocolo não utilizou imidazol nas eluições, apenas alterações nos valores de pH. As frações contendo a proteína eluída foram analisadas em SDS-PAGE.

3.3 Dosagem Protéica

A dosagem das proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1976), utilizando BSA (1mg/mL) como padrão. Todas as determinações foram feitas em duplicatas. As curvas-padrões foram obtidas por dosagem, também em duplicata, de BSA nas quantidades de 0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10µg. A absorbância das amostras foi lida a 595nm em espectrofotômetro. A concentração de proteínas das amostras foi inferida a partir da curva obtida por regressão linear dos valores para os padrões.

3.4 Purificação e produção de anticorpo contra a KIAA0090 região C-terminal

Para a produção de anticorpos anti-KIAA0090, utilizamos uma construção, já obtida, da porção carboxi-terminal da KIAA0090 no vetor pGEX, na qual a proteína recombinante é fusionada à GST, utilizando os clones transformados na linhagem de bactéria BL21-códon +.

Após a indução da cultura de bactérias com IPTG, o sedimento de bactérias foi lisado com o uso de *French-press* e tratado com 1mM de inibidores de proteases (Pfablock, Benzamidina e Aprotinina). O lisado resultante, contendo a proteína de interesse enriquecida, foi centrifugado por a 4°C por 30' a 5.000r.p.m., sendo o pellet ressuspendido em tampão de amostra 1x. A amostra foi submetida a SDS-PAGE em gel de poliacrilamida preparativo a 7%, e corada com solução de KCl, 0,5 M. A banda de interesse foi cortada e lavada, adicionado-se posteriormente 2-3 ml de PBS (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 4,3 mM; KH₂PO₄ 1,4 mM, pH 7,3), homogeneizando o gel em

potter. Para a preparação da proteína de interesse, foi coletada a mistura de PBS + gel, aplicando-a em 2 seringas unidas por um adaptador, acrescentando o mesmo volume de adjuvante *Freund* completo, na 1ª injeção de cada coelho, ou o incompleto, nas injeções posteriores.

As injeções foram repetidas a intervalos regulares de modo manter a concentração de anticorpos específicos alta. Após 10 dias da 2ª injeção nos coelhos, coletamos 10 ml de sangue; a partir da 3ª dose, o sangue foi coletado semanalmente, em quantidade de, no máximo, 30 ml de cada coelho.

Para a purificação do anticorpo, bandas enriquecidas com GST purificada presentes em membrana de nitrocelulose foram primeiramente bloqueadas com leite desnatado 5% em TBS-T (Tris-HCl 50mM, pH 8,0; NaCl 150mM; Tween-20 0,05%) sob agitação durante 2 horas à temperatura ambiente. Após lavagens sucessivas com TBS-T, a banda foi recortada e incubada com o soro imunizado do coelho a 4°C por 3h ou overnight. O soro foi então recolhido e incubado no mesmo processo com bandas enriquecidas de pGEX-K₂ presentes em membrana de nitrocelulose, e depois de novas lavagens o anticorpo foi eluído com glicina (100mM, pH 2,5), dosado e a ele adicionado 10mg/ml de BSA. O anticorpo eluído foi dializado contra PBS e estocado a -80°C. A eficácia deste processo foi confirmada por Western Blot e imunofluorescência em cultura celular.

3.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

Para verificação das amostras protéicas a eletroforese foi realizada usando o sistema de tampão descontínuo descrito por Laemmli e Favre (1973), em mini-géis (10x9x0,05cm) constituídos de um gel de empilhamento (4%) e um de separação de gradiente contínuo de poliacrilamida de 5 a 20%. O padrão de peso molecular utilizado foi o 6H (Sigma), que contém as seguintes proteínas: cadeia pesada de miosina II de

músculo esquelético (200kDa), β -galactosidase de *Escherichia coli* (116kDa), fosforilase B de músculo de coelho (97kDa), albumina bovina (66kDa), ovalbumina (45kDa) e anidrase carbônica de eritrócito bovino (29kDa).

Todas as amostras, antes de serem aplicadas em SDS-PAGE, foram solubilizadas em tampão de amostra 5X e fervidas por 5 min. Cada amostra foi aplicada nos volumes de 10 e 15 μ L. Para a corrida da eletroforese foi utilizado o tampão de eletrodo (Tris 25mM; glicina 187mM e SDS 0,1%), com amperagem inicial de 15mA, passando-se para 20mA após a entrada das amostras no gel de separação.

Ao final da corrida os géis de verificação foram corados com *Comassie Blue R-250* 0,5% (Sigma) em ácido acético 50%. Enquanto que os géis de transferência, não corados, foram imediatamente submetidos à transferência para membranas de nitrocelulose (BioRad) após o término da corrida.

3.6 Imunodeteção de proteínas (Western Blot)

As proteínas separadas por SDS-PAGE foram transferidas eletroforeticamente de acordo com o método de Towbin *et al.* (1979) por 4h, 35V a 4°C para uma membrana de nitrocelulose (BioRad), utilizando-se o tampão de transferência (Tris 25mM; glicina 192mM; etanol 18.5% e SDS 0,1%).

Após a transferência a membrana foi corada com *Ponceau* 0,5% em ácido tricloroacético (TCA) 0,3% por 15 min, sob agitação. A seguir foi lavada com água para remover o excesso de corante e possibilitar a visualização das amostras e marcação, com lápis, do posicionamento de cada banda do padrão e das raias contendo as amostras.

Antes da imunomarcação, os sítios inespecíficos foram neutralizados com solução de bloqueio (5% de leite desnatado em pó em TBS/T [Tris HCl 50mM pH8,0; NaCl 150mM, e Tween-20 0,05% (V/V)]) sob agitação contínua por 1 h à temperatura ambiente ou *overnight* a 4°C.

Após o bloqueio o anticorpo primário de interesse, diluído em TBS/T foi adicionado e a membrana incubada por 1h à temperatura ambiente, sob agitação. A membrana foi novamente lavada, 4x por 5 min em TBS/T, sob agitação contínua à temperatura ambiente para retirar o anticorpo primário não ligado.

Foi acrescentado então o anticorpo secundário conjugado com peroxidase, diluído em solução de bloqueio, e a membrana mais uma vez incubada por 1h à temperatura ambiente, sob agitação. Para a retirada do anticorpo secundário não ligado a membrana foi lavada 4x por 5 min em TBS/T, sob agitação contínua à temperatura ambiente.

Para revelação do anticorpo em câmara escura, a membrana foi banhada com os reagentes do kit *ECL-Western Blotting analysis system* (Amersham Biosciences) na proporção de 1:1 e protegida entre duas folhas de acetato para exposição ao filme de raio-X (Sigma-Kodak), em intervalos de tempo distintos, de acordo com a intensidade do sinal. Após a exposição, o filme foi revelado em processadora automática (Kodak M35 X-OMAT).

3.7 Cultivo das linhagens celulares

As células de melanoma humano correspondentes à Fase de Crescimento Vertical (WM278, WM793) e Metastática (1205Lu, WM9) foram cultivadas em meio TU 2% (MCDB-153 80%, Leibovitz's L-15 20%, Insulina 5µg/mL e CaCl₂ 1,6mM) suplementado com 2% SFB em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C. As células de rim de macaco verde africano COS-7 (fibroblástica) e Vero (epitelial), e células embrionárias de rim humano HEK-293 T foram cultivadas em meio DMEM (Invitrogen) suplementado com 10% de SFB nas mesmas condições acima citadas.

3.8 Transfecção celular

Para ensaios de interação protéica, localização celular ou colocalização, as construções plasmidiais já produzidas em nosso laboratório EGFP-KIA, KIA-EGFP, EGFP-K₁, EGFP-K₂, EGFP e pCDNA₃-KIA foram transfectadas em diferentes linhagens celulares. O método de transfecção escolhido foi o de co-precipitação de DNA-fosfato de cálcio devido à eficiência do processo para as linhagens utilizadas.

- Plaqueou-se 1×10^6 células por placa de cultura de 100mm de diâmetro, mantendo-as em cultura até atingirem um grau de confluência de 60-80% (aproximadamente 48 horas após terem sido semeadas).

- Duas horas antes da transfecção, trocou-se o meio de cultura.

- Em um tubo cônico de 15mL adicionou-se 25µg de DNA em água deionizada estéril na proporção de 0,05µg/µL da construção a ser transfectada (volume final de 450µL). Adicionou-se então, 50µL de uma solução de CaCl₂ 2,5M à solução do plasmídio, misturando gentilmente. Em seguida gotejou-se 500µL da solução de HEBS 2X pH 7,05 (NaCl 350mM; Na₂HPO₄ 1,8mM; Hepes 62mM) esterilizado por filtração na solução de DNA, enquanto borbulhava-se a mistura com o auxílio de uma pipeta *Pasteur*.

Incubou-se a mistura reacional à temperatura ambiente por 20 min. Adicionou-se gota a gota dessa mistura às placas de cultura, enquanto estas foram gentilmente agitadas. As células foram incubadas por 12 h em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, a 37°C, removeu-se o meio, lavou-se as células 2x com PBS e adicionou-se novo meio de cultura completo. Da mesma forma, como citado anteriormente, manteve-se as proporções de reagentes e do número de células plaqueadas, de acordo com a área da placa de cultura utilizada.

3.9.Verificação da localização e do perfil de expressão da proteína KIAA0090 por imunohistoquímica e imunoblotting, utilizando os anticorpos policlonais contra as porções amino- e carboxi-terminais da proteína

Um casal de ratos *Wistar* foi submetidos à perfusão, com soluções salina (NaCl 0,9%) e fixadora (paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M). Fragmentos de diversos órgãos foram retirados: porção inferior e superior do estômago, esôfago, rim, coração, pâncreas, baço, intestino, supra-renal, timo, ovário, traquéia, língua, cérebro e fígado. Estes tecidos foram pós-fixados com a mesma solução, por um período adicional; em seguida foram incluídos em pequenos potes contendo OCT, uma solução crioprotetora e seccionados em micrótomo de congelamento. Os cortes foram colocados em lâminas gelatinizadas, submetidos à técnica de imunofluorescência indireta, utilizando os anticorpos policlonais gerados e então analisados por microscopia confocal.

Para imunohistoquímica com cortes parafinados, os tecidos coletados foram fixados overnight em paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M e lavados três vezes no mesmo tampão. Em seguida, foram desidratados em séries crescentes de etanol (Merck), diafanizados em xilol, incluídos em parafina, cortados em micrótomo e, então, submetidos à imunohistoquímica. Para iniciar a reação com estes cortes, tratamos as lâminas para exposição dos sítios antigênicos. Para isso, como as lâminas estavam tratadas com gelatina, mergulhamos as mesmas em 2 litros de tampão citrato (ácido cítrico 12mM, pH 6,0) e fervemo-as no microondas por 10 minutos em potências máxima. Posteriormente, banhamos as lâminas em PBS por 15 minutos, por duas vezes, e bloqueamos a peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 3%, em água destilada por 30 minutos.

Fizemos, então, o bloqueio dos sítios protéicos, presente nos tecidos, com albumina sérica 1% e triton X-100 a 0,1% diluídos em PBS, pH 7,4, por 30 minutos. Incubamos as lâminas com o anticorpo primário α -KIAA0090 (N- ou C-terminal) na concentração de 30 μ g/ml, diluído na solução de bloqueio, por duas horas. Após esse

tempo, lavamos as lâminas com triton X-100 a 0,1% em PBS, por quatro vezes de 15 minutos. Incubamos as lâminas com o anticorpo secundário *goat- α -rabbit* (1:300), conjugado com HRP (*Horseradish Peroxidase*), diluído em solução de bloqueio, por 2 horas e, em seguida, repetimos as lavagens. Para revelarmos as marcações, utilizamos solução de 3,3'-diaminobenzidina a 0,05% e peróxido de hidrogênio 0,02% em tampão Tris-HCl 0,05M, por 30 minutos. Paramos a revelação com água destilada e fizemos contra-coloração com hematoxilina. Montamos as lâminas com o meio de montagem *permount*. Como controle, omitimos a incubação com o anticorpo primário, para um corte de cada tecido. A observação e documentação da análise foram realizadas em microscópio *Olympus BX50* e câmera digital *Nikon DXM1200*.

Para marcação por *immunoblotting*, fragmentos de tecidos frescos de ratos Wistar (testículo, esôfago, língua e timo) foram retirados, lavados em solução de NaCl 0,9% gelada e macerados em nitrogênio líquido. Os tecidos foram lisados em tampão deoxicolato (Tris-HCl 50mM, deoxicolato 2%) e centrifugados a 20.000xg por 20' a 4°C. O pellet foi ressuspenso em uréia 2M pH 12,0, homogeneizado no Pellet Pestle Motor® e centrifugado nas mesmas condições. As amostras de cada etapa do processo foram submetidas à *western blot*.

Nós também determinamos o padrão de expressão da proteína KIAA0090 endógena e sua localização intracelular por imunocitoquímica e imunohistoquímica nas seguintes linhagens celulares: WM9, WM793, WM278, HeLa, COS-7 e Vero.

Realizamos ainda a marcação da proteína em amostras de tecidos tumorais humanos, carcinoma mamário e linfonodo sentinela de melanoma, obtidos em colaboração com o Dr. Daniel Tiezzi da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e com o Dr. Gilles Landman do Hospital do Câncer A.C. Camargo, respectivamente.

A localização subcelular da KIAA0090 foi inferida por meio da análise de sua colocalização com marcadores específicos de proteínas como HSP70, uma chaperona mitocondrial.

3.10 Indução de estresse

Para os ensaios de estresse utilizamos alguns agentes relacionados a processos em que a proteína está envolvida, com base nos estudos de larga escala.

Foram plaqueadas células WM278 em placas de 24 wells (30.000 células por poço). Decorridas 24h de plaqueamento as células foram tratadas com os seguintes agentes diluídos no meio de cultura:

- Tunicamicina nas concentrações de 20µg/ml e 5µg/ml;
- MG132 nas concentrações de 20µM e 5µM;
- Complexo de rutênio liberador de NO: $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4(\text{INA})](\text{BF}_4)_3$ nas concentrações de 100µM e 50µM;
- Brefeldina A nas concentrações de 15µg/ml e 5µg/ml;

Como controle foram utilizadas células não tratadas. A exceção do tratamento pela Brefeldina A de 3h, nos demais tratamentos as células foram incubadas com estes compostos por um período de 24h, fixadas em paraformaldeído 2% e submetidas à imunocitoquímica utilizando o anticorpo contra a porção amino terminal da KIAA0090.

3.11 Imunocitoquímica

Para o ensaio de imunocitoquímica as células foram lavadas com PBS pré-aquecido a 37°C e fixadas com paraformaldeído 2% (SIGMA) e EGTA 50mM em PBS por 20 min a 37°C. Após a fixação, as células foram permeabilizadas com Triton X-100 0,3% por 15 min à temperatura ambiente e então submetidas a três lavagens de 5 min em PBS. Os aldeídos livres formados no processo de fixação foram bloqueados com Glicina 250 mM (SIGMA) em PBS, por 5 min. Em seguida as células foram lavadas 2 vezes de 5 min com PBS. Os sítios inespecíficos foram então bloqueados com BSA 1% em PBS (solução de bloqueio) durante 1 h à temperatura ambiente.

Após o bloqueio as células foram incubadas por 1 h à temperatura ambiente com o anticorpo primário devidamente diluído em solução de bloqueio e previamente centrifugado a 20.000xg por 1 h a 4°C. As lamínulas foram submetidas a 5 lavagens de 5 min com PBS e incubadas com o anticorpo secundário conjugado com radical fluorescente, diluído em solução de bloqueio contendo o corante DAPI (Molecular Probes) para marcação nuclear. Terminada a incubação, as células foram lavadas 5 vezes de 5 min com PBS. Procedeu-se com a montagem das lamínulas sobre lâminas com a solução de montagem *Fluoromount G* (*Electron Microscopy Sciences*) e selagem com esmalte cosmético.

As lâminas de imunocitoquímica foram observadas e documentadas em microscópio confocal (Leica – modelos SP2 e SP5) e armazenadas a -20°C.

3.12 Anticorpos Secundários e Marcadores Fluorescentes

- anticorpo cabra anti-IgG de coelho conjugado com Alexa 488 (Molecular Probes), utilizado na diluição 1:350;
- anticorpo cabra anti-IgG de coelho conjugado com Alexa 594 (Molecular Probes), utilizado na diluição 1:350;
- anticorpo cabra anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa 594 (Molecular Probes), utilizado na diluição 1:350;
- marcador nuclear DAPI (Dihidrocloreto de 4',6 diamino-2-fenilindol – Molecular Probes, utilizado na concentração de 2µg/mL);
- Texas Red-Faloidina ou Rodamina-Faloidina (Molecular Probes) utilizados na diluição de 1:100;
- anticorpo policlonal de cabra anti IgG de camundongo conjugado a HRP (*Horse Radish Peroxidase, Promega*) utilizado na diluição de 1:5000;
- anticorpo policlonal de cabra anti IgG de coelho conjugado a HRP (*Horse Radish Peroxidase, Promega*) utilizado na diluição de 1:5000;

3.13 Extração de RNA total das linhagens celulares

O meio de cultura foi retirado do frasco e foram acrescentados 1,0 mL de Trizol[®] (Invitrogen, Life Technologies) para cada 10 cm² de diâmetro da placa de cultivo, no caso de células aderentes. As células foram lisadas e o material foi transferido para um tubo de 15mL, ao qual foram acrescentados 0,2mL 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 foram adicionados 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 2,0mL 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).

