UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

LILIAN TIEMI INOUE

Caracterização funcional da interação entre as proteínas CTSP-1 e CTCF

São Paulo

Data de depósito na SPG:
23/09/2011

LILIAN TIEMI INOUE

Caracterização funcional da interação entre as proteínas CTSP-1 e CTCF

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutora em Ciências (Bioquímica).

Orientadora: Dra. Anamaria Aranha Camargo
Co-orientadora: Profa. Dra. Bettina Malnic

Versão corrigida da tese
(A versão defendida se encontra na Secretaria de Pós-Graduação do IQ/USP)

São Paulo
2011

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Inoue, Lilian Tiemi
I58c Caracterização funcional da interação entre as proteínas CTSP-1 e CTCF / Lilian Tiemi Inoue. -- São Paulo, 2011.
135p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador: Camargo, Anamaria Aranha
Co-orientador: Malnic, Bettina

1. Biologia molecular 2. Biologia celular 3. Câncer 4. Proteína : Bioquímica I. T. II. Camargo, Anamaria Aranha, orientador. III. Malnic, Bettina, co-orientador.

574.88 CDD

Lilian Tiemi Inoue

Caracterização funcional da interação entre as proteínas CTSP-1 e CTCF.

Tese apresentada ao Instituto de Química

da Universidade de São Paulo para obtenção do

Título de Doutora em Ciências (Bioquímica).

Aprovada em: _____

Banca Examinadora

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

Instituição: _____

Assinatura: _____

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

Instituição: _____

Assinatura: _____

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

Instituição: _____

Assinatura: _____

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

Instituição: _____

Assinatura: _____

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

Instituição: _____

Assinatura: _____

Aos meus queridos pais, Nilza e Kiyoshi, por todo amor, carinho e dedicação.
Muito obrigada pelos ensinamentos de valores que considero essenciais
na minha vida e pelo apoio e incentivos em todos os momentos,
sempre procurando me guiar pelos melhores caminhos.

À minha querida irmã e melhor amiga, Yuri, por seu carinho, conselhos e incentivos constantes, que sempre foram muito importantes para mim. É privilegioso e reconfortante saber que posso compartilhar qualquer momento com você.

À minha querida avó, Takae, que apesar de sua aparência serena e delicada, é capaz de nos transmitir muita força e coragem.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Anamaria Aranha Camargo, com quem tive o prazer de trabalhar e de me formar cientificamente. Muito obrigada por todas as oportunidades e apoios, pelos incentivos e pelas conversas amigas. A considero uma ótima profissional e admiro o seu comprometimento em realizar uma pesquisa séria e inovadora.

À minha co-orientadora, Dra. Bettina Malnic, pela grande oportunidade de trabalhar em seu laboratório, o que me proporcionou momentos muito agradáveis e de aprendizado. Muito obrigada pelas palavras de incentivo, sugestões e torcida.

Ao Dr. Érico Tosoni Costa, muito obrigada pela amizade, troca de ideias e pelos incentivos constantes. Sua colaboração e ensinamentos foram essenciais para o desenvolvimento desse trabalho. Admiro a forma como trabalha, sempre com respeito e consideração pelos outros, e me identifico com a sua visão sobre a ciência.

À Dra. Jussara Michaloski Souza, pela simpatia com que me recebeu no laboratório, pela contribuição no desenvolvimento desse trabalho e pelas conversas amigas que sempre são muito boas.

Ao Dr. Raphael Bessa Parmigiani, pelas boas ideias e sugestões ao longo desse trabalho e pela torcida.

À Dra. Cibele Masotti, pela torcida e pela contribuição com os experimentos.

Aos amigos do LMBG, atuais ou ex-membros: Aline, Ana Paula, Anna Christina, Bruna, Camila, Daniel, Eliane, Fabiana, Fabrício, Felícia, Gabriela, Maria Cristina, Natália, Paola, Paula, Renata, Ricardo, Tamara e Valéria, e à Neide, Daniela e Juliana. Com o meu jeito mais reservado, provavelmente pela descendência oriental, talvez nem todos saibam, mas gostaria de dizer que vocês são muito especiais para mim e que vivi momentos inesquecíveis nesse grupo. Foi um ótimo período, de muito aprendizado e amadurecimento.

Aos atuais ou ex-membros do laboratório da professora Bettina: Érica, Daniel, Marcela e Edson, com alguns dos quais convivi por pouco tempo, mas com quem passei momentos muito agradáveis.

Ao Dr. Sandro Valentini, ao Dr. Cleslei Zanelli e à Daniella Rossetto, da UNESP de Araraquara, pela contribuição nos experimentos de interação cruzada.

Ao Dr. Flávio da Silva, da UFSCAR, pela contribuição na produção da proteína CTSP-1/GST recombinante.

À Dra. Laura Sichero, pela colaboração na realização dos experimentos de luciferase.

À Dra. Vilma Martins, do Centro Internacional de Pesquisa, e à Dra. Helena Nader, da UNIFESP, pela contribuição nos ensaios de microscopia confocal.

Ao Dr. Enrique Boccardo, pela leitura dessa tese, sugestões e disposição em contribuir para o desenvolvimento desse trabalho.

À Dra. Júlia Cunha, do Instituto Butantan, pelas análises de espectrometria de massa.

Aos funcionários do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, por contribuírem para a realização desse trabalho.

Ao meu cunhado, Marcelo Maisato, pelos incentivos e pela torcida constante.

Aos amigos, que tornaram a minha vida mais leve e divertida em vários momentos, em especial aos saudosos Juninho e Fabiano de Mello, à Cristiane de Oliveira e à Ednéia de Paula. Muito obrigada pela amizade, pelos conselhos e incentivos.

À família do meu tio Iócio Abe, em especial a ele, pelo apoio e pela torcida, que apesar de discreta, sei que é sempre muito sincera.

Aos tios Missaca e Jorge Abe e a toda sua família, pessoas muito queridas e especiais e que, apesar da distância, sei que estão presentes na minha vida através dos pensamentos, sempre nos enviando energias positivas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), ao Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer (ILPC) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelos financiamentos que foram essenciais para a realização desse trabalho.

"Utopia is like the horizon.
I move two steps closer, and it moves two steps further away.
I walk ten steps, and the horizon moves ten steps further away.
As much as I may walk, I will never reach it.
So, what is the purpose of utopia?
The purpose is this: to keep on walking."