3.14 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 microcentrifuga e o volume ajustado para 10 μ L com H₂O tratada com DEPC. Adicionamos 2 μ L do Tampão de Reação (10X) da Transcriptase Reversa, 0,8 μ L do mix de dNTPs (25X), 1 μ L de oligo (dT) 25 (250 ng/ μ L), 1 μ L de inibidor de RNase, 2 μ L de random primer (10X) e 1 μ L da enzima Multiscrib RT, num volume final de 20 μ L. 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.

IV. RESULTADOS

4.1 A KIAA0090 é uma proteína de membrana altamente insolúvel

4.1.1 Análises "in silico" da proteína KIAA0090

Primeiramente, fizemos um alinhamento da proteína KIAA0090 humana com seqüências de aminoácidos ortólogas, oriundas de diferentes espécies, representando os diferentes domínios funcionais da proteína utilizando o software ClustaW (anexo A). A KIAA0090 apresentou domínios altamente conservados entre as espécies analisadas, uma vez que encontramos similaridade de seqüência desde levedura (*S. cerevisiae*) até eucariotos superiores como *Mus musculus*, indicando que esta seja uma proteína importante envolvida na sobrevivência celular.

Submetemos então a seqüência de 993 aminoácidos da KIAA0090 (RefSeq NP_055862) ao software WinPep (Hennig, 2002), extraíndo alguns dados físico-químicos da proteína. A massa molecular predita foi de 111,7kDa e o pI 4,22. A composição de aminoácidos é variável, mas vimos que leucina foi o aminoácido predominante, representando 12,3% da composição total protéica, sugerindo que a KIAA0090 seja uma proteína insolúvel, uma vez que leucina é um aminoácido altamente hidrofóbico.

Para melhor avaliarmos a questão de solubilidade da proteína, utilizamos a escala Kyte-Doolittle (Kyte & Doolittle, 1982), com uma janela de 11 aminoácidos, analisando o perfil de hidrofobicidade da KIAA0090. A proteína apresentou valores acima de 1,6, indicando que ela possui domínios transmembranas, sendo, portanto, insolúvel, corroborando os dados físico-químicos (Fig.3).

Figura 3. Análise de hidrofobicidade in silico prevê que a KIAA0090 é insolúvel. O gráfico apresentou valores acima de 1,6, utilizando a escala Kyte-Doolittle indicando um comportamento insolúvel para a proteína.

Uma vez que a proteína apresentou um perfil altamente hidrofóbico, fizemos maiores análises acerca da topologia da proteína utilizando a plataforma SOSUI (Hirokawa *et al.*, 1998) para a predição de regiões transmembrana.

O software retornou duas potenciais regiões transmembrana (Fig. 4), sendo uma N-terminal, consistindo de uma hélice secundária abrangendo 23 aminoácidos (7-29) e uma hélice primária na região C-terminal abrangendo 22 aminoácidos (958-979).

Figura 4. Análises de topologia in silico mostram que a KIAA0090 possui duas potenciais regiões transmembrana. O gráfico representa o padrão topológico da proteína ao longo de sua sequência de aminoácidos. Os quadros em verde indicam as duas regiões transmembrana identificadas.

Na busca por modificações pós-traducionais para a KIAA0090, utilizamos a plataforma NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) para a predição de prováveis sítios de N-Glicosilação na proteína. A análise mostrou que a KIAA0090 possui na asparagina 913 um potencial sítio de N-glicosilação (Fig. 5), sugerindo desta forma possíveis papéis estruturais para a proteína, uma vez que quase todas as proteínas secretadas e associadas à membrana de células eucarióticas são glicosiladas, participando ainda em processos de comunicação intracelular (Alberts *et al.*, 2004).

Figura 5. A análise *in silico* acerca de modificações pós-traducionais mostrou que a KIAA0090 possui um potencial sítio de N-glicosilação no resíduo 913. O gráfico mostra os potenciais sítios de N-glicosilação da proteína ao longo de sua sequência de aminoácidos, representado pelas linhas azuis.

Baseando-se nessas evidências obtidas pelas análises *in silico*, propusemos então um modelo esquemático representando a localização da KIAA0090 na membrana.

Figura 6. A KIAA0090 é uma proteína glicosilada presente na membrana. Modelo esquemático representando a localização da proteína na membrana. Segundo as predições, a KIAA0090 possui uma região transmembrana que compreende 20 aminoácidos (959-979), um pequeno domínio citosólico (980-993) e uma extensa porção extra celular abrangendo 936 aminoácidos (22-958). É indicado também o sítio de N-glicosilação no resíduo 913.

Por meio do software SignalP 3.0 (Bendsten *et. al*, 2004), disponível em <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>, vimos também que a KIAA0090 apresenta entre os aminoácidos 1-21 um peptídeo sinal, que é uma curta seqüência de aminoácidos que dirige o endereçamento de uma proteína para organelas específicas e através da via secretória (Alberts *et al.*, 2004).

Figura 7. A KIAA0090 possui um sítio de clivagem e secreção entre os aminoácidos 1-21. O espectro do gráfico mostra o score ao longo da seqüência de aminoácidos da proteína indicando a potencial ocorrência de um peptídeo sinal.

Todas essas análises permitiram-nos extrair importantes dados físico-químicos e estruturais sobre a KIAA0090, reunindo informações que nos possibilitaram inferir possíveis papéis funcionais para a proteína.

4.1.2 Purificação das proteínas recombinantes

Para a purificação das proteínas recombinantes, utilizamos as construções da KIAA0090 em fusão a GST ou His-tag, presentes em nosso laboratório que foram obtidas durante o trabalho de mestrado de Milene Mantovani Lopes.

Primeiramente realizamos um teste de indução com a construção His-K₂, mas não notamos diferenças na expressão através do SDS-PAGE, ou seja, a banda correspondente a His-K₂ não foi visível por coomassie (Fig. 8).

Figura 8. A proteína de fusão His-K2 não é visível por coomassie. Análise por SDS-PAGE da indução de His-K₂, a 37°C por 4h com 0,4mM de IPTG. (1) não induzido, (2) induzido.

Deste modo, decidimos focar na purificação de GST-K₂ para gerar anticorpos anti-C-terminal. A proteína de fusão foi expressa na linhagem de *E. coli* (BL21 C+), sendo a expressão induzida com 0,4mM de IPTG, a 37°C por 3h. Como esperado, segundo os dados preditos de solubilidade da proteína, observamos que esta foi expressa na forma de corpos de inclusão, permanecendo quase totalmente na fração insolúvel (Fig. 9).

Figura 9. A proteína de fusão GST-K2 é expressa na forma de corpos de inclusão. Análise por SDS-PAGE da indução de GST-K₂, a 37°C por 4h com 0,4mM de IPTG. (NI) não induzido, (I) induzido, (S) sobrenadante, (P) pellet.

A fusão com GST não auxiliou no processo de solubilização da proteína, embora muitos autores afirmem que a expressão em fusão com outras proteínas aumente a solubilidade e eficiência de enovelamento de proteínas recombinantes, como a glutationa-S-transferase (Smith; Johnson, 1988).

Como não obtivemos quantidade suficiente de proteína solúvel, trabalhamos com a forma insolúvel (corpo de inclusão). O pellet oriundo de uma cultura bacteriana induzida de GST-K₂ (1L) foi lisado em 20ml do tampão de lise para GST descrito na metodologia, centrifugado e o sobrenadante passado na coluna de sepharose-glutationa 4B, que foi previamente recuperada.

A eluição foi realizada com glutationa 10mM, sendo coletado três picos (Fig. 10). Os eluatos foram agrupados e submetidos à diálise, sendo a concentração protéica aferida pelo método de Bradford.

Figura 10. Purificação de GST-K₂. SDS-PAGE da purificação de GST-K₂ utilizando a coluna de sepharose glutationa-4B. FT (flow-trough), E1-3 (eluatos).

Ainda que a maioria da proteína não se ligou à resina, visto pela banda na amostra do flow-trough, conseguimos purificar com sucesso a proteína adotando esta metodologia, embora com pequeno rendimento, conseguimos 60µg de proteína, que foi utilizada para imunizar o coelho para a produção de anticorpos.

4.1.3 Purificação do anticorpo contra a região N-terminal (α -K₁)

Embora o enfoque seja a purificação de um anticorpo contra a região C-terminal, precisou-se purificar mais anticorpos contra a região N-terminal, frente à necessidade de maiores estudos, bem como ampliar a caracterização do mesmo, uma vez que seus estoques estavam se esgotando em nosso laboratório. Para isso foram utilizados os soros congelados coletados dos coelhos imunizados durante a realização da dissertação de mestrado de Milene Mantovani Lopes, cuja produção havia sido padronizada.

A imunização foi realizada contra a proteína de fusão His-K₁ (metade N-terminal da KIAA0090 em fusão com His-tag). O soro foi centrifugado para remover precipitados e foi adsorvido contra uma membrana contendo lisado bacteriano total (de cultura induzida His-EGFP-MVaf), para remover anticorpos contra qualquer antígeno bacteriano e His tag. O soro adsorvido foi então incubado com fitas de nitrocelulose contendo a proteína GST-K₁ enriquecida, para purificação dos anticorpos específicos α -K₁. A eluição com glicina pH 2,5 mostrou-se altamente eficiente para romper a ligação do anticorpo ao antígeno, permitindo um rendimento de até 1,0 mg/ml de anticorpo purificado, conforme mostrado na tabela 1.

Tabela 1. Purificações para o anticorpo contra a região N-terminal da KIAA0090.

Purificação	[] mg/ml	Volume final (ml)
1	0,4	2
2	0,27	2
3	1,0	2

Foram também realizadas tentativas de precipitação de IgG a partir do soro total por meio de (NH₄)₂SO₄ 3M a fim de se obter uma melhor purificação do anticorpo, porém, o processo se mostrou foi ineficiente, acarretando perdas de rendimento.

Para checar a eficiência da purificação, testamos os anticorpos purificados contra amostras de lisados bacterianos totais contendo as proteínas GST-K₁, GST-K₂, His-K₁ e His-K₂ através de *western blot* (Fig. 11).

Figura 11. O anti-K1 reconhece com especificidade as proteínas recombinantes expressas em bactéria. SDS-PAGE dos lisados bacterianos contendo as proteínas recombinantes (esquerda). À direita, *western blot* com as mesmas amostras utilizando o anticorpo purificado α -K₁ na concentração de 1:1000. (1) GST-K₁, (2) GST-K₂, (3) His-K₁, (4) His-K₂.

Nota-se que o anticorpo purificado reconheceu eficientemente as proteínas recombinantes expressas em bactéria (GST-K₁ e His-K₁), evidenciando as bandas no tamanho esperado (~85kDa e 60kDa, respectivamente), não se observando marcações no lisado de GST-K₂ ou His-K₂.

4.1.4 Produção e caracterização do anticorpo contra a região C-terminal (α -K₂)

Para a purificação do anticorpo que reconhece a região C-terminal da KIAA0090, nos baseamos na mesma metodologia aplicada ao α -K₁, uma vez que já se tinha padronizado com sucesso as etapas deste procedimento. Fizemos, no entanto, muitas tentativas de eluir a proteína recombinante GST-K₂, presente em corpos de inclusão, da membrana de nitrocelulose segundo o protocolo estabelecido por Szewczyk e Summers (1988), de modo a obter a proteína solúvel para realizar a imunização do coelho. Para isso, o pellet de bactérias contendo a proteína enriquecida em corpos de inclusão foi ressuspenso em tampão de amostra 2X, submetido a SDS-PAGE, em gel de poço

duplo, e transferido posteriormente tanto para membrana de nitrocelulose quanto para membrana de PVDF.

Procuramos ainda alterar algumas variáveis no tampão de transferência (metanol 15% ou etanol 20%), bem como aumento do tempo e voltagem, e também a utilização de transferência pelo método *semi-dry*. No entanto, todas as tentativas de eluição da proteína da membrana não foram eficientes.

Deste modo, recorremos à metodologia tradicional já descrita, revelando o gel com KCl 0,5M, recortando a banda referente a proteína de interesse, e homogeneizando-a em PBS com auxílio de *dounce* de modo a preparar uma solução homogênea para ser injetada, uma vez também que o rendimento obtido da proteína GST-K₂ purificada por afinidade foi inviável para a completa imunização do coelho.

Foram injetadas 10 doses de proteína no coelho, sendo aplicada em cada uma aproximadamente 100µg. Ao longo da terceira dose, começamos a coletar o soro e realizar os testes de afinidade por *western blot* e através de imunocitoquímica com células transfectadas.

Para realizar um teste da especificidade do soro coletado, transfectamos células HEK293-T com as construções EGFP-KIAA, KIAA-EGFP, EGFP-K₁ e EGFP-K₂, utilizando o soro diluído 1:1000 em ensaio de imunocitoquímica (Fig. 12). Como anticorpo secundário, utilizamos *goat-α-rabbit* conjugado com Alexa 594 da Molecular Probes, na diluição de 1:300. Como controle, utilizamos células HEK 293-T não transfectadas. Para aquisição das imagens, os parâmetros de exposição, intensidade do laser e ganho foram ajustados para a cultura transfectada com a KIAA-EGFP completa, sendo os mesmos parâmetros fixados para todas as lâminas.

O soro reconheceu com especificidade a proteína recombinante em fusão com EGFP expressa nas células, amplificando a intensidade do sinal nas células transfectadas, mostrando ainda perfeita co-localização com o sinal obtido pelo EGFP. Nota-se que o reconhecimento foi específico para as construções da proteína de fusão inteira e da porção C-terminal, não havendo co-localização nas células transfectadas com

a porção N-terminal da KIAA0090. Como esperado, nas células controles não transfectadas não obtivemos amplificação do sinal da fluorescência.

Figura 12. O soro α -K2 reconhece com especificidade a região C-terminal da KIAA0090. Teste de especificidade, realizado por imunocitoquímica em células HEK293-T, controle e transfectadas, conforme indicado, para o soro de coelho imunizado com GST-K₂ na diluição de 1:1000.

Confirmada a especificidade do soro, partimos para a purificação do anticorpo pelo método de adsorção em membrana, descrito na metodologia, fazendo uma incubação prévia com membrana contendo GST para adsorção de anticorpos indesejáveis do soro.

Embora com rendimento menor de purificação, comparado ao anticorpo contra a região N-terminal, obtivemos três purificações, nas concentrações de 0,33mg/ml, 0,35mg/ml e 0,3mg/ml, respectivamente, em volume final de 2ml cada uma.

A atividade dos anticorpos purificados foi confirmada por *western blot* em lisados de HEK293-T transfectadas ou não com as proteínas recombinantes em fusão com EGFP, metade amino e carbóxi terminal (Fig. 13).

Figura 13. Anticorpos α -K₂ após purificação por afinidade reconhecem o domínio C-terminal da KIAA0090 em fusão com EGFP. (A) Análise por SDS-PAGE dos extratos celulares de HEK293-T expressando ou não as proteínas de fusão; (B) Western blots revelados, respectivamente, com α -GFP (1:1000) e α -K₂ (1:500). (1) célula não transfectada, (2) célula expressando EGFP-K₁ e (3) célula expressando EGFP-K₂. A seta indica a banda de EGFP-K₂ na faixa de massa molecular esperada.

No ensaio de *western blotting* observamos que o anticorpo purificado reconheceu com especificidade a construção contendo a porção C-terminal da KIAA0090. De modo a confirmar a especificidade do anti-K₂, realizamos um ensaio de imunocitoquímica em células HEK293-T transfectadas com a KIAA0090 em fusão a EGFP ou com a proteína sem etiqueta de fusão, no vetor pCDNA3 (Fig. 14).

Vimos que o anticorpo reconheceu com especificidade tanto a proteína recombinante em fusão a EGFP como a proteína sem etiqueta de fusão, visto pela intensidade do sinal amplificado nas células que foram transfectadas, mostrando ainda perfeita sobreposição com o sinal do EGFP.

Com esta nova ferramenta em mãos, partimos então para os ensaios de imunolocalização tecidual da proteína.

Figura 14. O anti-K2 reconhece com especificidade as proteínas de fusão expressas em células de mamíferos. Imunocitoquímica realizada em células HEK293-T expressando a KIAA0090 em fusão a EGFP (verde) ou sem etiqueta de fusão no vetor pCDNA3. Marcação para o anti-K₂ (vermelho); em azul a marcação nuclear por DAPI.

4.1.5 Análise das proteínas recombinantes em fusão com GST por western blot e espectrometria de massa

Para checar a integridade das proteínas em fusão com GST submetemos a *western blotting*, amostras de extratos totais de bactéria contendo as proteínas recombinantes GST-K₁, GST-K₂ e His-K₁, além de uma amostra de GST purificada, como controle positivo, utilizando para marcação, os anticorpos α-GST e α-K₁ (Fig. 15).

Figura 15. Avaliação da especificidade dos anticorpos α-K1 e integridade das proteínas de fusão da KIAA0090. Imunodeteção com α-K1 (1:1000) e α-GST (1:500). (1 a 3) lisados bacterianos contendo as proteínas de fusão GST-K₁, GST-K₂ e His-K₁, respectivamente, e (4) GST purificada.