Eduardo Galeano

RESUMO

Inoue, L.T. **Caracterização funcional da interação entre as proteínas CTSP-1 e CTCF**. 2011. 135 p. Tese de doutorado – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Os antígenos *cancer-testis* (CT) são proteínas imunogênicas expressas em tecido gametogênico e em diferentes tipos de tumor, sendo considerados candidatos promissores para a imunoterapia do câncer. Entretanto, pouco se sabe sobre a função desses antígenos na tumorigênese. Em 2006, identificamos CTSP-1 como um novo antígeno CT, frequentemente expresso em vários tumores. Nesse trabalho, investigamos a função de CTSP-1 por meio da identificação de proteínas expressas em tumores de próstata e que são capazes de interagir fisicamente com esse antígeno. Demonstramos que CTSP-1 interage com a proteína CTCF em ensaios de duplo-híbrido em leveduras, *pulldown* e de co-localização e, em seguida, analisamos o impacto da superexpressão de CTSP-1 no controle da expressão de genes CT mediada por CTCF e na progressão do ciclo celular. Utilizando o CT NY-ESO-1 como modelo, demonstramos que a superexpressão de CTSP-1 não altera os níveis endógenos de NY-ESO-1 na linhagem celular tumoral H1299. Por outro lado, observamos que a superexpressão de CTSP-1 48h após as transfecções em H1299 induz um bloqueio do ciclo em G0/G1, reduzindo a capacidade clonogênica dessas células por um mecanismo dependente dos níveis de expressão de CTSP-1. Resultados semelhantes não foram observados em ensaios com clones superexpressando CTSP-1 estavelmente, o que sugere que eles tenham se originado de células que conseguiram escapar do bloqueio em G0/G1. Resultados preliminares sugerem que a redução da capacidade clonogênica das células H1299 que superexpressam CTSP-1 48h após as tansfecções não está associada à ocorrência de morte por apoptose.

Palavras-chave: tumor, antígenos *cancer-testis* (CT), caracterização funcional, CTSP-1, CTCF.

ABSTRACT

Inoue, L.T. **Functional characterization of the interaction between the proteins CTSP-1 and CTCF.** 2011. 135 p. PhD Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Cancer-testis (CT) antigens are immunogenic proteins expressed in gametogenic tissues and in different histological types of tumors, being considered promising candidates for cancer immunotherapy. However, little is known about their role in tumorigenesis. In 2006, we identified CTSP-1 as a novel CT antigen, frequently expressed in different types of tumors. In this work, we investigated the functional role of CTSP-1 through the identification of proteins expressed in prostate tumors and that physically interact with this tumor antigen. We demonstrate that CTSP-1 interacts with the CTCF protein using the yeast two-hybrid system, pulldown and co-localization assays and have further analyzed the impact of CTSP-1 overexpression on the expression of CT genes mediated by CTCF and on the cell cycle progression. Using the CT antigen NY-ESO-1 as a model, we showed that the CTSP-1 overexpression does not alter the endogenous levels of NY-ESO-1 in the tumor cell line H1299. On the other hand, we observed that the overexpression of CTSP-1 in H1299 cells 48h after the transfections induces a cell cycle arrest in G0/G1 and reduces the clonogenic capacity of these cells by a mechanism dependent on the CTSP-1 expression levels. Similar results were not observed for cell clones stably overexpressing CTSP-1, suggesting that these clones have arisen from cells that managed to escape cell cycle arrest in G0/G1. Preliminary results suggest that the reduced clonogenic capacity of H1299 cells expressing CTSP-1 and analyzed 48h after the transfections is not associated with cell death by apoptosis.

Keywords: tumor, cancer-testis (CT) antigens, functional characterization, CTSP-1, CTCF.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da estrutura exon/intron dos membros da família CTSP.
Figura 2 – Padrão de expressão de CTSP-1
Figura 3 – Curva de sobrevivência de acordo com a presença de resposta imune humoral anti-CTSP-1 em pacientes que apresentavam um alto grau de Gleason.
Figura 4 – Representação esquemática da proteína CTCF.
Figura 5 – Representação esquemática dos perfis de metilação e de expressão de CTCF e BORIS durante a espermatogênese.
Figura 6 – Sistema duplo-híbrido em leveduras.
Figura 7 – Esquema do ensaio de interação cruzada.
Figura 8 – Avaliação da expressão da proteína LexA/CTSP-1.
Figura 9 – Teste de auto-ativação da isca.
Figura 10 – Exemplo de análise da transcrição do genes repórteres.
Figura 11 – Exemplos de análises dos clones duplo-positivos ($lacZ^+$ e $LEU2^+$).
Figura 12 – Exemplo de ensaio de interação cruzada.
Figura 13 – Validação da interação CTSP-1/CTCF em linhagem celular tumoral humana.
Figura 14 – Avaliação da superexpressão da proteína CTSP-1/HA em clones de H1299.
Figura 15 – Citometria de fluxo de clones H1299 vetor vazio e superexpressando a proteína CTSP-1/HA imuno-marcados com anti-HA.
Figura 16 – Localização subcelular de CTSP-1/HA exógena e CTCF endógena em células dos clones de H1299.
Figura 17 – Análise da co-localização das proteínas CTCF endógena e CTSP-1/HA exógena.
Figura 18 – Translocação citoplasma/núcleo da proteína CTSP-1/GFP ao longo de 7h.
Figura 19 – Análise do impacto da superexpressão de CTSP-1/HA sobre a atividade do promotor simplificado de NY-ESO-1.
Figura 20 – Análise do nível de expressão de NY-ESO-1 nos clones de H1299.
Figura 21 – Análise de correlação entre os níveis de expressão de CTSP-1/HA e de NY-ESO-1 endógeno em clones de H1299 superexpressando CTSP-1/HA.
Figura 22 – Análise do impacto da superexpressão de CTSP-1/HA 48h após as tranfecções sobre o ciclo celular de H1299.
Figura 23 – Análise do impacto da superexpressão estável de CTSP-1/HA sobre o ciclo celular de H1299.
Figura 24 – Ensaio clonogênico dependente de ancoragem de células H1299 superexpressando CTSP-1/HA depois de 48h das transfecções.
Figura 25 – Avaliação do impacto da superexpressão estável de CTSP-1/HA em H1299 sobre sua capacidade clonogênica.
Figura 26 – Comparação dos níveis de expressão de CTSP-1/HA entre as populações de H1299 48h e 12 dias após as transfecções.
Figura 27 – Avaliação de morte por apoptose em células H1299 superexpressando CTSP-1/HA 48h após as transfecções