Observamos que o anticorpo reconheceu as proteínas recombinantes GST-K₁ e His-K₁, mas não GST-K₂ nem a GST sozinha, indicando que o mesmo é específico contra a região N-terminal da KIAA0090. A marcação na parte superior da membrana é característica de agregação de proteínas de fusão insolúveis e as várias bandas que aparecem abaixo das de interesse devem representar produtos de degradação.

No entanto, observa-se na altura de aproximadamente 30 kDa uma banda comum entre as duas membranas e que aparece nos três lisados. Como o anticorpo secundário foi o mesmo para as duas membranas, é provável que estas bandas representem marcações inespecíficas deste anticorpo.

Na imunodeteção com α -GST, observamos a marcação da proteína GST purificada indicando que o anticorpo está ativo e funcional. Porém, curiosamente não obtivemos marcação para as proteínas de fusão GST-K₁ e GST-K₂ como esperado, uma vez que, supostamente, estas proteínas estão em fusão com GST.

Frente a esse resultado, optamos por fazer um ensaio baseado na metodologia de *dot blot* para checar as amostras em condição nativa, aplicando diretamente sobre a membrana de nitrocelulose 10 μ l de amostras de lisado contendo a GST-K₂, em diluições seriadas. Novamente, nenhuma marcação das amostras desta proteína de fusão foi detectada com o α -GST (resultado não mostrado). Assim, uma vez que as construções foram devidamente seqüenciadas e confirmadas estarem corretas, suspeitamos que talvez as proteínas recombinantes pudessem estar sendo traduzidas erroneamente em bactéria, de tal maneira que um ATG interno estivesse sendo usado como códon de iniciação. Para avaliarmos essa possibilidade, propusemos analisar as proteínas de fusão por espectrometria de massa, como descrito a seguir.

Amostras de GST-K₁ e GST-K₂ foram submetidas à SDS-PAGE e detectadas por coloração por Coomassie blue coloidal. As bandas referentes às proteínas de interesse foram recortadas do gel e submetidas à análise por espectrometria de massas, gentilmente realizada pelo Dr. César Rosa no Laboratório de Química de Proteínas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Figs. 16-19).

Figura 16. Espectro de massa para a proteína de fusão GST-K₁.

Figura 17. Espectro de massa para a proteína de fusão GST-K₂.

Figura 18. Resultados da análise dos peptídios das proteínas de fusão GST-K₁ e GST-K₂ na base de dados Mascot (<http://www.matrixscience.com>). É mostrada a sequência de aminoácidos da proteína KIAA0090. Marcados em vermelho, estão a sequência dos peptídeos representados nos espectros de massa para a porção N- e C-terminal, respectivamente. A caixa em azul demarca os aminoácidos que são comuns entre as duas construções da KIAA0090.

Figura 19. Resultados da análise dos peptídeos confirma a presença de GST nas proteínas de fusão. É mostrado aqui a sequência da GST do vetor pGEX, com a sequência de aminoácidos dos peptídeos representados nos espectros de massa correspondentes à porção GST, confirmando a presença desta proteína em fusão com os dois domínios da KIAA0090, conforme predito com base em sequenciamento de DNA das construções.

As análises mostraram correspondência da amostra GST-K₁ com a região N-terminal da proteína KIAA0090 e GST-K₂ com a porção C-terminal e confirmaram a presença de peptídeos da proteína de fusão GST em ambas as amostras, assim esclarecendo que as duas proteínas recombinantes são genuínas fusões dos domínios N e C-terminal da KIAA0090 com a GST.

4.2. A KIAA0090 é expressa em vários tecidos e está associada à mitocôndria e Golgi

4.2.1 Marcação do domínio N-terminal (α -K₁)

Realizamos ensaios de coimunocitoquímica com o α -K₁ e um anticorpo contra a chaperona mitocondrial HSP70, mostrando que a marcação do α -K₁ é altamente associada à mitocôndria, em diferentes linhagens de células não tumorais e tumorais, confirmando os dados já obtidos durante o mestrado de Milene Mantovani Lopes (Figs.20 e 21).

Figura 20. Marcação da KIAA0090 endógena pelo anticorpo contra o domínio N-terminal colocaliza-se com a chaperona mitocondrial HSP70 em todas as linhagens celulares estudadas. Painel contendo duas linhagens de células não tumorais, FM308 (melanócitos humanos de cultura primária) e Vero (células renais de macaco de origem epitelial) marcadas com α -K₁ (20 μ g/ml) em verde e α -HSP70 (1:400) em vermelho.

Figura 21. A KIAA0090 também está associada a mitocôndrias em células tumorais. Painel contendo duas linhagens de células tumorais de melanoma, WM793 (melanoma humano vertical) e WM9 (melanoma humano metastático) marcadas com α -K₁ (20 μ g/ml) em verde e α -HSP70 (1:400) em vermelho.

Curiosamente, em uma linhagem de fibroblastos humanos, observamos que além da marcação mitocondrial da KIAA0090 em perfeita co-localização com a chaperona HSP70, a proteína parece se estender para a região da membrana celular (Fig. 22).

Figura 22. A KIAA0090 parece se associar também à membrana celular. Fibroblastos humanos marcados com anti-K₁ (20μg/ml) e anti-HSP70 (1:400), mostrando perfeita co-localização entre as duas marcações. No detalhe à direita em maior aumento, pode-se notar que a proteína está presente não só na mitocôndria, mas parece estar associada também à região da membrana celular (seta branca).

Esses dados corroboram as predições estruturais da KIAA0090 uma vez que a proteína possui em sua extremidade N-terminal um sinal de endereçamento mitocondrial e domínios transmembrana, podendo desempenhar algum papel no metabolismo energético ou até mesmo na sobrevivência da célula, uma vez que esta organela está intimamente relacionada a processos de morte celular.

4.2.2 Marcação do domínio C-terminal (α -K₂)

Embora vimos que a marcação do anticorpo contra a região N-terminal está claramente associada à mitocôndria, os dados de imunocitoquímica realizados com o anticorpo contra a região C-terminal da KIAA0090 mostraram um padrão de marcação perinuclear característico de associação com o Golgi, uma vez que se mostrou em perfeita co-localização com a proteína 58K, oriunda desta organela, e não mostrou nenhuma associação à mitocôndria, em todas as linhagens celulares estudadas (Fig. 23).

Figura 23. A KIAA0090 também está associada ao complexo de Golgi em todas as linhagens estudadas. Imunocitoquímica realizada em diversas linhagens celulares mostrando a marcação da KIAA0090 endógena utilizando o anticorpo contra o domínio C-terminal. (A) linhagem de melanoma metastático (WM9), mostrando perfeita co-localização da proteína com o marcador de Golgi 58K. (B) e (D) marcação na linhagem de melanócitos humanos FM308, e células humanas endoteliais ECV304, respectivamente, mostrando que a marcação do domínio C-terminal não possui associação com mitocôndrias. Em (C) marcação na linhagem de melanoma metastático 1205Lu. Anti-K₂ (20µg/ml), anti-HSP70 (1:400), anti-58K (1:500) e DAPI (azul).

4.2.3 A KIAA0090 pode sofrer rápida degradação

Embora ambos os anticorpos produzidos sejam eficientes para marcação celular por imunofluorescência, em lisados de células submetidos a *western blot* eles apresentam algumas limitações para a detecção da proteína endógena. O anti-K₂ foi capaz de detectar um polipeptídeo migrando na faixa de massa molecular aparente de 130kDa, indicando que este seja o peptídeo maduro com prováveis modificações pós-traducionais (Fig. 24).

No entanto, os dois anticorpos revelaram várias outras bandas abaixo da altura de 130kDa, sugerindo que provavelmente houve degradação da proteína, com destaque para um polipeptídeo com sinal mais intenso na altura próxima de 60kDa. Sugere-se que este seja um produto estável de degradação, podendo ser resultado da clivagem da proteína em sua porção central, sendo que a banda observada corresponderia às duas metades sobrepostas da proteína clivada.

Figura 24. A KIAA0090 pode sofrer rápida degradação. (A) Análise por SDS-PAGE dos extratos celulares de WM9 (melanoma metastático) e FM308 (melanócitos humanos de cultura primária). (B) Os mesmos extratos foram submetidos a western blot com os dois anticorpos produzidos, indicando uma banda na altura aproximada de 60kDa, com maior intensidade quando utilizado o anticorpo contra a região C-terminal da proteína. As bandas mais fracas indicam uma possível degradação.

Uma das questões era se ambos os anticorpos reconhecem, em western blots, a proteína KIAA0090 em fusão com EGFP. Utilizamos então células HEK-293T transfectadas com a construção KIAA-EGFP com o objetivo de responder tal questão e de analisar a solubilidade da proteína de fusão que pretendemos futuramente utilizar para ensaios de interação proteína-proteína. Vimos que a KIAA-EGFP é reconhecida pelo α -K₂, mas não pelo α -K₁ (Fig. 25).

Figura 25. Teste de solubilidade para a proteína KIAA0090 em fusão com EGFP. Como controle negativo foram utilizadas células HEK293T transfectadas com o vetor pEGFP vazio. (LT) lisado total, (S) sobrenadante e (P) pellet.

Esse dado nos trouxe a perspectiva de conseguirmos detectar a isoforma da KIAA0090 endógena associada à via secretora em lisados celulares e teciduais, por *western blotting*. Assim, esperamos elucidar várias lacunas na compreensão das isoformas dessa proteína em diferentes células e tecidos.

4.2.4 Perfil de distribuição da KIAA0090 em tecidos murinos

Avaliamos o perfil de expressão tecidual da KIAA0090, tanto em lisado de tecidos utilizando o anticorpo contra a região N-terminal da proteína, quanto por meio de imunohistoquímica de fluorescência, utilizando os dois anticorpos purificados. Em nível tecidual, a expressão da proteína também se mostrou diferente ao se comparar os resultados dos dois anticorpos produzidos, com variações também nos tipos celulares marcados em cada órgão.

4.2.4.1 Marcação do domínio N-terminal (α -K₁)

Quando utilizamos o anticorpo que reconhece a região N-terminal da KIAA0090 observamos marcação intensa apenas em língua, timo, esôfago, estômago e traquéia. Outros órgãos e tecidos apresentam marcação menos proeminente, mas ainda significativa, como por exemplo, músculo liso visceral, músculo esquelético e cardíaco, epitélio de revestimento intestinal e linfonodo. Vale ainda salientar, que detectamos marcação de grau intermediário, generalizada em endotélio e camada muscular vascular.

A língua é uma massa de músculo estriado esquelético, revestida por uma membrana mucosa cuja estrutura varia de acordo com a região. As fibras musculares se entrecruzam em três planos distintos e se encontram agrupadas em feixes, geralmente separados por tecido conjuntivo (Junqueira; Carneiro, 2004).

No ensaio imunohistoquímico, observamos uma marcação associada à camada mais externa do epitélio de revestimento estratificado pavimentoso que forma a mucosa lingual, e predominante também em ductos e glândulas associadas (Fig. 26).

Figura 26. A KIAA0090 está presente no epitélio de revestimento da língua. Marcação para KIAA0090 (verde) em corte longitudinal da língua, através de imunohistoquímica utilizando o anti-K₁. (A) tecido corado com hematoxilina-eosina; (B) epitélio de revestimento; (C) marcação característica associada a glândulas e ductos

O timo é um órgão linfoepitelial que se encontra subdividido em lóbulos, formado por uma parte periférica (zona cortical) que por sua vez envolve a parte central (zona medular). Na zona medular encontramos as células reticulares, que podem apresentar grânulos semelhantes aos de secreção e formam uma rede produzindo vários fatores de crescimento protéico, que estimulam a proliferação e diferenciação de linfócitos T, atuando localmente por secreção parácrina (Junqueira; Carneiro, 2004).

No timo, observamos intensa marcação da KIAA0090 restrita às células reticulares na região medular (Fig. 27).

Figura 27. A KIAA0090 foi detectada no timo. Marcação para KIAA0090 (verde) em corte do timo, através de imunohistoquímica utilizando o anti-K₁. (A) corte histológico corado com hematoxilina-eosina; (B) marcação das células reticulares, concentradas na região medular do timo; (C) maior aumento da zona medular, evidenciando a forte marcação tecidual.

O esôfago, outro órgão em que a presença da KIAA0090 foi detectada, é um tubo muscular preenchido com camadas mucosas e glândulas secretoras, cuja função é transportar o alimento da boca para o estômago, que por sua vez é um órgão que exerce funções exócrinas e endócrinas, digerindo o alimento e secretando hormônios, formado por quatro regiões, a cárdia, fundo, corpo e piloro (Junqueira; Carneiro, 2004). Nestes órgãos a KIAA0090 se mostrou com forte marcação na camada basal do epitélio de revestimento, restrita à região da transição esôfago-gástrica (Fig. 28).

Figura 28. Localização da KIAA0090 na região de transição esôfago-gástrica. Marcação para KIAA0090 (verde) em corte do estômago, através de imunohistoquímica utilizando o anti-K₁, na região de transição esôfago-gástrica.

A traquéia, outro órgão em que a marcação da proteína foi evidente, é uma continuação da laringe e termina ramificando-se nos dois brônquios extrapulmonares, formando um tubo revestido internamente por epitélio do tipo respiratório. É também um órgão rico em glândulas cuja secreção auxilia na remoção de partículas constituindo uma barreira protetora contra o meio externo (Junqueira; Carneiro, 2004).

Observamos uma marcação da KIAA0090 no epitélio de revestimento, com uma distribuição que é sugestiva de células caliciformes, as quais são produtoras de muco, logo abaixo à borda ciliada e também ao redor das glândulas serosas, anexas à camada submucosa. Encontramos ainda marcação evidente em células basais das glândulas submucosas, as quais são sugestivas de células mioepiteliais (Fig. 29).

Figura 29. A KIAA0090 está presente na traquéia. Marcação para KIAA0090 (verde) em corte da traquéia, através de imunohistoquímica utilizando o anti-K₁. (A) corte histológico corado por hematoxilina-eosina; (B e C) marcação no epitélio de revestimento traqueal e também ao redor das glândulas submucosas; (D) maior aumento da região do epitélio de revestimento evidenciando uma marcação característica em células caliciformes.

Já nos lisados teciduais, observamos a presença de múltiplos peptídeos com diferentes características de solubilidade. Salientamos para a presença de uma banda de aproximadamente 120kDa na fração insolúvel de todos os tecidos analisados (Fig. 30).

Nota-se também que os tecidos com maior intensidade de marcação em imunohistoquímica, como língua, timo e esôfago, apresentam também bandas com sinal mais intenso, em western blots, condizendo com o padrão imunohistoquímico e corroborando ainda mais a hipótese de existência de isoformas da KIAA0090.

Figura 30. Western blot das frações solúveis e insolúvel de diferentes lisados teciduais. Utilizamos o anticorpo produzido contra a região N-terminal da KIAA0090. S1-2 (sobrenadantes do deoxicolato e da uréia, respectivamente), P (pellet). A seta indica o polipeptídeo na altura estimada de 120kDa, na fração insolúvel de todos os tecidos analisados

4.2.4.2 Marcação do domínio C-terminal (α -K₂)

Quando utilizamos o anticorpo produzido contra a região C-terminal da KIAA0090, o padrão de distribuição tecidual da proteína se mostrou mais abrangente e regular que a do primeiro anticorpo.

Observamos marcação em todos os tipos de células teciduais, sendo mais conspícua uma marcação subcelular localizada na região perinuclear, característica de Golgi, e prevalece em células que possuem Golgi mais exuberante. Além disso, marcação moderada, difusa por toda a célula, é observada, em vários tecidos, entre eles glândulas gástricas pilóricas, túbulos renais, músculo estriado esquelético, músculo liso e túbulos seminíferos. Em várias dessas estruturas a distribuição dessa marcação parece associada à membrana plasmática.

No coração, a expressão da proteína foi notória na região perinuclear das células musculares como também dispersa de uma forma pontilhada sobre as estrias do músculo cardíaco, observando ainda uma marcação associada às células endoteliais dos vasos sanguíneos (Fig. 31).

Figura 31. Marcação para KIAA0090 em músculo cardíaco de rato. (A) Corte histológico da parede ventricular do coração corado por hematoxilina-eosina; (B e C) Marcação para KIAA0090 (verde) e núcleo (DAPI, azul) em fibras musculares (B) e região de tecido conjuntivo e vasos sanguíneos (C), utilizando o anti-K₂.

O intestino delgado é o sítio terminal de digestão dos alimentos, absorção de nutrientes e secreção endócrina e consiste de três segmentos, o duodeno, jejuno e íleo. A mucosa intestinal apresenta várias estruturas que aumentam a superfície de absorção como as vilosidades, cujo epitélio apresenta células absorptivas, caliciformes e enteroendócrinas. Entre as vilosidades existem criptas, onde se encontra o nicho de células-tronco, células em fase de proliferação e diferenciação, células neuroendócrinas e as de Paneth. (Junqueira; Carneiro, 2004). No sistema digestório, a marcação para o anti-K₂ foi evidente nas camadas mais basais do epitélio de revestimento do estômago e também associada às glândulas nessa região (Fig. 32). Nas células colunares ao longo de todo o epitélio de revestimento do intestino delgado também observamos a presença da KIAA0090, bem como nas células da lâmina própria, submucosa e camadas musculares, com distribuição característica de Golgi. (Fig. 33).

Figura 32. Marcação para KIAA0090 no estômago. (A) Corte histológico, longitudinal, do estômago, na região cárdica, corado por hematoxilina-eosina; (B) Marcação para KIAA0090 (verde) na região nas camadas basais do epitélio de revestimento, através de imunohistoquímica com o anti-K₂ (C-terminal).

Figura 33. Marcação para KIAA0090 em intestino delgado de rato. (A) Corte histológico, transversal, do intestino delgado, corado por hematoxilina-eosina; (B e C) Marcação para KIAA0090 (verde) na região das vilosidades (B) e criptas (C), através de imunohistoquímica com o anti-K₂ (C-terminal).

A KIAA0090 também foi expressa nos testículos, que são envolvidos por uma cápsula de tecido conjuntivo denso, que se espessa formando o mediastino, do qual partem septos que dividem os testículos em lóbulos (Junqueira; Carneiro, 2004). Os lóbulos são ocupados por túbulos seminíferos, os quais produzem células reprodutoras masculinas e as células secretoras de andrógenos. Notamos a marcação da KIAA0090 por todo o epitélio seminífero, no tecido conjuntivo entre os túbulos, e ainda com um nível mais basal de expressão nas células ao longo dos túbulos (Fig. 34).

Figura 34. Marcação para KIAA0090 em testículo de rato. (A) Corte histológico do testículo corado por hematoxilina-eosina; (B) Marcação para KIAA0090 (verde) em corte de testículo, através de imunohistoquímica utilizando o anti-K₂ (C-terminal). Nota: A proteína se mostrou expressa em todo o epitélio dos túbulos seminíferos e células intersticiais. A marcação mais intensa, globular, é característica de Golgi, em espermatogônias e espermatócitos, enquanto a marcação alongada, distribuída radialmente no túbulo seminífero pode representar o Golgi de espermátides.

Na traquéia, observamos uma marcação semelhante à observada com a utilização do anti-K₁, no epitélio contendo as células caliciformes, porém, vimos também uma nítida marcação no pericôndrio e na região perinuclear dos condrócitos presentes na cartilagem hialina, com um padrão evidente de associação ao Golgi (Fig. 35).

Figura 35. Marcação da KIAA0090 na traquéia. Marcação para KIAA0090 (verde) em corte da traquéia, através de imunohistoquímica utilizando o anti-K₂. (A) epitélio de revestimento traqueal (B) região da cartilagem, evidenciando a marcação perinuclear dos condrócitos e também do músculo traqueal (C) maior aumento da região da cartilagem, mostrando o padrão de marcação característico de Golgi. Azul (DAPI).

4.3. A KIAA0090 tem expressão aumentada em tecidos tumorais

Dados de estudos utilizando tecnologias de larga escala confirmam os indícios de associação da KIAA0090 com o câncer, apontados pelos estudos em andamento em nosso laboratório, e, mais ainda, sugerem que essa proteína seja envolvida em respostas ao estresse.

Sabe-se que a célula cancerosa é marcada por aneuploidias, desbalanço do número de cromossomos e rearranjos, funcionando como uma fonte permanente de estresse, tornando a sobrevivência da célula dependente de uma resposta segura a este mecanismo. Neste intuito, buscamos avaliar o padrão de distribuição da KIAA0090 em alguns tecidos tumorais. Realizamos então ensaios de imunohistoquímica com os dois anticorpos em cortes de tumor primário de melanoma, cedidos gentilmente pelo Dr. Gilles Landman do Hospital do Câncer A. C. Camargo.

Embora o tecido tenha se mostrado fortemente marcado, com o uso do anti-K₁, notamos uma intensidade acentuada na região de vasos e locais onde está ocorrendo a invasão tumoral (Fig. 36), corroborando ao padrão constitutivo de distribuição em tecidos normais, visto sua predominância em vasos, ductos e órgãos secretores. Já a marcação obtida pelo anti-K₂ é sugestiva de células inflamatórias e/ou mesenquimais.

Figura 36. A KIAA0090 tem expressão aumentada em tecido tumoral. Imunohistoquímica utilizando os dois anticorpos produzidos. A secção de tumor primário de melanoma mostra forte marcação para o anti-K₁ em vasos e células invasivas (quadro superior), ao passo que o anti-K₂ marcou células inflamatórias (quadro inferior). Em maior aumento pode-se notar um nível mais basal de marcação para o anti-K₁ na membrana celular (setas).

Ampliando nossas análises, realizamos também testes de imunomarcação com os dois anticorpos purificados em cortes histológicos de mama provenientes de tecido normal e tumoral, em colaboração com o Dr. Daniel Tiezzi do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, cujos resultados são bastante animadores (Fig. 37).

Na utilização do anticorpo contra a região N-terminal da KIAA0090, obtivemos em tecido mamário normal uma marcação exclusiva em vasos e glândulas mamárias, observando ainda que a marcação foi restrita à camada basal, a qual é formada por células mioepiteliais.

Já com o uso do anticorpo contra a região C-terminal da proteína neste mesmo tecido, observamos todo o estroma fortemente marcado e também uma marcação, embora menos intensa, no epitélio glandular, porém, na camada apical.

Nos tecidos tumorais, foi nítido o aumento de intensidade de expressão da KIAA0090 na massa tumoral frente à utilização dos dois anticorpos, observando, no entanto, uma marcação mais fraca do anticorpo contra a região N-terminal da proteína.

Figura 37. A KIAA0090 está presente em glândulas mamárias e apresenta aumento de expressão em carcinoma de mama. A distribuição da KIAA0090 foi avaliada em tecidos normais e em carcinoma invasivo de mama com os dois anticorpos, revelando aumento de expressão no tecido tumoral.

Frente a isso, expandimos nossos estudos por meio da tecnologia de Tissue Micro Array (TMA), analisando o padrão de marcação da KIAA0090 em um painel contendo 96 amostras de carcinoma invasivo de mama, de diferentes pacientes em fases distintas da progressão tumoral, cedido também pelo Dr. Daniel Tiezzi, utilizando o α -K1. Classificamos os casos em três subgrupos, de acordo com grau de intensidade da marcação da proteína, sendo o primeiro negativo para a KIAA0090, o segundo apresentando marcação leve a moderada e o terceiro marcação intensa (Fig. 38).

Figura 38. Classificação dos subgrupos de amostras de carcinoma invasivo de mama segundo o grau de intensidade de marcação da KIAA0090. O tipo I corresponde ao grupo negativo, tipo II apresentou marcação leve a moderada e tipo III marcação intensa.

Os dados mostraram que mais da metade das amostras (61,45%) apresentaram intensidade de marcação da KIAA0090 em nível intermediário, notando-se ainda que alguns casos não apresentaram marcação (Tab. 2).

Tabela 2. Padrão de marcação da KIAA0090 em carcinoma mamário

<i>Intensidade</i>	<i>número de casos (%)</i>
-	16 (16,67)
+	59 (61,45)
++	21 (21,87)
Total 96 (100)	

- (ausência de marcação), + (leve a moderada), ++ (intensa)

Por meio de uma análise de contingência notamos que a KIAA0090 apresentou uma relação inversamente proporcional em relação ao grau de diferenciação histológico do tumor (1-3), ou seja, a expressão da KIAA009 é reduzida conforme o avanço da progressão tumoral, observando-se ainda maior número de casos com alta expressão da proteína no grau intermediário de desenvolvimento do tumor (Tabs. 3 e 4). Os gráficos correspondentes a esta análise de correlação encontram-se no anexo B.

Tabela 3. Correlação entre os casos KIAA0090 (+) e o grau histológico de desenvolvimento do tumor

Grade tumoral	KIAA0090 + (%)
1	100
2	85,96
3	71,43

Tabela 4. Correlação entre os níveis de intensidade da KIAA0090 e grau histológico de desenvolvimento do tumor

KIAA0090	- (%)	+ (%)	++ (%)
Grade tumoral			
1	0	11,86	19,05
2	50	59,32	66,67
3	50	28,82	14,28

(-) ausência de marcação, (+) marcação leve a moderada, (++) marcação intensa

Ainda que os resultados de imunomarcção para a KIAA0090 não apresentaram associação com os dados clínicos disponíveis (idade, diâmetro do tumor, etc) observamos algumas associações com outros dados imunohistoquímicos já estabelecidos para essas amostras pelo grupo de pesquisa do Dr. Daniel Tiezzi. A tabela a seguir representa a distribuição observada para os diferentes marcadores entre os casos de carcinoma mamário (Tab. 5). Correlacionamos ainda a ocorrência de marcação da KIAA0090 com a positividade ou negatividade dos marcadores estabelecidos (Tab. 6).

Tabela 5. Análise imunohistoquímica em câncer de mama, para os diferentes marcadores utilizados.

	Nº casos (%)
KIAA0090	
Negativo	16 (16,68)
Positivo (+)	59 (61,45)
Positivo (++)	21 (21,87)
Her-2	
Negativo	79 (82,3)
Positivo	17 (17,7)
RE	
Negativo	46 (47,92)
Positivo	50 (52,08)
RP	
Negativo	54 (56,25)
Positivo	42 (43,75)
CK5	
Negativo	59 (61,46)
Positivo	37 (38,54)
Total de casos	96 (100)

RE (receptor de estrógeno), RP (receptor de progesterona), CK5 (citoqueratina de padrão basal), + (moderada), ++ (intensa).

Tabela 6. Correlação da expressão de marcadores de câncer de mama com a KIAA0090

	casos KIAA0090 positivo (%)	P*
RE		0,01
+	96	
-	79	
RP		0,05
+	95	
-	83	
CK5		0,10
+	94	
-	84	
HER2		0,04
+	76	
-	93	

RE (receptor de estrógeno), RP (receptor de progesterona), CK5 (citoqueratina de padrão basal), * o valor de P foi determinado usando o teste de *Pearson*

Entre os casos positivos para os receptores de estrógeno e progesterona bem como aqueles positivos para citoqueratina 5 notamos maior ocorrência de casos positivos para a KIAA0090, observando-se ainda uma correlação inversa com Her2. Os gráficos correspondentes à análise de correlação para cada marcador encontram-se no anexo B.

4.4 A KIAA0090 responde ao estresse celular

Frente às evidências dos estudos desenvolvidos com tecnologia em larga escala envolvendo a participação da KIAA0090, testamos os efeitos de alguns agentes indutores de estresse (sumarizados na Tabela 7) sobre a localização da proteína (Fig. 39) e expressão (Fig. 40) do gene *KIAA0090*, em células de melanoma. Células de melanoma WM278 foram tratadas e posteriormente imunomarcadas com anti-K₁ (Fig. 39), e células WM793 foram tratadas da mesma maneira e lisadas para extração de RNA, utilizado para quantificação relativa do mRNA por RT-PCR tempo real (Fig. 40).

Tabela 7. Agentes indutores de estresse utilizados na linhagem celular de melanoma WM278

Agente	Atividade	Incubação (h)	[]
tunicamicina	Inibe N-glicosilação	24	5µg/ml e 20µg/ml
etoposídeo	Inibidor de topoisomerase	24	50µM e 100µM
MG132	Inibidor de proteassoma	24	5µM e 20µM
[Ru(NO)(NH ₃) ₄ (INA)](BF ₄) ₃	Liberador de óxido nítrico	24	50µM e 100µM
brefeldina A	Inibidor da via secretória	3	5µg/ml e 15µg/ml

Podemos observar que todos os tratamentos tiveram efeito sobre a KIAA0090, em maior ou menor grau, alterando sua distribuição subcelular e os níveis de mRNA. O efeito mais acentuado observado foi causado pelo [Ru(NO)(NH₃)₄(INA)](BF₄)₃, um composto liberador de NO, que com 50µM levou a uma redistribuição da KIAA0090 para a membrana plasmática, sendo que em algumas células, a proteína parecia aglomerar-se em pequenos compartimentos distribuídos na periferia da célula. No tratamento com 100µM de etoposídeo, a proteína se mostrou dispersa de uma forma predominantemente difusa pelo citoplasma da célula, embora com ligeiro acúmulo perinuclear.

Figura 39. A KIAA0090 tem sua distribuição alterada em resposta ao estresse. Marcação para KIAA0090 com o anti-K₁ (verde) e DAPI (azul) em células WM278 controles ou submetidas a tratamento com diferentes agentes indutores de estresse, conforme indicado, por 24h, exceto para Brefeldina A, por 3h. Imagens representativas de dois ensaios independentes.

Figura 40. Efeito de diferentes agentes indutores de estresse sobre os níveis de mRNA *KIAA0090*. O gráfico representa os níveis de mRNA *KIAA0090* relativos ao mRNA *TBP* da linhagem WM793, após os tratamentos com as drogas indicadas. A mesma quantidade de cDNA de cada amostra foi analisada por real-time PCR utilizando primers específicos e SYBR Green PCR Power Mix no sistema de detecção ABI PRISM 7500. O gráfico representa a média e desvio padrão de quatro amostras, de dois ensaios independentes realizados em duplicatas.

A distribuição da proteína também foi totalmente perturbada na presença de 5µg/ml de brefeldina A, intensificando-se com 15µg/ml da droga, além de se dispersar em forma de pequenas partículas por todo o citoplasma, translocou-se também para o núcleo. Com 5µg/ml de tunicamicina, o padrão de distribuição da KIAA0090 ainda é principalmente de uma proteína associada a mitocôndrias, mas já começa se dispersar de maneira a relocar-se em pequenas partículas, ao passo que com 20µg/ml a proteína se dispersa ainda mais, restando alguns agregados remanescentes de associação com mitocôndrias no citoplasma. O menor efeito observado na relocação da proteína foi após a inibição proteossomal, causada pelo MG132, pois embora KIAA0090 pareça agregada na região perinuclear, a marcação é caracteristicamente mitocondrial, sugerindo que a proteína KIAA0090 manteve-se sua localização normal, isto é, associada às mitocôndrias, as quais, no entanto, se agregaram fortemente na região perinuclear, como resultado do estresse.

Apesar dos intensos efeitos observados sobre o padrão de distribuição subcelular da KIAA0090 após o tratamento com as drogas, o impacto sobre a expressão do mRNA foi notório somente para a brefeldina A, com redução na expressão de aproximadamente 60% comparada às células não tratadas. Entretanto, ligeira queda, mas consistente, da ordem de 15% e 30%, foi induzida, respectivamente, por tunicamicina e MG132. Vale ressaltar que nenhum dos tratamentos levou à morte celular (dados não mostrados), o que poderia interferir nos níveis de mRNA durante a análise.

De modo a complementar a análise de expressão gênica, realizamos um ensaio imunocitoquímico, utilizando os dois anticorpos contra a KIAA0090, na linhagem de melanoma WM793, tratadas ou não com brefeldina A (Figs. 41 e 42). Os efeitos da droga foram visíveis não só sobre a KIAA0090, mas também sobre as mitocôndrias (reveladas por anti-Hsp70 mitocondrial, em vermelho), uma vez que a organela foi perturbada na presença da droga, ficando em parte dispersa em algumas células ou então na forma agregada ao redor do núcleo. Interessante, que em células com mitocôndrias dispersas (ora muito alongadas, ora agregadas ou circulares) notamos ausência ou baixa marcação

de KIAA0090 naquelas mitocôndrias mais alongadas (Fig. 41), enquanto alta intensidade foi observada em mitocôndrias agregadas ou circulares. No entanto, observamos que o efeito do estresse pode ser variável de acordo com a linhagem celular utilizada, uma vez que não notamos realocização da KIAA0090 para o núcleo na linhagem WM793 como observado na linhagem WM278 e assim como em células de melanoma B16-F10 (dados não mostrados).

Figura 41. Efeitos da Brefeldina A sobre a distribuição da KIAA0090 e das mitocôndrias. Imunomarcagem para KIAA0090 com α -K₁ (verde) e α -HSP70 (vermelho) em células da linhagem de melanoma WM793, controles ou tratadas com brefeldina A, conforme indicado. À direita, sobreposição das imagens mostrando colocalização em amarelo e núcleos marcados por DAPI (azul).

Figura 42. Tratamento por brefeldina A induz dispersão e possivelmente redução nos níveis da KIAA0090. Imunocitoquímica mostrando marcação da KIAA0090 (verde), pelo anti-K₂ em células da linhagem de melanoma WM793, tratadas ou não com 5μg/ml de brefeldina A; núcleos são revelados por DAPI (azul). Note a dispersão e possível redução na marcação KIAA0090 após tratamento.

Com a utilização do anticorpo contra a região C-terminal da KIAA0090, confirmamos, como esperado, que a marcação para KIAA0090, concentrada na região correspondente ao aparelho de Golgi em células controle, encontra-se dispersa nas células tratadas. A marcação é também sugestiva de uma redução na quantidade de proteína após o tratamento com a droga (Fig. 42), compatível com a redução nos níveis de mRNA..

V. DISCUSSÃO

Nos últimos anos tem se intensificado a busca por moléculas-chave envolvidas na progressão tumoral através da utilização de tecnologias emergentes como espectrometria de massa e arrays de DNA, de modo a permitir um diagnóstico mais refinado e preciso, desde os estágios mais iniciais da doença, sendo este um fator crucial para a sobrevivência do paciente. Nesse intuito, uma vez que a KIAA0090 se mostrou com expressão elevada nas fases mais avançadas da progressão tumoral do melanoma segundo os dados de expressão gênica em nosso laboratório e dados de estudos em larga escala, investimos na sua caracterização, na busca de compreender melhor seu papel funcional na célula, principalmente por ser uma proteína altamente conservada entre todos os eucariotos.