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – *Primers* utilizados nas RT-PCR.
Tabela 2 – *Primers* utilizados na PCR em tempo real.
Tabela 3 – Proteínas candidatas analisadas no ensaio de interação cruzada.
Tabela 4 – Perfil de expresssão de genes CT, de BORIS e de CTCF em linhagens celulares tumorais dividas de acordo com a expressão de CTSP-1 e de BORIS.
Tabela 5 – Média de transcritos CT expressos nas linhagens celulares tumorais agrupadas de acordo com a expressão de CTSP-1 e BORIS.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5azadC	*5-aza-2'-deoxicitidine*
APC	*Allophycocyanin*
BLASTN	*Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide*
BSA	*Bovine Serum Albumin*
DAPI	*4', 6-diamidino-2-fenil-indol*
DEPC	*Diethyl Pyrocarbonate*
dNTP	*Deoxyribonucleotide Triphosphate*
DTT	*Dithiothreitol*
EDTA	*Ethylenediamine Tetraacetic Acid*
EMSA	*Eletrophoretic Mobility Shift Assay*
FS	*Phosphatidylserine*
FSC	*Forward Scatter*
GST	*Glutathione S-Transferase*
HDAC	*Histone Deacetylase*
hMLH1	*Human mut-L Homologue-1*
IP	*Iodeto de Propídeo*
NAD	*Nicotinamide Adenine Dinucleotide*
PBS	*Phosphate Buffered Saline*
PCR	*Polymerase Chain Reaction*
PEG	*Polyethylene Glycol*
RT-PCR	*Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction*
SDS-PAGE	*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*
SSC	*Side Scatter*
UAS	*Upstream Activating Sequence*
X-Gal	*5-bromo-4-chloro-indolyl-β-D- galactopyranoside*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO *15*
1.1. Câncer *15*
1.2. Antígenos tumorais *16*
1.2.1. Antígenos *cancer-testis* (CT*)*
1.2.1.1. Funções dos antígenos *cancer-testis* (CT)
1.2.1.2. Antígeno CTSP-1
1.3. CTCF (*CCCTC-binding Factor*) *26*
1.3.1. CTCF e BORIS no controle da expressão de antígenos CT
1.3.2. CTCF na regulação do ciclo celular

2. OBJETIVOS *35*
2.1. Objetivo geral *35*
2.2. Objetivos específicos *35*

3. MATERIAIS E MÉTODOS *36*
3.1. Sistema duplo-híbrido em leveduras *36*
3.1.2. Transformação da biblioteca em EGY48
3.1.3. Clonagem de CTSP-1 em pGilda
3.1.4. Transformação de pGilda/CTSP-1 em RFY206
3.1.5. Indução da expressão da isca
3.1.6. *Western Blot*
3.1.7. Teste de auto-ativação da isca
3.1.8. Varredura da biblioteca com a isca
3.1.9. Identificação dos clones duplo-positivos
3.1.10. PCR dos clones duplo-positivos
3.1.11. Digestão dos produtos de PCR com *HaeIII* e *HinfI*
3.1.12. Extração dos vetores pJG4-5/cDNA dos clones duplo-positivos
3.1.13. Sequenciamento
3.2. Ensaio de interação cruzada *46*
3.3. *GST-pulldown* *48*
3.3.1. Clonagem de CTSP-1 em pGEX-2T
3.3.2. Ensaio de *GST-pulldown*
3.3.3. *Western Blot*
3.4. Análise do perfil de expressão de genes CT, BORIS e CTCF *51*
3.4.1. Linhagens celulares tumorais
3.4.2. Extração dos RNAs
3.4.3. Tratamento dos RNAs com DNase
3.4.4. RT-PCR *(Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction*)
3.5. Superexpressão de CTSP-1 em H1299 ..... *55*
3.5.1. Clonagem de CTSP-1 em pcDNA3/HA ou pEGFP-C1
3.5.2. Transfecção e seleção dos clones transfectados
3.5.3. Análise da expressão de CTSP-1/HA pelos clones H1299
3.5.3.1. *Western Blot*
3.5.3.2. Citometria de fluxo com imuno-marcação de CTSP-1/HA
3.5.3.3. Imunofluorescências
3.6. Monitoramento da localização subcelular de CTSP-1/GFP 60
3.7. Análise do impacto da superexpressão de CTSP-1/HA sobre os níveis de expressão de NY-ESO-1 endógeno em H1299 60
3.7.1. Ensaio de repórter luciferase
3.7.2. PCR em tempo real
3.7.3. *Western Blot*

3.7.4. Citometria de fluxo com imuno-marcação de CTSP-1/HA e de NY-ESO-1
3.8. Análise do impacto da superexpressão de CTSP-1/HA sobre a regulação do ciclo e da capacidade clonogênica de células H1299..... *65*
3.8.1. Análise do ciclo de células H1299 superexpressando CTSP-1/HA 48h após as transfecções
3.8.2. Análise do ciclo dos clones de H1299 superexpressando CTSP-1/HA
3.8.3. Ensaios clonogênicos
3.8.4. Avaliação do nível de expressão de CTSP-1/HA nas populações de H1299 48h e 12 dias após as transfecções
3.8.5. Ensaio de apoptose

4. RESULTADOS *69*
4.1. Identificação das interações CTSP-1/proteínas candidatas *69*
4.1.1. Caracterização da isca LexA/CTSP-1
4.1.1.1. *Western Blot* para avaliar a expressão da isca
4.1.1.2. Teste de auto-ativação
4.1.2. Varredura da biblioteca de cDNAs de tumores de próstata
4.1.3. Análise dos clones duplo-positivos ($lacZ^+$ e $LEU2^+$)
4.2. Validação das interações CTSP-1/proteínas candidatas *75*
4.2.1. Validação das interações CTSP-1candidatas pelo ensaio de interação cruzada
4.2.2. Validação da interação CTSP-1/CTCF por *GST-pulldown*
4.3. Análise do perfil de expressão de um painel de genes CT e de CTCF em linhagens celulares tumorais *80*
4.4. Superexpressão de CTSP-1/HA na linhagem tumoral H1299 ..... *84*
4.5. Localização subcelular de CTSP-1/HA e de CTCF endógena em H1299 ..... *87*
4.6. Translocação de CTSP-1 entre núcleo e citoplasma *91*
4.7. Avaliação do impacto da superexpressão de CTSP-1/HA sobre a regulação da expressão de genes CT em H1299 ..... *92*
4.7.1. Avaliação do impacto da superexpressão de CTSP-1/HA sobre a atividade do promotor simplificado de NY-ESO-1 em H1299
4.7.2. Avaliação do impacto da superexpressão de CTSP-1/HA sobre os níveis endógenos de expressão de NY-ESO-1 em H1299
4.8. Análise do impacto da superexpressão de CTSP-1/HA sobre a regulação do ciclo e a capacidade clonogênica de células H1299..... *96*
4.8.1. Avaliação do efeito da superexpressão de CTSP-1/HA sobre a progressão de células H1299 no ciclo
4.8.2. Avaliação do efeito da superexpressão de CTSP-1/HA sobre a capacidade clonogênica de células H1299
4.8.3. Comparação dos níveis de expressão de CTSP-1/HA e de GFP entre populações de H1299 48h e 12 dias após as transfecções
4.8.4. Análise de morte celular por apoptose