5.1 A KIAA0090 é uma proteína altamente insolúvel

Por ser uma proteína altamente insolúvel, a proteína KIAA0090 impôs alguns obstáculos para uma solubilização eficiente, sendo obtida somente na forma de corpos de inclusão, ainda que a purificação de proteínas de fusão superexpressas utilizando sistemas de expressão bacterianos tenha se mostrado como uma ferramenta extremamente útil, permitindo a obtenção de grandes quantidades de proteína

possibilitando os estudos acerca da estrutura e função dessas moléculas (Rohman; Harisson-Lavoie, 2000). Uma limitação comum durante a produção de proteínas recombinantes em bactérias é justamente a formação desses agregados insolúveis, conhecidos como corpos de inclusão, em resposta a um enovelamento incorreto da proteína ou por ser alguma molécula tóxica e prejudicial para a célula bacteriana (Ventura; Villaverde, 2006). As construções da KIAA0090 em fusão à GST ou His-tag obtidas durante o trabalho de mestrado de Milene Mantovani Lopes, em nosso laboratório, comportam-se desta forma, e, portanto, investimos na purificação destas proteínas recombinantes buscando métodos alternativos para a solubilização dos corpos de inclusão.

Patra *et al.* (2000) desenvolveram um processo otimizado para solubilizar corpos de inclusão do hormônio de crescimento humano recombinante, baseado no uso de uréia 2M em condições alcalinas, sugerindo que o pH exerce um papel crucial na desestabilização da agregação dessas estruturas, que pode promover a solubilização sem perturbar a estrutura nativa secundária da proteína. Os autores ainda ressaltam que o uso de deoxicolato 2% auxiliou na remoção dos contaminantes atingindo mais 90% de pureza no rendimento final. Embora detergentes iônicos funcionam como ótimos agentes solubilizantes, eles tendem a desnaturar as proteínas por destruir sua estrutura tridimensional nativa. Dentre os detergentes iônicos, o deoxicolato é o menos desnaturantes, sendo comumente empregado em processos de purificação (Coligan, 1998).

A solubilização desses agregados de proteína, formados em sua maioria por interações hidrofóbicas não nativas entre os intermediários enovelados, com altas concentrações de agentes caotrópicos, por sua vez, geram estruturas espirais aleatórias onde seus aminoácidos hidrofóbicos são expostos, aumentando a propensão de agregação durante o renovelamento (Singh *et al.*, 2008). Vimos que a KIAA0090 apresenta pI de 4,2 e predominância de leucina em sua composição (12,3%), um aminoácido altamente hidrofóbico, sugerindo que estas características físico-químicas,

sejam responsáveis pelo fato da proteína se precipitar durante seu renovelamento. Através de uma abordagem por ressonância magnética nuclear para mapear os estados de uma protease viral de HIV ao longo das vias de enovelamento da proteína, Bhavesha *et al.* (2001) relataram que mesmo em altas concentrações desses agentes caotrópicos, interações intra e intermoleculares podem ocorrer, resultando em estruturas não nativas, levando à agregação ou mal enovelamento após a remoção dos desnaturantes, podendo explicar o comportamento da KIAA0090 quando superexpressa em bactéria.

5.2 Anticorpos gerados contra a KIAA0090 - revelações e limitações

Purificamos com sucesso dois anticorpos policlonais contra regiões distintas da KIAA0090 (N- e C-terminal), que reconheceram com especificidade a proteína recombinante, tanto a aquela expressa em células bacterianas quanto em células de mamíferos. Os anticorpos funcionaram como ferramentas valiosas para a detecção da proteína endógena em diversas linhagens de células e também em cortes histológicos provenientes de tecidos normais e tumorais, permitindo-nos definir a localização e distribuição subcelular da KIAA0090. No entanto, nos deparamos com algumas limitações para a detecção da proteína endógena em lisados de células através de *western blot*. É sabido que muitos anticorpos, inclusive disponíveis comercialmente, funcionam bem apenas para imunohistoquímica e não para *western blot* ou vice-versa, porém, a ausência de marcação em lisados celulares pode refletir uma rápida degradação da KIAA0090 ou algum tipo de modificação pós-traducional que torna os epitopos inacessíveis após dissolução em detergente iônico e tratamento com agente redutor.

A proteína TSC-22, que interage com a KIAA0090 segundo dados de análise em larga escala, mostrou um comportamento semelhante. Shibamura *et al.* (1992) mostraram que embora detectado altos níveis de expressão de seu mRNA nas linhagens analisadas, não conseguiram mostrar a presença da TSC-22 no lisado celular, sugerindo que a proteína possa ter uma alta taxa de renovação na célula, assim como observado

para a KIAA0090. Acreditamos então que a KIAA0090 pode realmente sofrer rápida degradação, principalmente por ser uma proteína alvo de ubiquitinação, segundo estudos em larga escala (Vasilescu *et al.*, 2005). Como visto no ensaio de western blot, os dois anticorpos revelaram várias bandas abaixo da altura de 130kDa (Fig. 24), na qual foi identificada pelo anti-K₂ uma banda que acreditamos ser o polipeptídeo maduro, sugerindo que o sinal mais intenso na altura de 60kDa seja o produto estável de degradação, podendo ser resultado da clivagem da proteína em sua porção central, sendo que a banda observada corresponderia às duas metades sobrepostas da proteína clivada.

Outro fato interessante observado foi a marcação distinta para os dois anticorpos produzidos contra a mesma proteína, uma vez que o anti-K₁ mostrou forte associação com mitocôndrias enquanto o anti-K₂ se mostrou associado ao complexo de Golgi. Sendo os anticorpos gerados contra regiões específicas da KIAA0090, podemos sugerir que o anti-K₂ não reconheça a proteína associada à mitocôndria por seu domínio de sinalização mitocondrial estar presente na região N-terminal da proteína, uma vez que este anticorpo foi gerado contra a porção C-terminal da KIAA0090, podendo ainda estar em uma conformação específica inserida no lúmen mitocondrial de modo que seus epítomos não fiquem expostos a serem reconhecidos por este anticorpo. Este fato, no entanto, pode ainda refletir um possível processamento da KIAA0090, no qual os subprodutos migram para diferentes compartimentos. Em estudos acerca da modulação da expressão da corina, uma proteína de superfície celular expressa em cardiomiócitos, Gladysheva *et al.* (2008) mostraram que a N-glicosilação pode influenciar na localização subcelular e atividade biológica desta proteína, somando-se ainda mais um indício para explicar o comportamento observado para a KIAA0090 frente ao uso dos dois anticorpos, uma vez que esta proteína também é N-glicosilada. Chen *et al.* (2009) identificaram a KIAA0090 em um conjunto de 523 glicoproteínas, através de espectrometria de massa combinada a um método de digestão enzimática múltipla, confirmando a presença de um sítio de glicosilação no resíduo 913. Em uma análise semelhante realizada em doenças

neurodegenerativas por Hwang *et al.* (2010) a KIAA0090 também foi identificada como um glicopeptídeo presente no fluido cérebro-espinhal das amostras analisadas, corroborando nossas predições das análises *in silico* acerca das modificações pós-traducionais da KIAA0090.

5.3 A KIAA0090 pode estar envolvida em ERAD e na homeostase celular

Confrontando os dados obtidos em nosso laboratório e outros resultados provenientes de estudos funcionais, por expressão da KIAA0090-EGFP em células de mamífero realizados previamente (Lopes, 2008), com as pesquisas que vêm sendo desenvolvidas em larga escala, sobretudo aquelas envolvendo a ortóloga da KIAA0090 em levedura, sugerimos que esta proteína possa realmente atuar no enovelamento de proteínas no retículo endoplasmático, porém, com um papel mais amplo nas células de mamíferos. Um dos primeiros indícios foi o não reconhecimento das proteínas de fusão pelo α -GST (Fig. 15), sugerindo que a KIAA0090 recombinante poderia estar em uma conformação específica de tal modo a mascarar a GST, impedindo a apresentação de seus epítomos a serem reconhecidos pelo anticorpo, embora não saibamos explicar como isso poderia ocorrer em condição desnaturante. O retículo endoplasmático é uma organela envolvida no enovelamento e maturação de proteínas de membrana e secretadas, sendo que estresses ou mutações podem comprometer este enovelamento contribuindo com doenças como diabetes, neurodegeneração e até mesmo o câncer. No entanto, como toda a gama de fatores e proteínas que contribuem e funcionam juntos para realizar este processo ainda não é compreendido (Merksamer; Papa, 2010).

Jonikas *et al.* (2009) realizaram um *screening* genético em *S. cerevisiae* de modo a identificar genes envolvidos no enovelamento de proteínas no retículo endoplasmático. A estratégia baseou-se no uso de uma biblioteca contendo cerca de 4.500 linhagens deletérias para genes específicos nas quais foi introduzido um gene repórter (GFP) cuja expressão era dirigida pelo promotor do gene Hac1, que por sua vez é ativado por Ire1,

um receptor presente na via de resposta a proteínas mal enoveladas (UPR), indicando desta forma se a deleção de determinado gene ou pares de genes conduzia a uma resposta de estresse mais agravante ou atenuante. Neste estudo foi identificada uma via envolvendo um complexo de seis proteínas de membrana (EMC), com fortes interações atenuantes entre si, mostrando que são fatores que cooperam mutuamente para realizar uma única função, revelando ainda que a perda do complexo leva à acumulação de proteínas de membrana mal enoveladas, desencadeando a resposta de degradação protéica associada ao retículo endoplasmático (ERAD), e que os genes desse complexo se complementam entre si de modo a atenuar o efeito causado pela deleção. Dentre essas proteínas, foi identificada a YCL045c (EMC1), a ortóloga em leveduras da proteína humana KIAA0090.

Os dados ainda mostram que a dupla deleção de YCL045c e GET2, diminuem a UPR, ao passo que o mutante duplo para YCL045c e SSH1, RPN4, PTK2, UBC7, HLJ1 ou CUE1, conduzem a uma resposta mais exacerbada, sugerindo que EMC1 esteja envolvida na ERAD, uma vez que UBC7 e CUE1, estão também envolvidos na eliminação de proteínas de membrana mal enoveladas. GET2 por sua vez está presente em um complexo responsável por mediar a inserção de proteínas na membrana do retículo endoplasmático (Schuldiner *et al.*, 2008). O homólogo de GET1 em humanos (GHRL3), foi caracterizado por Guardiola-Serrano *et al.* (2008) como um fator de transcrição, que em resposta a TNF- α estimula a migração de células endoteliais.

Costanzo *et al.* (2010) realizaram um elegante estudo construindo um mapa em escala genômica a partir da análise de interação genética sintética de 5,4 milhões de pares de genes em *S. cerevisiae*. Correlacionamos então os dados encontrados de interação para EMC1 juntamente com outros resultados já depositados na base de dados pública para *S. cerevisiae* (<http://www.yeastgenome.org/>), buscando seus homólogos em humano (anexo C) e confrontando com os resultados obtidos em nosso laboratório, na tentativa de melhor compreender as relações funcionais envolvendo a KIAA0090. Foi demonstrado que EMC1 interage, dentre muitas proteínas, com RPN4, UBI4 e UBC7.

RPN4 representa o homólogo em leveduras para a proteína humana PSMD13, que por sua vez atua como um fator transcricional envolvido na ativação das subunidades do proteassomo, sendo ativado por UPR (Metzger; Michaelis, 2009). UBI4 corresponde à proteína humana ubiquitina C, necessária para a sinalização de proteínas a serem degradadas pela via proteasomal. Vasilescu *et al.* (2005) já haviam demonstrado em um estudo de larga escala que a KIAA0090 é uma proteína ubiquitinada. Em conjunto esses dados nos levam a propor que a KIAA0090 esteja realmente envolvida na via ERAD, porém, os mecanismos moleculares envolvidos neste processo ainda são desconhecidos e devem ser melhor caracterizados.

Em vista do padrão de marcação variável frente ao uso dos dois anticorpos produzidos (Golgi/mitocôndria) e uma vez identificada a interação entre EMC1 e GET1 e GET2, sugerimos que a KIAA0090 esteja sendo traduzida, sofrendo maturações no complexo de Golgi e em seguida é transportada com o auxílio de proteínas semelhantes ao complexo GET para a mitocôndria, sendo este um de seus destinos finais, justificando assim os dois padrões de marcação observados. Esta via de tráfego intracelular já foi demonstrada por García-Ruiz *et al.* (2002) em hepatócitos de rato. O gangliosídeo GD3, uma molécula residente na membrana plasmática bem como na rede endossomo/Golgi, tem a capacidade de migrar para a mitocôndria em resposta ao estímulo de TNF- α . Em estudos de imunolocalização, Fukuda *et al.* (2007) observaram que a reticulocalbina, uma proteína do retículo endoplasmático ligante de cálcio, possui distribuição e expressão variável na via secretória bem como em condições patológicas em resposta à processos inflamatórios, com um padrão de expressão heterogêneo nas células de cada órgão em que foi expressa, sendo predominante em células epiteliais de órgãos endócrinos e exócrinos. Frente a esta heterogeneidade, os autores sugerem que a expressão variável da reticulocalbina pode estar relacionada às funções específicas de cada célula, podendo ser utilizada como uma ferramenta útil para o estabelecimento da origem celular e no diagnóstico diferencial para alguns tipos de tumores, embora demonstrada uma extensa distribuição em órgãos normais, como o observado para a KIAA0090.

A interação demonstrada para EMC1 com APM3, reforça a associação da KIAA0090 com o Golgi, uma vez que o homólogo de APM3 em humanos (AP3M) codifica a subunidade média de um complexo adaptador também associado ao Golgi, que facilita o brotamento de vesículas estando ainda envolvido no endereçamento de proteínas de membrana e para o sistema endossomo/lisossomo (Hashimoto *et al.*, 2009), corroborando ainda mais com o endereçamento da KIAA0090 do Golgi para outros compartimentos intracelulares. Outra proteína humana também presente no Golgi, CGI-119, foi caracterizada por Gubser *et al.* (2007), já citado anteriormente, como uma molécula anti-apoptótica, e segundo os dados disponíveis em bases públicas, possui alta similaridade com o inibidor de Bax-1 e interage com a KIAA0090. Desta forma, sugerimos que a KIAA0090 interage com CGI-119 de modo a garantir a sobrevivência celular, provavelmente garantindo seu correto enovelamento promovendo a geração de mais moléculas anti-apoptóticas. À luz destas informações em conjunto com os dados obtidos em nosso laboratório, sugerimos um papel semelhante para a KIAA0090 em células de mamíferos, uma vez que esta proteína mostrou-se fortemente associada ao complexo de Golgi, sofrer N-glicosilação, estar presente em diversas estruturas associadas à via secretória sendo sua expressão ainda inibida por brefeldina A. Desta forma, propomos um esquema ilustrando as possíveis relações funcionais desempenhadas pela KIAA0090 (Fig. 43).

No entanto, a expressão reduzida do gene em resposta ao tratamento por brefeldina A confronta com a possibilidade de que a proteína humana possa também atuar como uma chaperona, uma vez que o efeito esperado para proteínas de resposta a estresse seria um aumento na sua expressão. Liu *et al.* (1992), mostraram que células de hepatoma humano, tiveram um aumento de doze vezes nos níveis do transcrito de Grp78, uma proteína regulada por glicose residente no retículo endoplasmático, que são superexpressas quando as células respondem a condições fisiológicas adversas.

Por outro lado, essa expressão reduzida pode sugerir que a KIAA0090 atue como um receptor de membrana, ou ainda atua no correto enovelamento desses receptores, desde que Schonhom e Wessling-Resnick (1994), mostraram efeitos semelhantes para o receptor de transferrina em células K562 após tratamento com brefeldina. *In suma*, esses dados sugerem um papel mais complexo para a proteína humana do que o proposto para sua ortóloga em levedura, uma vez que a KIAA0090 está também associada à mitocôndria. Essa associação está de acordo com os dados de estudos de larga escala gerados por Fukada *et al.* (2004), que identificaram esta proteína em uma fração mitocondrial de células de neuroblastoma murino.

Mostrou-se também que a ECM1 interage com algumas proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular, como CLN1 e CLN2 (ciclins de G1/S), RRI1, uma peptidase ativadora de SCF, e PKC, cujo homólogo humano corresponde à proteína MAPK7 (ERK5), sugerindo que além de estar envolvida na ERAD/UPR, a KIAA0090 pode também ter um papel na proliferação celular. É interessante o fato de que MAPK7 é ativada por uma gama de estresses celulares bem como fatores de crescimento e citocinas, sendo ainda uma molécula crítica para o desenvolvimento cardiovascular e essencial para a função da célula endotelial, regulando ainda a angiogênese tumoral (Roberts *et al.*, 2009), mostrando, portanto, uma íntima relação com a KIAA0090, uma vez mostrado que esta proteína também responde ao estresse celular e está associada a vasos, principalmente no tecido tumoral nas regiões onde está ocorrendo a invasão do tumor (Fig.35). O envolvimento da KIAA0090 no ciclo celular é ainda corroborado pela interação já citada anteriormente com TSC-22 (Ewing *et al.*, 2007), uma vez que este fator transcricional com atividade repressora atua sobre o crescimento, diferenciação e morte celular, regulando a atividade de Gadd45b, um gene induzido na parada do crescimento celular e por danos no DNA (Iida *et al.*, 2007). Acreditamos então que TSC-22 interage com a KIAA0090 de modo a regular sua possível atividade estimuladora do ciclo celular. Procurando então compreender a função da KIAA0090 entre o ciclo celular e a degradação de proteínas, sugerimos que esta proteína atue de alguma forma ativando

o ciclo celular e controlando a homeostase através da participação na ERAD, uma vez que na sua ausência é desencadeada a UPR. A ERAD, por sua vez comprometida na ausência da KIAA0090, estimula a UPR, e uma vez que a célula está deficiente da maquinaria ERAD, a célula se torna sobrecarregada sendo conduzida de alguma forma à morte.