5. DISCUSSÃO *108*
5.1. Interação entre CTSP-1 e CTCF *108*
5.2. Caracterização funcional de CTSP-1 considerando sua interação com CTCF *109*
5.2.1 Análise do impacto da superexpressão de CTSP-1 sobre a regulação da expressão de genes CT na linhagem celular tumoral H1299
5.2.2. Análise do impacto da superexpressão de CTSP-1 sobre a regulação do ciclo e sobre a capacidade clonogênica de células H1299
6. CONCLUSÕES *122*

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *124*

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer

O câncer é diagnosticado em aproximadamente 12 milhões de pessoas em todo o mundo e é responsável por cerca de 7 milhões de mortes anualmente, sendo estimados 11 milhões de óbitos decorrentes da doença para 2030 segundo a Organização Mundial de Saúde.

A capacidade dos tumores malignos de invadir os tecidos vizinhos normais e de se disseminar para órgãos distantes impossibilita, muitas vezes, a ressecção cirúrgica no momento do diagnóstico. Logo, a quimioterapia e a radioterapia representam recursos necessários de tratamento que, no entanto, têm utilização limitada devido à sua inespecificidade e toxicidade (COOPER 2000). Algumas estratégias alternativas, como o uso de fatores anti-angiogênicos (PRADEEP et al. 2005; PANDYA et al. 2006) e, principalmente, a imunoterapia, têm sido consideradas formas potenciais para um tratamento mais específico e eficaz do câncer (SCANLAN et al. 2002; ZENDMAN et al. 2003; SIMPSON et al. 2005).

Existem dois tipos de imunoterapia do câncer: a passiva e a ativa. A primeira não induz a formação de memória imunológica contra o antígeno tumoral nos pacientes e baseia-se na utilização, por exemplo, de anticorpos monoclonais e na transferência de células T ativadas *in vitro* para o paciente. Ao contrário, a imunoterapia ativa é capaz de estimular a formação de memória imunológica e baseia-se na utilização, por exemplo, de células dendríticas "pulsadas" com um antígeno tumoral específico, ou de vacinas, principalmente as polivalentes, que alvejam diferentes antígenos tumorais (ROSENBERG 1996).

Diante desse cenário, são de grande interesse a identificação e a caracterização de novos antígenos tumorais que possam ser empregados no desenvolvimento de imunoterapias do câncer (SCANLAN et al. 2002).

1.2. Antígenos tumorais

Os antígenos tumorais são proteínas que apresentam um restrito perfil de expressão dentre os tecidos normais adultos e que são capazes de elicitar respostas imunes humorais e/ou celulares quando expressos de forma aberrante nos tumores. Esses antígenos podem ser classificados em cinco categorias (OLD 2003):

(1) antígenos de diferenciação, expressos por células tumorais e por um subconjunto restrito de células normais. Exs: PSMA e NY-BR-1;

(2) antígenos mutados. Exs: formas mutadas de p53 ou CDK4;

(3) antígenos superexpressos ou amplificados. Exs: c-erbB2 e CEA;

(4) antígenos de vírus oncogênicos. Exs: E6 e E7;

(5) antígenos *cancer-testis* (CT). Exs: MAGE e NY-ESO-1.

Dentre essas categorias, os antígenos *cancer-testis*, também denominados antígenos CT, têm sido bastante estudados e vacinas alvejando algumas dessas proteínas, principalmente MAGE-A3 e NY-ESO-1, já estão sendo testadas clinicamente. MAGE-A3 é expresso em melanomas e em tumores de bexiga, de cabeça e pescoço e de pulmão. NY-ESO-1 também é expresso em diversos tipos de tumores, dentre eles, em melanomas e em tumores de bexiga, de mama e de ovários. Atualmente, vacinas formuladas com peptídeos ou proteínas recombinantes desses CT já estão sendo utilizadas em ensaios clínicos diversos para o tratamento de alguns tumores (revisto por OLD 2008).

1.2.1. Antígenos *cancer-testis* (CT)

Os antígenos *cancer-testis* (CT) são expressos apenas nas células germinativas e nas células do trofoblasto, sendo pouco ou nada expressos em tecidos somáticos adultos e aberrantemente expressos em vários tipos histológicos de tumores malignos (SIMPSON et al. 2005).

Em 1991, VAN DER BRUGGEN et al. identificaram o primeiro antígeno CT, denominado MAGE-A1 (*Melanoma Antigen A1*). Atualmente, existem mais de 150 genes CT já identificados, que estão agrupados em 83 famílias gênicas diferentes (*CT Database*, *www.cta.lncc.br*; ALMEIDA et al. 2009).

De acordo com a sua localização cromossômica, no cromossomo X ou em outros cromossomos, esses genes podem ser classificados em *X-CT* ou *non-X CT*, respectivamente. Normalmente, os genes *X-CT* formam famílias gênicas multi-cópias localizadas *in tandem* no cromossomo X e, em conjunto, correspondem a cerca de 10% da sequência desse cromossomo (ROSS et al. 2005). Ao contrário, os *non-X CT* normalmente são genes de cópia única e estão distribuídos ao longo do genoma em cromossomos diversos, exceto no cromossomo X (CABALLERO e CHEN 2009).

Além disso, com base em seus perfis de expressão dentre os tecidos normais, os genes CT podem ser classificados em três grupos: (1) os *testis-restricted* – expressos somente em testículo; (2) os *testis/brain* – expressos apenas em testículo e em cérebro; ou (3) os *testis-selective* – expressos principalmente em testículo, mas também, em baixos níveis em tecidos somáticos normais (HOFMANN et al. 2008).

De acordo com o número e a frequência de transcritos CT expressos pelos diferentes tipos histológicos tumorais, SCANLAN et al. (2004) classificaram esses tumores em três categorias: (1) *high CT expressors* – que expressam mais de 50% dos CT analisados, com uma frequência maior do que 20% (frequência esta maior do que média das frequências de expressão, de 16,1%, para todos os transcritos analisados no trabalho), tais como os melanomas e os tumores de pulmão e de bexiga; (2) *moderate CT expressors* – tumores que expressam de 30 a 50% dos transcritos CT analisados, com uma frequência maior do que 20%, tais como os tumores de mama e de próstata; e (3) *low CT expressors* – tumores que

expressam menos do que 30% dos transcritos CT examinados, com uma frequência de expressão maior do que 20%, como os tumores de rim e de cólon.

Ainda com relação à expressão dos antígenos CT, há evidências de que a maior frequência de sua expressão nos tumores está associada a um pior prognóstico da doença. Nesse sentido, diversos trabalhos mostraram que os tumores de graus mais avançados e metastáticos podem apresentar uma frequência de expressão de antígenos CT maior do que os tumores iniciais (KURASHIGE et al. 2001; BARROW et al. 2006; SUYAMA et al. 2011).

Outro dado interessante sobre a expressão dos antígenos CT, em especial dos *X-CT*, é que eles tendem a ser expressos de forma aparentemente não-randômica e coordenada nos tumores (TAJIMA et al. 2003; TAYLOR et al. 2005). Nesse contexto, GURE et al. (2005) demonstraram que a expressão de um antígeno CT em um determinado tumor aumenta fortemente a tendência de que um segundo CT seja simultaneamente expresso. Além disso, as permutações de expressão desses antígenos nos tumores parecem ocorrer de forma não-aleatória. O antígeno CT NY-ESO-1, por exemplo, raramente é encontrado na ausência do CT MAGE-A3 (SIMPSON et al. 2005).

A tendência de expressão simultânea e não-aleatória de genes CT em tumores sugere a existência de mecanismos biológicos que regulam e coordenam esse processo. Sabe-se que eventos epigenéticos – tais como a acetilação de histonas e, principalmente, a metilação de regiões promotoras – participam do controle da expressão desses genes (SIGALOTTI et al. 2004; LIM et al. 2005; WOLOSZYNSKA-READ et al. 2008). WISCHNEWSKI et al. (2006), por exemplo, utilizaram um inibidor da DNA metilase, a 5-aza-2'-deoxicitidina (5-azadC), e um inibidor de histonas deacetilase (HDAC), a tricostatina A, e demonstraram que a desmetilação dos promotores e a acetilação de histonas eram capazes de des-reprimir a expressão dos genes CT MAGE-A1, -A2, -A3 e -A12 em células tumorais humanas.

Um modelo interessante proposto para explicar a ativação aberrante dos antígenos CT nos tumores é a indução de um programa gametogênico/trofoblástico no câncer (OLD 2001). Segundo esse modelo, o perfil de expressão dos antígenos CT nos tumores seria equivalente àquele observado nos gametas e nas células do trofoblato em desenvolvimento, o que explicaria o padrão de expressão agrupado e não-aleatório dos CT nos tumores. Nesse caso, os antígenos CT seriam importantes para a tumorigênese porque confeririam às células tumorais características vantajosas que normalmente são essenciais ao desenvolvimento dos gametas e das células do trofoblasto, mas desnecessárias às células somáticas adultas normais. Sustentando esse modelo, tem-se o fato de as células gametogênicas e neoplásicas apresentarem muitas características em comum, tais como: a imortalidade, a hipometilação do genoma e as capacidades de escaparem do sistema imune e de promoverem a angiogênese. Além disso, sabe-se que, frequentemente, diferentes tipos de tumores produzem hormônios trofoblásticos como, por exemplo, a gonadotrofina coriônica humana (OLD 2001).

Como mencionado anteriormente, os antígenos CT são capazes de induzir a resposta imune humoral, que é mediada por anticorpos, e/ou a resposta imune celular, que é mediada por linfócitos TCD4 e TCD8 (SCANLAN et al. 2004). O antígeno NY-ESO-1, por exemplo, é um dos antígenos tumorais mais imunogênicos já identificados, sendo observadas respostas imunes espontâneas contra o mesmo em mais de 50% dos pacientes com mielomas múltiplos NY-ESO-1 positivos (VAN RHEE et al. 2005).

Portanto, devido ao seu restrito padrão de expressão e à sua imunogenicidade em pacientes com câncer, os antígenos CT vêm sendo considerados candidatos promissores para o desenvolvimento de imunoterapias para essa doença (SCANLAN et al. 2004). Apesar disso, questões primordiais a respeito das funções biológicas dos antígenos CT nas células gametogênicas e, principalmente, nas células tumorais ainda são pouco exploradas (OLD 2001; ZENDMAN et al. 2003; SCANLAN et al. 2004; SIMPSON et al. 2005).

1.2.1.1. Funções dos antígenos *cancer-testis* (CT)

Uma questão relevante, porém ainda em aberto a respeito da função dos antígenos CT é se eles realmente contribuem para a formação e a progressão tumoral – conforme foi proposto por OLD (2001) – ou se eles são funcionalmente irrelevantes, sendo expressos pelas células tumorais apenas como um reflexo da desmetilação global do genoma que ocorre durante a transformação maligna (SIMPSON et al. 2005).

Alguns trabalhos recentes utilizaram o sistema de duplo-híbrido em leveduras como uma metodologia inicial para identificar proteínas capazes de interagir fisicamente com determinados antígenos CT e, dessa forma, obter informações funcionais a respeito dos mesmos. Em conjunto, esses trabalhos forneceram evidências de que os antígenos CT podem ser importantes para a tumorigênese, sendo os membros da família MAGE-A os mais estudados até o momento.

Em 2004, utilizando essa metodologia e uma biblioteca de cDNAs de testículo, LADURON et al. (2004) identificaram proteínas parceiras do antígeno CT MAGE-A1. Foi demonstrado que MAGE-A1 interage com a proteína SKIP (*SKI interacting protein*) e, com isso, pode recrutar histonas deacetilases e reprimir a transcrição gênica da via de sinalização de NOTCH-1. Nesse trabalho, os autores sugeriram que MAGE-A1 contribui para a repressão de genes importantes para a diferenciação dos gametas e inferiram uma função similar desse antígeno no processo de inibição da diferenciação de células tumorais, de modo que a expressão de MAGE-A1 seria um evento importante para a tumorigênese.