5.4 A KIAA0090 e o câncer: perspectivas futuras

Nossa maior perspectiva, no entanto, concentra-se no estudo da associação da KIAA0090 com as distintas fases da progressão tumoral, na busca por diagnósticos mais precisos e terapias direcionadas no combate ao câncer, estabelecendo potenciais marcadores prognósticos. Nossos dados mostram que em tecidos tumorais há um aumento significativo de expressão da KIAA0090, sugerindo que de algum modo ela esteja envolvida na sobrevivência do tumor ou ainda está implicada na transição ao longo das fases do desenvolvimento tumoral.

Uma vez que a marcação observada para a KIAA0090 (anti-K1) parece ser mais associada a células inflamatórias ou mesenquimais ou a apenas uma subpopulação diferenciada das células tumorais do que a vasta maioria das células do carcinoma, qualquer interpretação funcional dos resultados obtidos com TMA é ainda bastante prematura neste estágio do estudo. Ainda assim, procuramos discutir algumas possibilidades à luz de algumas correlações positivas ou negativas que se mostraram estatisticamente significantes.

Os dados obtidos da análise de TMA mostraram uma tendência de perda da KIAA0090 segundo o grau de desenvolvimento histológico do tumor (Tab. 4), sugerindo uma correlação desta proteína com a progressão do carcinoma mamário. Corroborando nossos resultados, alguns trabalhos têm correlacionado a expressão da KIAA0090 com o câncer de mama. Um estudo muito interessante, sobre expressão gênica diferencial neste tipo de tumor, detectou a expressão aumentada de *KIAA0090* em tumores

mamários com perda de BRCA1 em relação a tumores mamários esporádicos, sendo seu perfil altamente correlacionado com a expressão do gene *CTPS*, que desempenha também um papel chave no desenvolvimento e crescimento celular e na tumorigênese (Dettling *et al.*, 2005), reforçando ainda mais o provável envolvimento da KIAA0090 com o câncer. Em nossa análise por TMA vimos também que os casos de câncer de mama positivos para o receptor de estrógeno possuem uma maior tendência em expressar KIAA0090 (96% dos casos) comparado aos negativos para este receptor, entre os quais 79% apenas expressam KIAA0090. Hall *et al.* (2001) mostraram que o estrógeno desenvolve um papel central no desenvolvimento do câncer de mama por ser um regulador chave do crescimento, diferenciação e função em vários tecidos, que atua alterando a transcrição de genes via interação direta com seu promotor ou por meio da ligação a outras proteínas que por sua vez interagem com o promotor. Através da análise da expressão gênica por *microarray* utilizando células tumorais de mama, Creighton *et al.* (2006) identificaram o *KIAA0090* em um cluster de genes regulados por estrógeno, mostrando ainda que são similarmente regulados *in vivo* em tecidos de tumores humanos de mama implantados em ratos. É interessante ainda notar que entre os casos Her2 positivos, observamos uma maior quantidade de casos negativos para KIAA0090, ou seja, esses dois marcadores apresentaram uma correlação inversa. Têm se mostrado que casos de câncer de mama positivos para o receptor do fator de crescimento epidermal 2 (Her2) tendem a ser mais agressivos, uma vez que essa molécula desenvolve um papel importante na progressão tumoral estando ainda relacionada à resistência contra inúmeras formas de terapias e com altos níveis de predisposição à metástase e reincidência do tumor (Barros *et al.*, 2010), sugerindo que a perda da KIAA0090 desempenhe algum papel no avanço da progressão tumoral, podendo atuar como um possível supressor tumoral. Outra possibilidade é que a subpopulação das células positivas do tumor primário é reduzida (talvez por deixar de migrar para este local) após a disseminação do tumor, portanto a perda correlaciona com tumores mais agressivos como é o caso dos HER2 positivos. As relações entre a KIAA0090 e TSC-22

são ainda de particular interesse do ponto vista da célula tumoral, uma vez que este fator de transcrição ativado por TGF- β é reduzido ou não detectado em mais de 60% dos casos de câncer de mama, podendo atuar como um potencial supressor tumoral (Choi *et al.*, 2005), sugerindo que ele possa estar co-interagindo com a KIAA0090 desempenhando algum papel no ciclo celular. Os autores ainda ressaltam que quando superexpresso, TSC-22 induz resposta Smad e apoptose em células epiteliais de mama em cultura.

Arf6, uma proteína envolvida no tráfego e remodelamento de membrana, bem como na remodelagem do citoesqueleto (Sabe, 2004), foi outra molécula bastante interessante que apresentou interação com a KIAA0090 em estudos de larga escala. Hashimoto *et al.* (2004) mostraram que Arf6, embora expressa ubiquamente em tecidos adultos humanos, é uma molécula necessária para a atividade invasiva no câncer de mama, sendo que sua supressão por siRNA ou mutantes defeituosos na atividade de hidrólise e/ou ligante a GTP, bloqueia efetivamente a atividade invasiva da célula, tais como a formação de invadopódias e degradação da matriz extracelular, mas não sua capacidade de adesão, mostrando ainda que linhagens com alta capacidade invasiva expressam altos níveis de Arf6 comparada àquelas com menor potencial invasor.

Por fim, vale também considerar a interação da KIAA0090 com micro-RNAs. Em uma interessante análise global por meio de *microarray* Chang *et al.* (2007) mostraram que o gene KIAA0090 é regulado negativamente por mir-34, um micro-RNA que atua como supressor tumoral, sendo este regulado diretamente por p53 (He *et al.*, 2007). Mir-34 apresenta baixa expressão em cânceres de ovário, o que pode estar associado à mutação de p53, ou a mutações na própria mir-34, em casos em que p53 está preservada (Corney *et al.*, 2010). Isso explica a superexpressão de KIAA0090 em cânceres, já que ele é negativamente regulado por um supressor de tumor acoplado pela via p53.

Desta forma, esses dados convergem apontando para uma íntima e complexa rede de interações entre a KIAA0090 e essas proteínas, atuando tanto na regulação do ciclo celular, inibindo ou estimulando a proliferação da célula e ainda na regulação do citoesqueleto, em mecanismos relacionados à invasão e metástase, reforçando cada vez mais a idéia de que a KIAA0090 realmente esteja envolvida na progressão tumoral, de modo particular no câncer de mama. Um passo importante para compreensão do seu papel neste câncer será definir quais são as principais subpopulações de células que expressam a KIAA0090 no tumor primário. Esta análise poderá ser complementada também por estudos em amostras de metástases. Finalmente, a geração de camundongos transgênicos condicionais, em que se pudessem anular a expressão do gene em tecidos específicos, tais como epitélio mamário, células inflamatórias, tecido vascular, seria o modelo ideal para estudo do papel do gene KIAA0090 nos processos de tumorigênese e progressão tumoral.

VI. CONCLUSÕES

1) A KIAA0090 é uma proteína altamente insolúvel distribuída pelo Golgi, mitocôndria e retículo endoplasmático, com íntimas relações entre essas organelas.

2) A KIAA0090 está envolvida na via secretória, visto sua forte associação ao complexo de Golgi, predições baseadas em seqüenciamento e estudos de larga escala das modificações pós-traducionais como a N-glicosilação e inibição por brefeldina A.

3) A KIAA0090 desempenha um importante papel na homeostase celular, uma vez que sua distribuição na célula é alterada após o estresse e sua perda estimula a UPR.

4) A KIAA0090 pode desempenhar um importante papel na progressão tumoral do câncer, e em particular no carcinoma mamário, visto sua expressão aumentada neste tipo de tumor, com destaque ainda para a diminuição na quantidade de proteína em casos mais avançados, podendo ainda estar envolvida em processos de invasão tumoral, visto aumento de intensidade ao redor de vasos em tumores primários de melanoma.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, W. S.; BAE, S. M.; LEE, K. H.; KIM, Y. W.; LEE, J. M.; NAMKOONG, S. E.; LEE, I. P.; KIM, C. H.; SEO, J.; SIN, J.; KIM, Y. Comparison of effects of As₂O₃ and As₄O₆ on cell growth inhibition and gene expression profiles by cDNA microarray analysis in SiHa cells. **Oncology reports**, v. 12: 573-580. 2004.

BENDSTEN, J. D.; NIELSEN, H.; HEIJNE, G.; BRUNAK, S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.*, 340:783-795, 2004.

BHAVESHA, N. S.; PANCHALA, S. C.; MITTALB, R.; HOSUR, R. V. NMR identification of local structural preferences in HIV-1 protease tethered heterodimer in 6 M guanidine hydrochloride. **FEBS Letters**, v. 509, 218-224. 2001.

BRADFORD, MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72: 248-54. 1976.

CHANG, T.; WENTZEL, E. A.; KENT, O. A.; RAMACHANDRAN, K.; MULLENDORE, M.; LEE, K. H.; FELDMAN, G.; YAMAKUCHI, M.; FERLITO, M.; LOWENSTEIN, C. J.; ARKING, D. E.; BEER, M. A.; MAITRA, A.; MENDELL, J. T. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. **Mol. Cell.**, v. 26(5):745-752. 2007.

CHEN, R.; JIANG, X.; SUN, D.; HAN, G.; WANG, F.; YE, M.; WANG, L.; ZOU, H. Glycoproteomics Analysis of Human Liver Tissue by Combination of Multiple Enzyme Digestion and Hydrazide Chemistry. **Journal of Proteome Research**, v.8 (2), 651-661. 2009.

CHOI, S.; MOON, J.; AHN, Y.; AHN, J.; KIM, D.; HAN, T. Tsc-22 enhances TGF- β signaling by associating with Smad-4 and induces erythroid cell differentiation. **Molecular and Cellular Biochemistry**, n. 271:23-28, 2005.

CHUDNOVSKY, Y.; KHAVARI, P. A.; ADAMS, A. E. Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. **The Journal of Clinical Investigation**. V. 115, N. 4, 2005.

COGSWELL, J. P. PLK3 protein-protein interactions. **United States patent application publication**, n. 24, abril, 2003.

COLIGAN, J. E., 1998. Commonly used detergents (Appendix 11). *In*: Jonh Willey and Sons, Inc (Eds.), Current protocols in Molecular Biology, 2007.

CORNEY D. C.; HWANG C. I.; MATOSO A.; VOGT M.; FLESKEN-NIKITIN A.; GODWIN A. K.; KAMAT A. A.; ELLENSON L. H.; HERMEKING H.; NIKITIN A. Y. Frequent downregulation of miR-34 family in human ovarian cancers. **Clin Cancer Res.** Dec 1;67(23):11099-101. 2010.

COSTANZO, M.; BARYSHNIKOVA, A.; BELLAY, J.; KIM, Y.; SPEAR, E. D.; SEVIER, C. S.; DING, H.; KOH, J. L. Y.; TOUFIGHI, K.; MOSTAFAVI, S.; PRINZ, J.; ONGE, R. P. S.; VANDERSLUIS, B.; MAKHNEVYCH, T.; VIZEACOMAR, F. J.; ALIZADEH, S.; BAHR, S.; BROST, R. L.; CHEN, Y.; COKOL, M.; DESHPANDE, R.; LI, Z.; LIN, Z.; LIANG, W.; MARBACK, M.; PAW, J.; LUIS, B. S.; SHUTERIQL, E.; TONG, A. H. Y.; DYK, N. V.; WALLACE, I. M.; WHITNEY, J. A.; WEIRAUCH, M. T.; ZHONG, G.; ZHU, H.; HOURY, W.

A.; BRUDNO, M.; RAGIBIZADEH, S.; PAPP, B.; PÁL, C.; ROTH, F. P.; GIAEVER, G.; NISLOW, C.; TROYANSKAYA, O. G.; BUSSEY, H.; BADER, G. D.; GINGRAS, A.; MORRIS, Q. D.; KIM, P. M.; KAISER, C. A.; MYERS, C. L.; ANDREWS, B. J.; BOONE, C. The genetic landscape of a cell. **Science**, v. 327, 2010.

CREIGHTON, C. J.; CORDERO, K.; LARIOS, J.M.; MILLER, R. S.; JOHNSON, M. D.; CHINNAIYAN, A. M.; LIPPMAN, M. E.; RAE, J. M. Genes regulated by estrogen in breast tumor cells in vitro are similarly regulated in vivo in tumor xenografts and human breast tumors. **Genome Biology**, volume 7, Issue 4. 2006.

CUI, J.; SOFER, L.; CLOUD, S. S.; BURNSIDE, J. Patterns of gene expression in the developing chick thymus. **Developmental dynamics**. v. 229:480-488, 2004.

DAVIES, H.; BIGNELL, G.R.; COX, C. Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature** 417: 949-954, 2002.

DETTLING, M.; GABRIELSON, E.; PARMIGIANI, G. Searching for differentially expressed gene combinations. Johns Hopkins University, Dept. of Biostatistics. **Working Papers**, n. 77. 2005.

EWING, R. M.; CHU, P.; ELISMA, F.; LI, H.; TAYLOR, P.; CLIMIE, S.; MCBROOM-CERAJEWSKI, L.; ROBINSON, M. D.; O'CONNOR, L.; LI, M.; TAYLOR, R.; DHARSEE, M.; HO, Y.; HEILBUT, A.; MOORE, L.; ZHANG, S.; OLGA, O.; BUKHMAN, Y. V.; ETHIER, M.; SHENG, Y.; VASILESCU, J.; ABU-FARHA, M.; LAMBERT, J.; DUEWEL, H. S.; STEWAR, I. I.; KUEHL, B.; HOGUE, K.; COLWILL, K.; GLADWISH, K.; MUSKAT, B.; KINACH, R.; ADAMS, S.; MORAN, M. F.; MORIN, G. B.; TOPALOGLOU, T.; FIGEYS, D. Large-scale mapping of human protein–protein interactions by mass spectrometry. **Molecular Systems Biology**. V. 3, n. 89. 2007.

FU, C. A.; SHEN, M.; HUANG, B. C. B.; LASAGA, J.; PAYAN, D. G.; LUO, Y.. TNIK, a novel member of the germinal center kinase family that activates the c-jun n-terminal kinase pathway and regulates the cytoskeleton. **The journal of biological chemistry**. V. 274, n. 43:30729-30737. 1999.

FUKADA, K.;ZHANG, F.; VIEN, A.; CASHMAN, N. R.; ZHU, H. Mitochondrial proteomic analysis of a cell line model of familial amyotrophic lateral sclerosis. **Molecular and cellular proteomics**. V. 3.12, pp1211-1223. 2004.

FUKUDA, T.; OYAMADA, H.; ISSHIKI, T.; MAEDA, M.; KUSAKABE, T.; HOZUMI, A. YAMAGUCHI, T.; IGARASHI, T.; HASEGAWA, H.; SEIDOH, T.; SUZUKI, T. Distribution and variable expression of secretory pathway protein reticulocalbin in normal human organs and non-neoplastic pathological conditions. **Journal of histochemistry and cytochemistry**, v. 55(4): 335–345. 2007.

GARCÍA-RUIZ, C.; COLLEL, A.; MORALES, A.; CALVO, M.; ENRICH, C.; FERNÁNDEZ-CHECA, J. C. Trafficking of ganglioside GD3 to mitochondria by Tumor Necrosis Factor- α . **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 39, 36443-36448, 2002.

GEBHARD, C., L. SCHWARZFISCHER, T.H. PHAM, E. SCHILLING, M. KLUG, R. ANDREESSEN, AND M. REHLI. Genome-wide profiling of CpG methylation identifies novel targets of aberrant hypermethylation in myeloid leukemia. **Cancer Res**. 66:6118-28. 2006.

GLADYSHEVA, I. P.; KING, S. M.; HOUNG, A. K. N-glycosylation modulates the cell-surface expression and catalytic activity of corin. **Biochemical and biophysical research communications**. *In press*, 2008.

GOWRISHANKAR, G.; WINZEN, R.; DITTRICH-BREIHZOLZ, O.; REDICH, N.; KRACHT, M.; HOLTSMANN, H. Inhibition of mRNA deadenylation and degradation by different types of cell stress. **Biological Chemistry**, vol. 387, pp. 323–327. 2006.

GUARDIOLA-SERRANO, F.; HAENDELER, J.; LUKOSZ, M.; STURM, K.; MELCHNER, H.; ALTSCHMIED, J. Gene trapping identifies a putative tumor suppressor and a new inducer of cell migration. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 376, 748-752, 2008.

GUBSER, C.; BERGAMASCHI, D.; HOLLINSHEAD, M.; LU, X.; KUPPEVELD, F. J. M.; SMITH, G. L. A new inhibitor of apoptosis from vaccinia virus and eukaryotes. **PLoS Pathogen**, v. 3, n.2:246-259. 2007.

GUPTA, R. A.; SARRAF, P.; BROCKMAN, J. A.; SHAPPELL, S. B.; RAFTERY, L. A.; WILLSON, T. M.; DUBOIS, R. N. peroxisome proliferator-activated receptor and transforming growth factor- β pathways inhibit intestinal epithelial cell growth by regulating levels of TSC-22. **The journal of biological chemistry**. V. 278, n. 9: 7431-7438. 2003.

HALL J. M., COUSE J. F., KORACH K. S.: The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. **Journal of biological chemistry**, 276:36869-36872. 2001.