Também partindo de ensaios de duplo-híbrido, MONTE et al. (2006) mostraram que o CT MAGE-A2 interage com p53, que é um fator de transcrição capaz de coordenar alterações na expressão gênica e, com isso, eliminar as células malignas. Nesse trabalho, foi demonstrado que MAGE-A2 reprime a atividade de transativação de p53 e que, com isso, células de linhagem de melanoma se tornam resistentes à ação do quimioterápico etoposide. Em 2011,

MARCAR et al. também demonstraram que MAGE-A pode interagir com p53, impedindo a associação deste fator com a cromatina. Esses autores demonstraram ainda que o silenciamento de vários genes MAGE-A pode levar ao aumento da expressão de genes regulados por p53 bem como à interação de p53 com o promotor dos genes p21, MDM2 e PUMA , o que leva ao retardamento do ciclo celular na fase G1 e à morte celular por apoptose (MARCAR et al. 2011).

Outros trabalhos funcionais também mostraram a participação de alguns antígenos CT, como o SCP-1 e o SPO-11, na gametogênese. SCP-1 faz parte do complexo sinaptoneal e contribui para o pareamento de cromossomos homólogos durante a meiose (MEUWISSEN et al. 1992). SPO-11 é uma endonuclease que catalisa as quebras na fita dupla de DNA durante a recombinação que ocorre na meiose da gametogênese (KEENEY et al. 1997). Assim, com base nesses estudos, é possível especular que esses antígenos participem também do processo tumorigênico, originando algumas das anormalidades cromossômicas observadas nas células tumorais, tais como as aneuploidias e as fusões gênicas.

Sabe-se ainda que alguns antígenos CT, tais como N-RAGE, NY-ESO-1, MAGE-1 e SSX, podem ser expressos em células-tronco mesenquimais humanas, o que sugere uma possível participação dessas proteínas na biologia de células-tronco e no desenvolvimento embrionário (KEENEY et al. 1997; CRONWRIGHT et al. 2005; COSTA et al. 2007). Nesse sentido, CRONWRIGHT et al. (2005) mostraram que antígenos CT da família SSX expressos em células-tronco mesenquimais são capazes de modular a expressão e a atividade da MMP-2 (*matrix metalloproteinase 2*), que está envolvida em processos de adesão celular, motilidade e interação célula-matriz. Partindo desses dados, os autores demonstraram ainda que os antígenos CT SSX participam do processo normal de migração de células-tronco e sugeriram que eles desempenhem uma função similar no processo de migração das células tumorais metastáticas.

Interessantemente, ensaios de imunohistoquímica têm mostrado que a expressão dos antígenos CT nos tumores é bastante heterogênea, sendo observados pequenos grupos de células tumorais com uma forte expressão dessas proteínas distribuídos em meio a uma grande massa de células tumorais que não as expressam. Diante da heterogeneidade de expressão dos antígenos CT nos tumores, das evidências de participação dessas proteínas no desenvolvimento da doença, e estando de acordo com o conceito cada vez mais bem estabelecido de que o câncer é mantido por um pequeno número de células-tronco tumorais, alguns autores especulam que certos antígenos CT sejam expressos apenas por essas células e que, portanto, talvez possam ser utilizados como marcadores das mesmas (SIMPSON et al. 2005; COSTA et al. 2007; GEDYE et al. 2009). Nesse sentido, tem-se proposto que no processo de transformação maligna, modificações genéticas e epigenéticas acumulem-se gradualmente e estocasticamente em células-tronco normais. Isso levaria à expressão ectópica de determinados antígenos CT e de fatores embrionários que contribuiriam para o surgimento das células-tronco tumorais, que são responsáveis por formar e manter a massa tumoral (POSTOVIT et al. 2007).

Apesar disso, as evidências recentes de que alguns antígenos CT também podem ser expressos em células-tronco normais (CRONWRIGHT et al. 2005; COSTA et al. 2007) reforçam a necessidade de se estudar as funções biológicas dessas proteínas previamente ao desenvolvimento de imunoterapias do câncer que alvejem esses antígenos.

Além disso, um conceito já bem estabelecido na área de imunologia de tumores é que por um processo conhecido como imunoedição do câncer, as células tumorais podem perder a expressão de proteínas imunogênicas desnecessárias ao seu desenvolvimento, como uma forma de escapar da resposta imune anti-tumoral (JAGER et al. 1997; DUNN et al. 2004). Sendo assim, terapias que tenham como alvos os antígenos CT, por exemplo, podem favorecer a seleção positiva justamente das células tumorais que perdem a expressão dos mesmos caso

eles não sejam essenciais ao tumor. Essa seleção, por sua vez, levaria à ineficácia terapêutica e à progressão da doença após um determinado período.

Sendo assim, embora alguns antígenos CT já estejam sendo testados em terapias clínicas, a caracterização funcional dos mesmos deve ser priorizada.

1.2.1.2. Antígeno CTSP-1

Utilizando a informação gerada por meio de alinhamentos entre as sequências expressas e a sequência genômica humana, nosso grupo identificou um novo gene localizado no cromossomo 21, denominado originalmente C21orf99 (REYMOND et al. 2002) e, posteriormente, CTSP-1. Esse gene possui 3.915 pares de base (pb) organizadas em 15 exons (**figura 1**), uma região codificadora de 609 pb, apresenta diferentes formas de *splicing* e uma alta similaridade com o gene NY-BR-1 (PARMIGIANI et al. 2006), o qual codifica um antígeno de diferenciação que atua como um fator de transcrição tecido-específico (JAGER et al. 2001).

Além disso, existem três outros membros da família CTSP, denominados CTSP-2, CTSP-3 e CTSP-4, que estão localizados nos cromossomos 2, 14 e 18, respectivamente, e que apresentam um alto grau de similaridade com a sequência de CTSP-1 (**figura 1**).

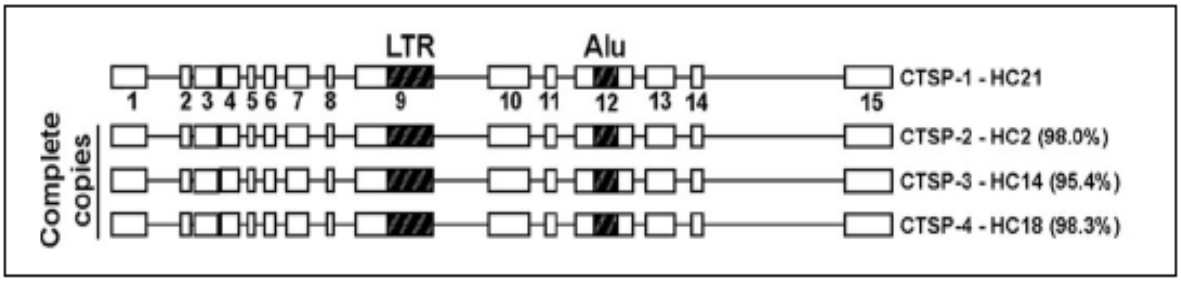

Figura 1 – *Representação esquemática da estrutura exon/intron dos membros da família CTSP.* Os membros da família CTSP estão mostrados com suas localizações cromossômicas e com sua similaridade em relação à sequência genômica de CTSP-1 no cromossomo 21 (PARMIGIANI et al. 2006).