HASHIMOTO, S.; ONODERA, Y.; HASHIMOTO, A.; TANAKA, M.; HAMAGUCHI, M.; YAMADA, A.; SABE, H. Requirement for Arf6 in breast cancer invasive activities. **PNAS**, v. 101, n. 17: 6647-6652, 2004.

HASHIMOTO, R.; OHI, K.; OKADA, T.; YASUDA, Y.; YAMAMORI, H.; HORI, H.; HIKITA, T.; TAYA, S.; SAITOH, O.; KOSUGA, A.; TATSUMI, M.; KAMIJIMA, K.; KAIBUCHI, K.; TAKEDA, M.; KUNUGI, H. Association analysis between schizophrenia and the AP-3 complex genes. **Neuroscience Research**, v. 65: 113-115, 2009.

HE X.; HE L.; HANNON G. J. The guardian's little helper: microRNAs in the p53 tumor suppressor network. **Cancer Res.** Dec 1;67(23):11099-101. 2007.

HENNIG, L. WinGene/WinPep: User-friendly software for the analysis of amino acid sequences. **BioTechniques** 26, 1170-1172. 2002.

HIROKAWA T., BOON-CHIENG S., AND MITAKU S. SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. **Bioinformatics**, 14 378-9, 1998.

HUH, W. K.; FAVO, J. V.; GERKE, L. C.; CARROLL, A. S.; HOWSON, R. W.; WEISSMAN, J. S.; O'SHEA, E. K. Global analysis of protein localization in budding yeast. **Nature**. 425(6959):686-91. 2003.

HWANG, H.; ZHANG, J.; CHUNG, K. A.; LEVERENZ, J. B.; ZABETIAN, C. P.; PESKIND, E. R.; JANKOVIC, J.; SU, Z.; HANCOCK, A. M.; PAN, C.; MONTINE, T. J.; PAN, S.; NUTT, J.; ALBIN, R.; GEARING, M.; BEYER, R. P.; SHI, M.; ZHANG, J. Glycoproteomics in neurodegenerative diseases. **Mass Spectrometry review**, v. 29(1): 79-125, 2010.

IIDA, M.; ANNA, C. H.; GASKIN, N. D.; WALKER, N. J.; DEVEREUX, T. R. The putative tumor suppressor Tsc-22 is downregulated early in chemically induced hepatocarcinogenesis and may be a suppressor of Gadd45b. **Toxicological Sciences**, v. 99(1), 43-50, 2007.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativas de incidência e mortalidade. <http://www.inca.gov.br>. Página acessada em maio de 2009.

JONIKAS, M. C.; COLLINS, S. R.; DENIC, V.; OH, E.; QUAN, E. M.; SCHMID, V.; WEIBEZAHN, J.; SCHWAPPACH, B.; WALTER, P.; WEISSMAN, J. S.; SCHULDINER, M. Comprehensive characterization of genes required for protein folding in the endoplasmic reticulum. **Science**, v. 323. 2009.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. Histologia básica. Editora Guanabara Koogan, 540pg. 2004.

KANAVOS, P. The rising burden of cancer in the developing world. **Annals of Oncology**, v. 17(supplement 8): viii15-viii23, 2006.

KYTE, J.; DOOLITTLE, R. F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. **Journal of Molecular Biology**, v. 157 (1), p. 105-32, 1982.

LAEMMLI, UK and FRAVE, M. Maturation of the head of bacteriophage T4. **Journal of molecular biology**. 80: 575-99. 1973.

LEE, J. H.; KAMINSKI, N.; DOLGANOV, G.; GRUNIG, G.; KOTH, L. SOLOMON, C.; ERLE, D. J.; SHEPPARD, D. Interleukin-13 induces dramatically different transcriptional programs in three human airway cell types. **American journal of respiratory cellular molecular biology**. V. 25, pp. 474–485. 2001.

LIAO WT, SONG LB, ZHANG HZ, ZHANG X, ZHANG L, LIU WL, FENG Y, GUO BH, MAI HQ, CAO SM, LI MZ, QIN HD, ZENG YX, ZENG MS. Centromere protein H is a novel prognostic marker for nasopharyngeal carcinoma progression and overall patient survival. **Clin Cancer Res**. Jan 15;13(2 Pt 1):508-14. 2007.

LIU, E. S.; OU, J.; LEE, A. S. Brefeldin A as regulator of grp78 gene expression in mammalian cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n.10, PP 7128-7133. 1992.

LOPES, M. M. Caracterização da proteína predita KIAA0090 sugere sua associação com mitocôndria e retículo endoplasmático e seu envolvimento em apoptose. Dissertação (Mestrado) - Faculdade Medicina de Ribeirão Preto (USP), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. 2008.

MERKSAMER, P. I.; PAPA, F. R. The UPR and cell fate at a glance. **Journal of Cell Science**, 123 (7), 2010.

METZGER, M. B.; MICHAELIS, S. Analysis of quality control substrates in distinct cellular compartments reveals a unique role for Rpn4p in tolerating misfolded membrane proteins. **Molecular Biology of the Cell**, v. 20, 1006-1019, 2009.

MILLER, A. J.; MIHM, M. C. Melanoma. **The new england journal of medicine**. N. 1, v. 355:51-65. 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **What is câncer?** <http://www.who.int>. Página acessada em maio de 2009.

PARKIN, D. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. **Int J Cancer**, v. 118; 3030–3044. 2006.

PATRA, A. K.; MUKHOPADHYAY, R.; MUKHIJA, R.; KRISHNAN, A.; GARG, L. C.; PANDA, A. K. Optimization of inclusion body solubilization and renaturation of recombinant human growth hormone from *Escherichia coli*. **Protein expression and purification**, v. 18, 182-192. 2000.

RASTOGI T, HILDESHEIM A, SINHA R. Opportunities for cancer epidemiology in developing countries. **Nat Rev Cancer**, v. 4: 909–917. 2004.

ROHMAN, M.; HARRISON-LAVOIE, K. J. Separation of copurifying GroEL from Glutathione-S-transferase fusion proteins. **Protein expression and purification**, v.20, 45-47, 2000.

RUSSO, A. E.; TORRISI, E.; BEVELACQUA, Y.; PERROTA, R.; LIBRA, M.; McCUBREY, J. A.; SPANDIDOS, D. A.; STIVALA, F.; MALAPONTE, G. Melanoma: molecular pathogenesis and emerging target therapies (review). **International Journal of Oncology**, v. 34: 1481-1489, 2009.

SABE, H. Requirement for Arf6 in cell adhesion, migration, and cancer cell invasion. **Journal of Biochemistry**, n. 134: 485-489, 2003.

SCHONHORN, J. E.; WESSLING-RESNICK, M. Brefeldin A down-regulates the transferrin receptor in K562 Cells. **Mol. Cell. Biochem**, v. 135, 159-169. 1994.

SCHULDINER, M.; METZ, J.; SCHMID, V.; DENIC, V.; RAKWALSKA, M.; SCHMITT, H. D; SCHWAPPACH, B.; WEISSMAN, J. S. The GET complex mediates insertion of tail-anchored proteins into the ER membrane. **Cell**, 134, 634-645, 2008.

SHIBANUMA, M.; KUROKI, T.; NOSE, K. Isolation of a gene encoding a putative leucine zipper structure that is induced by transforming growth factor β 1 and other growth factors. **The Journal of biological chemistry**, v. 267, n.15, 10219-10224. 1992.

SINGH, S. M.; UPADHYAY, A. K.; PANDA, A. K. Solubilization at high pH results in improved recovery of proteins from inclusion bodies of *E. coli*. **Journal of chemical technology and biotechnology**, v. 83:1126-1134. 2008.

SMITH, D. B.; JOHNSON, K. S. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. **Gene**, 67 (1), p.31-40, 1988.

SOUSA, J. F.; ESPREAFICO, E. M. Melanoma survival strategies: the intrinsic apoptotic pathway-upstream and downstream regulators. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, v. 23, p. 43-56. 2006.

STAHL, J.M.; SHARMA, A.; CHEUNG, M.; ZIMMERMAN, M.; CHENG, J. Q.; BOSENBERG, M. W.; KESTER, M.; SANDIRASEGARANE, L.; ROBERTSON, G. P. Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. **Cancer Res**, v. 64: 7002-7010, 2004.

SZEWCZYK, B.; SUMMERS, D. F. Preparative elution of proteins blotted to Immobilon membranes. **Analytical Biochemistry**, V. 168, Issue 1, Pages 48-53. 1988.

TOWBIN, H; STAEBELIN, T and GORDON, J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *Procedure and some applications*. **PNAS** 76: 4350-4.

VALENCIA JV, MONE M, ZHANG J, WEETALL M, BUXTON FP, HUGHES TE. Divergent pathways of gene expression are activated by the RAGE ligands S100b and AGE-BSA. **Diabetes**. Mar;53(3):743-51. 2004.

VASILESCU, J.; SMITH, J. C.; ETHIER, M.; FIGEYS, D. Proteomic Analysis of ubiquitinated proteins from human MCF-7 breast cancer cells by immunoaffinity purification and mass spectrometry. **Journal of proteome research**. V. 4, p2192-2200. 2005.

VENTURA, S.; VILLAVERDE, A. Protein quality in bacterial inclusion bodies. **Trends in biotechnology**, v. 24, n. 4. 2006.

WACHI, S.; YONEDA, K.; WU, R. Interactome-transcriptome analysis reveals the high centrality of genes differentially expressed in lung cancer tissues. **Bioinformatics**. 21:4205-8. 2005.

WU, H.; GOEL, V.; HALUSKA, F. G. PTEN signaling pathways in melanoma. **Oncogene**, v. 22:3113–3122. 2003.

ZAID, M. R.; DAY, C.; MERLINO, G. From UVs to metastases: modeling melanoma initiation and progression in the mouse. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 128. 2008.

ANEXO A: Alinhamento da proteína KIAA0090 humana com seqüências de aminoácidos ortólogas utilizando o software ClustaW.

	signal peptide	PQQ
<i>H.sapiens</i>	--MAAEWASRFWAT--LLIPAAAYVEDQVGKFDWRQQYVGKVFASLEFS--PGSKLLVATEKN--VIAALNSRTGEILWRHVDKGTAEAGVADMLHGGDVI--TVSNGGRIMRSWETN	113
<i>M.musculus</i>	--MAVASAGFWIWAAILVPAAYVEDQVGKFDWRQQYVGKVFASLEFS--PGSKLLVATEKN--VIAALNSRTGEILWRHVDKGTAEAGVADMLHGGDVI--TVSNGGRIMRSWETN	114
<i>G.gallus</i>	--MAAG-----LWAL--LLPLAAAYVEDQVGKFDWRQQYVGKVFASLEAA--QGSKKLLVATEKN--VVAALNSRSGEILWRHADKATPEGAIDAMLHGGDAI--TVSSAGRIILRSWETN	107
<i>X.laieis</i>	--MAADLCWLSLLAS--LALSGAYVEDQVGKFDWRQQYVGKVFASLESG--LGAKKLLVATEKN--IIAALNSRTGOLLWRHVDKGTAEAGVADMLHGGDVI--TVS--GGRIILRSWETN	111
<i>D.melanogaster</i>	-----MQEKWLLPALSLALLGTCS--LYEDQIKKFDWRGVNVGALQKSRVDLN--HFQPRILVITYEG--VVS--CVKLTGLVGVYLEQKPRDVKLLQVSGFADD--SSDTAAAPMG--SN	110
<i>C.elegans</i>	-----MRLLLLVITIAIFASVT--IFEDQAKKFDWRKQVCPAKITFDKVGSKDRILVSTAO--VLSSVLNTGNIGWQIMENPSGTNGLTFKDRVY--YSIEDGSRVNVNKN	111
<i>S.cerevisiae</i>	MKLTCTDLVYVIFLLFNTSCQVFS--DAFITDQLANLPWEKVIIPDSRDRNRLILSNPTETSCLVSSFNVSQ--LFFNLLP-----	86
<i>S.pombe</i>	--LRLPLWFLTALFLNIYRAAS--LIEAG--NFEISLLKVNPLVYDTK--NEY--YAVSQG--LLK--KASNDVI--KQSIAPETS-----QLNPNYPTNFIIIVDQKDYLI--NSK	108
<i>H.sapiens</i>	IGGLNWEIT--DSSEFQALGLVGLQESVRYIAVLKKTTLAHLHSSGHLKWEHLPESSDIHYQMVSYSYGSGVVMALGVVPSHVNIKFNVEDGE--IVQVVRVSTPWLQHLSSAGGV	229
<i>M.musculus</i>	IGGLNWEIT--DTGSFQALGLVGLQESVRYIAVLKKTTLAHLHSSGHLKWEHLPESSDIHYQMVSYSYGSGVVMALGVVPSHVNIKFNVEDGE--IVQVVRVSTPWLQHLSSAGGV	230
<i>G.gallus</i>	IGGLNWEIT--DTGSFQALGLVGLQDQVYVAVLKAAISLHYLNGHQKWEHLPESENTQYMLYSRAGAVIHLGVVPSQHLKVLTLVSEEDGE--IVIEQTKVAAAPWLKSLNGAGGV	223
<i>X.laieis</i>	IGALNWEAELPESFQAVSFAGSQDTARYVAVLKAAISLHYLNGHQKWEHLPESENTQYMLYSRAGAVIHLGVVPSQHLKVLTLVSEEDGE--IVIEQTKVAAAPWLKSLNGAGGV	227
<i>D.melanogaster</i>	MG-----DMLTVQGHAPALVRGWNNTMGALWEWS-----IMMNTERAQDAMWISYKSVLYHYVLPWARS--LEVTAAYFASGHS--TGSTSKVIAPIWITSES--CTL	204
<i>C.elegans</i>	NGVLAHQLPISEKSEIQAIIHVTNQLRHVASGRTLVFR--LDE--KPVEIVTSIKTELTFSAFFQDDV--IHVSALKNAGKSIELSKI--EDGA--FEPLKTVEIKDFEPKNGH	220
<i>S.cerevisiae</i>	-----FTIDEIQLDSND--NAMVCVNSNNH-----WKYDLHDWFLLEEVDNA	130
<i>S.pombe</i>	NGIDRKIE--AD--KGKLFVFNKGFVYLNPHTRKFIELDLQASF-----ISIERDLQDAISFLTYAEKNVYLFKRDGQFVLQALDHNAYVYGPETVLNVPENAQLVTEKDYIIV	219
<i>H.sapiens</i>	VDEAVLVCPDPSSRLQLTALATEWELRQIPLQSLDLFEGSG--FQPRVLPTOPNPVDA--RAFFLHLSPSHYAL--QYHYGLTSL--KNFPQATLVSFATTGKTKVAAVMACRNEVQKSSSS	349
<i>M.musculus</i>	VDEAVLVCPDPSSRLQLTALATEWELRQIPLQSLDLFEGSG--FQPRVLPTOPNPVDA--RAFFLHLSPSHYAL--QYHYGLTSL--KNFPQATLVSFATTGKTKVAAVMACRNEVQKSSSS	348
<i>G.gallus</i>	VGEAVLVCDATATHSLVYCSLETEQEMKQIPLQSLDLFADG--FQPRVLTATQPSVINA--RTOFFLQSPGHFSL--LOCKQGLLSHLRDFQQAALVSFATTGKTKVAAVLTORNELKPASS	341
<i>X.laieis</i>	IGEGVLVCGDVPMAVHIIVSLSGEETTRYVSQSLDIEAEDPTQLDVIITAPQNGIGGELSGFLLQAPRRFLMHYHGVLTPLRDFESQVSLVNFATTGKTKVAAVQCKTEGPNKSG	346
<i>D.melanogaster</i>	SGTFVYCTDGKQLISLDLVSKSGQVIRTSLEAEPKGTQALTGLNGVIVDGPISVNDQSI--CGDLRSSSFAGVSFNYRKLAYADLSGILR-----	298
<i>C.elegans</i>	QEAYLSGSGTSLTIVDIIRQKVKQIKLETEILEISGHGPI--LARGAKNAQIVETAEANGAVRKSVDIGAGEALG--ITENHESVIVTSSDAVRVVEVN-----	318
<i>S.cerevisiae</i>	PSSTIIPQSSYLNDQVSKNNELHIDEQSKLAEWKLELPQ-----	172
<i>S.pombe</i>	SSNGVIYGIHVSMAIDISQLLIDEYKTFEWSIPGKRHYGISTVDSQSTPVTYLFV--IDFVLIIDEYIHEDTEALG--IHMEDNQTFSRVFAVAN-----	313
<i>H.sapiens</i>	EDSGMSGFSEKSSKSDSLACFNQTYTINLYLVEGRRLLDOTTIFSELSQSGTRERLYIQVFLKKDDSVGYRALVQTEDHLLFLQOLAGKVVLSREESAEVVCLEMVDLP--L--GAQA	467
<i>M.musculus</i>	ODGSVASFPETSGAQDLSACFNQTYTINLYLVEGRRLLDOTTIFSELSQSGTRERLYIQVFLKKDDSVGYRALVQTEDHLLFLQOLAGKVVLSREESAEVVCLEMVDLP--L--GAQA	468
<i>G.gallus</i>	--DGLGNALEDSQAQALTCSTNQTINLYLVEGRRLLDOTTIFNLQENGAKFERLYIQVFLKKDDSVGYRALVQTEDHLLFLQOLAG--KVVSVREESAEVVCLEMVDLP--L--GAQA	457
<i>X.laieis</i>	--AESYLTGQNCAGPEWYCPGHITYSINLYMADSGRRLLLETMTSEITDQICVRDFFYLQVFLKKDDSVGYRALVQTEDHLLFLQOLAG--KLILREESAEVVCLEMVDLP--L--GAQA	461
<i>D.melanogaster</i>	-----LALYLDNCAPAELEQLSPFHEGISTSNFDCQKRGKNCCLFLFSSTSESIVAVQHG--RVRSREESAEVVCLEMVDLP--L--DTEG	389
<i>C.elegans</i>	-----SATHFSAKRVKMAENLENSAPKSI--FGKNDKDWIE--IVGECH--EFVTVDS--NSKS--VNLESREESAEVVCLEMVDLP--L--ESGQ	402
<i>S.cerevisiae</i>	LEDEQMRIVQTRSAKHFQRLCTIIGKNVAGSGNGVLYRNPITGKVAEGGLVQDYRIKQLSLGETEKFLGILLDASAKVHVHY--EHAAPLADHMTIADLKTALAE	601
<i>S.pombe</i>	SIQDEENSSVS-----FENWYRHFNG--IDFLKHPHG-----FTSSVLD--AATTKIIP--TSIGIFCLSSDPKQVHR--LRYDFNINPE-----	470
<i>H.sapiens</i>	ELEGEGFKKADGLGMLFKRLSSQILILQAWTSHLWKMFDARKPRSQIKN-----EINIDTLARDE--NLQKMMVMVTASGKLFGEISS--STLWKQY--PNVK-----	565
<i>M.musculus</i>	ELEGEGFKKADGLGMLFKRLSSQILILQAWTSHLWKMFDARKPRSQIKN-----EINIDTLARDE--NLQKMMVMVTASGKLFGEISS--STLWKQY--PNVK-----	566
<i>G.gallus</i>	ELEGEGFKKADGLGMLFKRLSSQILILQAWTSHLWKMFDARKPRSQIKN-----EINIDTLARDE--NLQKMMVMVTASGKLFGEISS--STLWKQY--PNVK-----	555
<i>X.laieis</i>	ELEGEGFKKADGLGMLFKRLSSQILILQAWTSHLWKMFDARKPRSQIKN-----EINIDTLARDE--NLQKMMVMVTASGKLFGEISS--STLWKQY--PNVK-----	559
<i>D.melanogaster</i>	TLNEMKKGAGDFTSFERDIASAFRRITTAQVQIRSLHLVIG--LGPPPT-----DTQAGLVDSG--GKMLVLL--RAKIFIG--DNVS--KHHQLH--PNVIG--	487
<i>C.elegans</i>	MIEDEEDGESNIIISAEIRI--IQVFGG--CQRIITRSIEKVIYVVSITKNGGVADFINSVRSASGSGSAAGPFERDY--NLQVILVASTVTEGSDAD--RYLKLW--GEHFQPLES	521
<i>S.cerevisiae</i>	NKDMKAELDSN--WNAWYL--LTTNWNRI--NLLKENQFSPGRVFTKLLALDA-----KDTVSDLK--GFA--ILIVLHDFIG--LDMVKN--QLIKL--EIDQG-----	333
<i>S.pombe</i>	SIQDEENSSVS-----FENWYRHFNG--IDFLKHPHG-----FTSSVLD--AATTKIIP--TSIGIFCLSSDPKQVHR--LRYDFNINPE-----	470
<i>H.sapiens</i>	--PDSSFKLMVQRTTAHFPPHPPQCTLLVKDKESGMSLYFNPIFGKWSQVAPPV--KRFILQSL--LPVMDQYAKVLLIDDEYKVTAFFPATRNVLRLHELAPSIFFFYLVDAEQGRLE	683
<i>M.musculus</i>	--PDSSFKLMVQRTTAHFPPHPPQCTLLVKDKESGMSLYFNPIFGKWSQVAPPV--KRFILQSL--LPVMDQYAKVLLIDDEYKVTAFFPATRNVLRLHELAPSIFFFYLVDAEQGRLE	684
<i>G.gallus</i>	--PGASLKMVQRTTAHFPPHPPQCTLLVKDKETKMSFLYFNPIFGKRSQVAPPV--KRFILQSL--LPIMDQYAKVLLIDDEYKVTAFFPATRNVLRLHEEAMHSIFFFYLVDAEQGRLE	673
<i>X.laieis</i>	--PDSSFKLMVQRTTAHFPPHPPQCTLLVKDKVTEKSMYFNPIFGKLSQLAPPV--QRFILQSL--LPIMDQYAKVLLIDDQHKVIAEAPATKYVLQQLQEHSTIEFFYLVDEVEKGLS	677
<i>D.melanogaster</i>	FANDEQMRIVQTRSAKHFQRLCTIIGKNVAGSGNGVLYRNPITGKVAEGGLVQDYRIKQLSLGETEKFLGILLDASAKVHVHY--EHAAPLADHMTIADLKTALAE	601
<i>C.elegans</i>	PFDEGEKPVFQRTTAHFQDLGLASVFSNKLTHNGVIVSNPMVGVKVSRRN--ELGYRVRKLS--LVYTHKHVYVPM--IGKNEEIKIFRS-----ITPEELSTAPYLLIDIGSQVTO	635
<i>S.cerevisiae</i>	-----VKNMFTDKNNHDLVVFSDHGHYLTIEVTKDQPIIKSRSLPSEKTVDSIRNEHDHGY--IKFEDKHLFLK--NPGKNTDPIVAN-----NHSSSHIFVTEHDNGIY	638
<i>S.pombe</i>	--SVEWLD--DISDEDPK--AFVHGWNDASFYILNASDGS--ISQKSRDFKADEFYVDNISKNLPNQIFAVK--KVLPTG--NS-----IFEKISQEA--NS--EVV--TSET--KVEE	574
<i>H.sapiens</i>	YLRKDK--LTTLS--ELTIP--PEVQRVVKVGRSSEHVSQGRVMGDRSVLYKSLNPNLLAVVTESTDAHHERTFIGIFIDGVGTGR--IHSSVQK--KAGQVHL--HSENWVYQV	795
<i>M.musculus</i>	YLRKDK--LTTLS--ELTIP--PEVQRVVKVGRSSEHVSQGRVMGDRSVLYKSLNPNLLAVVTESTDVHHERTFIGIFIDGVGTGR--IHSSVQK--KAGQVHL--HSENWVYQV	796
<i>G.gallus</i>	FLRKDK--LTTTES--ELTIP--TEVQRVTVKGRSSEHVSQGRVMGDRSVLYKSLNPNLLAVVTESTDTHHERTFVGIYIDGVGTGR--IHSSVQK--KAGQVHL--HSENWVYQV	785
<i>X.laieis</i>	LRLNKK--LSTEEI--EVLLP--ADQQRITVYKGRSSEHVSQGRVMGDRSVLYKSLNPNLLAVVTESTDTHPERCFIGIYIDGVGTGR--IHSSVQK--KAGQVHL--HSENWVYQV	789
<i>D.melanogaster</i>	YFKYVAGGQ--LSTTH--INARLGGHNSQ--IGVAGK--NPIEHVVSQGRVLDGDRSVLYKSLNPNLLAVVTESTDTHPERCFIGIYIDGVGTGR--IHSSVQK--KAGQVHL--HSENWVYQV	717
<i>C.elegans</i>	LKIDISS--OKITPVPYQGNLGL--LTAQDD--IAVKG--SFNQK--HVSQGRVLYTREVQYKVPNPLA--IASIN--RADQHMTITVBIITGQVHVSASIG--KAAK--IHMH--HSENWVYQV	745
<i>S.cerevisiae</i>	YIIEEND--TVKQTKKAYN--SKEKMAVYSKRETTNLTGLITGDKSVLYKSLNPNLLAVVTESTDTHPERCFIGIYIDGVGTGR--IHSSVQK--KAGQVHL--HSENWVYQV	546
<i>S.pombe</i>	FSISAB--LTMDOV--SYNLA--EGEIVIASIRRNPHETIAF--SRVRLQNE--WYKYLNP--LFLSKC--KNDLVVYVMS--TGS--VYVQKNGG--ILFDK--YGF--FENWVYQV	681
<i>H.sapiens</i>	WNTK--ARRNEFTVLELYEGTEQYN-----ATAFSSLDRLP--LPOVLQQSYIFPSS--SAMEATITERG--TSR	859
<i>M.musculus</i>	WNTK--ARRNEFTVLELYEGTEQYN-----ATAFSSLDRLP--LPOVLQQSYIFPSS--SAMEATITERG--TSR	860
<i>G.gallus</i>	WNTK--ARRNEFTVLELYEGTEQYN-----ATAFSSLDRLP--LPOVLQQSYIFPSS--SAMEATITERG--TSR	849
<i>X.laieis</i>	WNTK--ARRNEFTVLELYEGTEQYN-----ATAFSSLDRLP--LPOVLQQSYIFPSS--SAMEATITERG--TSR	853
<i>D.melanogaster</i>	FNEK--LRRTEITITILEYEGTSQAN-----SSVSSSLQARP--MLVERQSYILRTIVEALRETI--TGNK	781
<i>C.elegans</i>	WSDK--GRRTELGIILEYEGTEEQHTQKVLFRCLHLVLGLENMEFEGVDDFYQKNHGIWNSKALKITKYLEIPKPCFEVFDKIAEKL--PVVAQSY--YAQGVDAVSSETEQL--TSR	863
<i>S.cerevisiae</i>	FSSEPVPQKLVVLEYESLTPDERLSN-----SSDNFSYDPLTGHINK--QFQTKQF--FREI--KTMSISKITDD--TK	619
<i>S.pombe</i>	QSDVPLNLSKTIISVLEFSGSHSNEKIDS-----NEIY--RHNDYR--YAF--TKAY--FDRE--TTLGV--TN--PQ--TSR	749
<i>H.sapiens</i>	HLIGLPSGAILSLPKALDPR--RPEIPTQSREENLIPYSDVQVHAERF--NYNQTVSRMRG--IYTA--SGLESTCLVVAAYGLDIYQTRVYPSKQFQVLDKDDYDYLISSVLFGLVF	974
<i>M.musculus</i>	HLIGLPSGAILSLPKALDPR--RPEIPTQSREENLIPYSDVQVHAERF--NYNQTVSRMRG--IYTA--SGLESTCLVVAAYGLDIYQTRVYPSKQFQVLDKDDYDYLISSVLFGLVF	975
<i>G.gallus</i>	HLIGLPSGAILSLPKALDPR--RPEIPTQSREENLIPYSDVQVHAERF--NYNQTVSRMRG--IYTA--SGLESTCLVVAAYGLDIYQTRVYPSKQFQVLDKDDYDYLISSVLFGLVF	964
<i>X.laieis</i>	HLIGLPSGAILSLPKALDPR--RPEIPTQSREENLIPYSDVQVHAERF--NYNQTVSRMRG--IYTA--SGLESTCLVVAAYGLDIYQTRVYPSKQFQVLDKDDYDYLISSVLFGLVF	968
<i>D.melanogaster</i>	HLIGLPSGAILSLPKALDPR--RPEIPTQSREENLIPYSDVQVHAERF--NYNQTVSRMRG--IYTA--SGLESTCLVVAAYGLDIYQTRVYPSKQFQVLDKDDYDYLISSVLFGLVF	974
<i>C.elegans</i>	SILVIGTAGSGVEMWHL--DPR--RPIASTTQGREGA--PIYIELPLPTESH--NYNQTVARLKN--IYTA--SGLESTCLVVAAYGLDIYQTRVYPSKQFQVLDKDDYDYLISSVLFGLVF	896
<i>S.cerevisiae</i>	AIYME--ENGQ--TYIFKLL--NARGKPAEEMAKDKK--FMATP--TVIP--INDNFIL--THFRNLLP--SGDSQL--ISITNLES--SIICOLG--LVFC--ITP--SGE--DLMSPTFEKGLLITIFVLLV	739
<i>S.pombe</i>	DVILGLS--NQVAMIQAL--SPMR--PVL--RNEKANDASF--PIE--IPL--NDMMVLSY--KRVYGVSG--TSGITNFS--TLV--LSTGL--VFF--ITAP--SMY--IM--SSH--KKQLMLTTF--GILL	865
<i>H.sapiens</i>	ATMI--TKRLAQV--KLL--NRAH--R--	993
<i>M.musculus</i>	ATMI--TKRLAQV--KLL--NRAH--R--	994
<i>G.gallus</i>	ATMI--TKRLAQV--KLL--NRAH--R--	983
<i>X.laieis</i>	ATMI--TKRLAQV--KLL--NRAH--R--	987
<i>D.melanogaster</i>	OSLIV--HLASR--KLL--KQA--K--	915
<i>C.elegans</i>	GSYVSR--RLARSNA--ASQ--S--	997
<i>S.cerevisiae</i>	IYVIFRPSVSN--KLL--KSQ--L--K	760
<i>S.pombe</i>	AVLLTP--VKK--KQ--L--TKN--N--	885

ANEXO B: Resultado da análise por TMA da correlação entre a ocorrência da KIAA0090 com o grau de desenvolvimento histológico do tumor e com outros marcadores envolvidos no câncer de mama.

Figura 1. A KIAA0090 apresenta uma correlação inversa ao grau de desenvolvimento tumoral. Os gráficos representam a análise de contingência realizada a partir dos dados imunohistoquímicos, mostrando a correlação da KIAA0090 com o grau de desenvolvimento histológico do tumor. À direita, a análise foi realizada com os casos classificados apenas em positivos ou negativos para a KIAA0090.

Figura 2. Gráfico em mosaico correspondente à análise de contingência da correlação entre os casos positivos ou negativos para a KIAA0090 com o receptor de estrógeno.

Figura 3. Gráfico em mosaico correspondente à análise de contingência da correlação entre os casos positivos ou negativos para a KIAA0090 com o receptor de progesterona.

Figura 4. Gráfico em mosaico correspondente à análise de contingência da correlação entre os casos positivos ou negativos para a KIAA0090 com a citoqueratina de padrão basal 5.

Figura 5. Gráfico em mosaico correspondente à análise de contingência da correlação entre os casos positivos ou negativos para a KIAA0090 com Her2.

ANEXO C: Parceiros moleculares da proteína ECM1 e seus homólogos em humanos.

<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. sapiens</i>	Nome do gene em humanos	Função em humanos (www.ncbi.nih.gov)
GET1	GRHL3	grainyhead-like 3	Fator de transcrição que estimula a migração celular endotelial primária
GET2	-	-	-
APM3	AP3M	adaptor-related protein complex 3, mu 1 subunit	Subunidade média do AP3. Um complexo adaptador associado com Golgi e estruturas intracelulares periféricas. Facilita o brotamento de vesículas do Golgi e está diretamente envolvido com o endereçamento de proteínas para o sistema endossomo/lisossomo
CHO2	EBP	emopamil binding protein (esterol isomerase)	Proteína integral de membrana do RE, envolvida no transporte de drogas, semelhante a receptores sigma
CLN1	PPT1	palmitoyl-protein thioesterase 1	Pequena glicoproteína envolvida no catabolismo de proteínas modificadas por lipídeos durante a degradação lisossomal
CLN2	TPP1	tripeptidyl peptidase I	Serina protease que atua no lisossomo para clivar tripeptídeos N-terminal do substrato
ELO1	ELP4	elongation protein 4 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	Codifica um componente do complexo elongador de 6 unidades, um complexo histona acetiltransferase que associa diretamente com RNA polimerase II durante a elongação transcricional
GWT1	PIGW	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class W	GPI é um complexo que ancora proteínas na superfície celular. PIGW atua no 3º passo da biossíntese de GPI e acetila o anel inositol
NAB2	NAB2	NGFI-A binding protein 2 (EGR1 binding protein 2)	Atua no núcleo para reprimir a transcrição induzida por alguns membros de EGR (resposta rápida de crescimento), uma família de transativadores.
NUP188	NUP188	nucleoporin 188kDa	-
OPI3	PEMT	phosphatidylethanolamine N-methyltransferase	Proteína que se localiza no retículo endoplasmático e associada a membrana mitocondrial, converte fosfatidiletanolamina em fosfatidilcolina por metilação seqüencial no fígado
PKC	MAPK7		Atua como ponto de integração entre vários sinais bioquímicos, envolvido proliferação, diferenciação, regulação transcricional e desenvolvimento
PMR1	ATP2C1	ATPase, Ca++ transporting, type 2C, member 1	Enzima dependente de Mg ²⁺ que catalisa a hidrólise de ATP acoplado ao transporte de cálcio
RPN4	PSMD13	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 13	Complexo proteinase multicatalítico, com estrutura altamente ordenada
RRI1	-	-	-
SLA1	SLA	Src-like-adaptor	-
SSH1	SSH1	slingshot homolog 1 (<i>Drosophila</i>)	Reativa o complexo ADF/cofilina. ADF – fator despolimerizante de actina
UBI4	UBC	Ubiquitin C	
PTK2	PTK2/FAK	protein tyrosine kinase 2	Proteína tirosina quinase citoplasmática, concentrada em adesões focais que se formam entre células em crescimento. Importante na interação célula-matriz e no crescimento da célula.
HLJ1	DNAJB4	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 4	Aumenta a expressão de E-caderina e suprime a atividade invasiva. Caracterizado como um supressor tumoral.
UBC7	UBE2G2	ubiquitin-conjugating enzyme E2G 2	Codifica um membro da enzima conjugante E2, altamente expresso em músculo