Por RT-PCR, foi visto que o gene CTSP-1 apresenta um padrão de expressão restrito, sendo expresso apenas em testículo dentre 21 tecidos normais, em 47,6% (10/21) das

linhagens celulares tumorais analisadas e em 44,4% (75/169) dos tumores de dez tipos histológicos diferentes. Dentre essas 169 amostras tumorais, CTSP-1 apresentou as maiores porcentagens de expressão em melanoma (59%), seguida por tumores de próstata (58%) e de pulmão (57%). Os padrões de expressão dos outros três membros da família gênica de CTSP-1 também foram analisados por RT-PCR, mas apesar de a expressão desses outros membros ser restrita ao testículo dentre os tecidos normais, ao contrário do que foi observado para CTSP-1, eles não são frequentemente expressos em linhagens celulares tumorais e em tumores (PARMIGIANI et al. 2006).

Conforme está mostrado nos ensaios de imunohistoquímica da **figura 2**, a proteína CTSP-1 endógena é expressa no núcleo e no citoplasma tanto de células germinativas masculinas – com predomínio em espermatócitos e espermátides – quanto de células tumorais (PARMIGIANI et al. 2006).

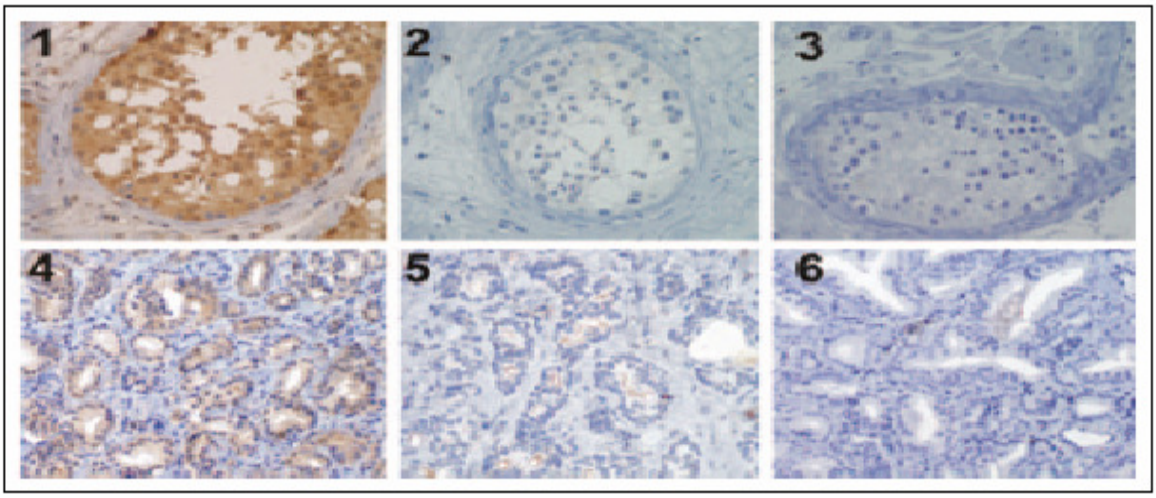

Figura 2 – *Padrão de expressão de CTSP-1 em células germinativas masculinas e em amostras tumoral e normal de próstata*. Os ensaios de imunohistoquímica foram realizados com o anticorpo policlonal anti-CTSP-1 em amostras de: (1) testículo normal, (4) tumor de próstata mRNA-positivo para CTSP-1, (5) tecido prostático normal adjacente ao tumor, e (6) tumor de próstata mRNA-negativo para CTSP-1. Amostras de testículo normal incubadas com (2) soro pré-imune ou com (3) anticorpo anti-CTSP-1 policlonal depletado em imunoglobulinas anti-CTSP-1 foram utilizadas como controles negativos (PARMIGIANI et al. 2006).

Por meio de ensaios de *Western Blot*, foi observado que 10% (14/141) das amostras de plasma de pacientes com diferentes tipos histológicos de tumores apresentaram anticorpos contra a proteína CTSP-1 recombinante. Esses anticorpos foram encontrados com maior frequência em pacientes com tumores de próstata (21%), de tireoide (20%) e de mama (17%).

Em um estudo mais recente, nosso grupo verificou ainda que 25% (37/147) das amostras de plasma de pacientes com câncer de próstata apresentaram anticorpos contra a proteína CTSP-1 recombinante (PARMIGIANI et al. 2008). Conforme está ilustrado na **figura 3**, também foi observado que a presença de anticorpos anti-CTSP-1 no plasma de pacientes com câncer de próstata clinicamente localizado é um fator preditivo independente de recorrência bioquímica da doença após a prostatectomia retropúbica radical. A presença desses anticorpos pode servir como um biomarcador para esse tipo de tumor, especialmente em pacientes com tumores mais indiferenciados e, portanto, mais avançados (alto grau de Gleason).

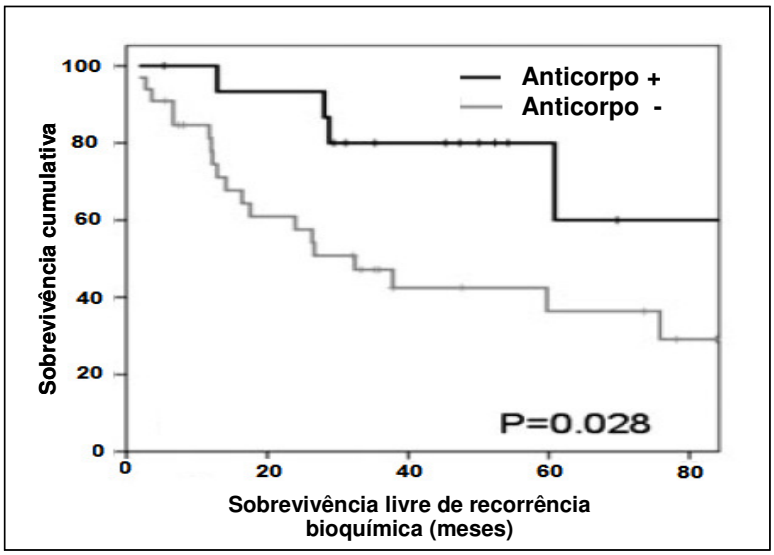

Figura 3 – *Curva de sobrevivência de acordo com a presença de resposta imune humoral anti-CTSP-1 em pacientes que apresentavam tumores de próstata com alto grau de Gleason.* Curva de sobrevivência livre de recorrência bioquímica do câncer de próstata de acordo com a presença (anticorpo +) ou a ausência (anticorpo -) de anticorpos anti-CTSP-1 no soro de pacientes que apresentavam um alto grau de Gleason antes da prostatectomia retropúbica radical (figura adaptada de PARMIGIANI et al. 2008).

Como mencionado anteriormente, a proteína CTSP-1 possui uma alta similaridade com o antígeno de diferenciação NY-BR-1, mais especificamente com a porção N-terminal dessa proteína. As análises das sequências de aminoácidos de NY-BR-1 e de seu parálogo, NY-BR-1.1, revelaram a presença de um sinal de localização nuclear bipartido, de um sítio de ligação ao DNA e de cinco repetições de anquirina *in tandem* (JAGER et al. 2001). As análises da sequência de aminoácidos de CTSP-1, por sua vez, revelaram a existência de dois putativos sinais de localização nuclear e de quatro repetições de anquirina, as quais são responsáveis por mediar interações proteína-proteína (SEDGWICK e SMERDON 1999; MOSAVI et al. 2004).

Em conjunto, esses dados sugerem que o antígeno CT CTSP-1 é um candidato promissor para o desenvolvimento de imunoterapias do câncer. Assim, visando dar continuidade à caracterização de CTSP-1, nesse trabalho, o sistema de duplo-híbrido em leveduras foi utilizado para identificar proteínas parceiras desse antígeno. A partir desse ensaio, foi mostrado que CTSP-1 pode interagir com a proteína CTCF (*CCCTC-binding factor*).

1.3. CTCF (*CCCTC-binding Factor*)

O gene CTCF humano está localizado na região cromossômica 16q22.1 e supõe-se que ele codifique um supressor tumoral uma vez que essa região frequentemente encontra-se deletada em tumores de mama e de próstata (FILIPPOVA et al. 1998).

A proteína CTCF é altamente conservada em eucariotos superiores e é expressa ubiquamente nos tecidos, exceto nos espermatócitos primários. Conforme está ilustrado na **figura 4**, a proteína CTCF pode ser dividida em três regiões distintas: (1) uma porção N-terminal, (2) um domínio central de ligação ao DNA, composto por onze dedos-de-zinco, e (3) uma região C-terminal. Interessantemente, por meio do uso combinatório de seus onze dedos-de-zinco, CTCF pode se ligar a sequências bastante variáveis no DNA e estima-se que

seus sítios-alvo possuam cerca de 11 a 15pb (FILIPPOVA et al. 1996; PHILLIPS e CORCES 2009).

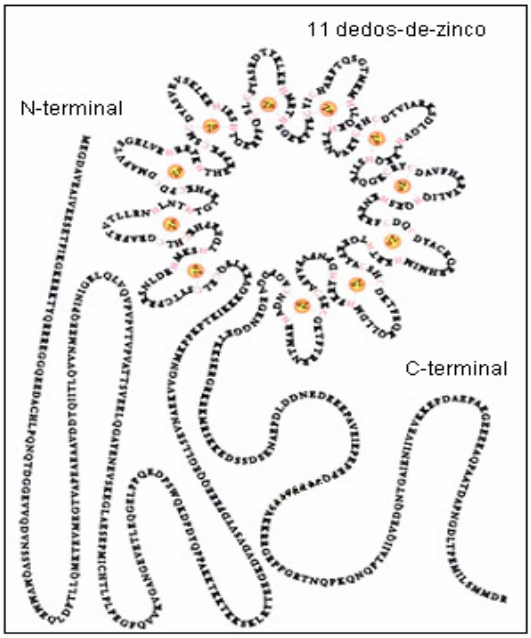

Figura 4 – *Representação esquemática da proteína CTCF.* A estrutura de CTCF pode ser dividida em três regiões: uma N-terminal, um domínio de ligação ao DNA composto por onze dedos-de-zinco, e uma C-terminal (figura adaptada de OHLSSON et al. 2001).

Em 2002, FILIPPOVA et al. encontraram quatro mutações somáticas sem sentido localizadas no domínio de ligação ao DNA de CTCF em tumores de mama, de próstata e de Wilms. Essas mutações não aboliram completamente a capacidade de CTCF de se ligar ao DNA, porém, alteraram o espectro de ligação dessa proteína, de modo que a sua interação com promotores ou insuladores de genes envolvidos com a regulação da proliferação celular (c-Myc, p19/ARF, PIM1, PLK e Igf2) foi severamente reduzida. Interessantemente, a capacidade de CTCF de se ligar a outras regiões no DNA – tais como no insulador do gene beta-globina, no silenciador da lisozima e no promotor de APP – permaneceu inalterada. Esses resultados estão de acordo com as evidências de que CTCF é capaz de utilizar diferentes combinações de seus onze dedos-de-zinco para interagir com diferentes sequências no DNA (FILIPPOVA et al. 1996).

A capacidade de CTCF se ligar a uma grande variedade de sítios-alvo no DNA faz com que ele seja uma proteína multifuncional. As funções tradicionalmente atribuídas a CTCF são as de ativador ou repressor de promotores gênicos de forma contexto-dependente, de bloqueador de *enhancers*, e de elemento insulador, podendo participar ainda dos processos de *imprinting* genômico e de silenciamento do cromossomo X (RECILLAS-TARGA et al. 2006; PHILLIPS e CORCES 2009).

Diversos estudos de escala genômica, realizados com diferentes linhagens celulares, revelaram a existência de aproximadamente 26.000 sítios de ligação de CTCF no genoma humano (BARSKI et al. 2007; KIM et al. 2007; CUDDAPAH et al. 2009). Com base nesses estudos, PHILLIPS e CORCES (2009) sugeriram que CTCF tem uma função primária de mediar as interações do DNA a longas distâncias e de organizar a arquitetura global da cromatina, sendo que todas as funções tradicionalmente atribuídas a CTCF seriam decorrentes desse papel primário.

Um parálogo do gene CTCF, denominado BORIS (*Brother of the Regulator of Imprinted Sites*), codifica uma proteína com as porções N- e C- terminais diferentes das de CTCF, mas com os mesmos onze dedos-de-zinco dessa proteína (região central da proteína esquematizada na **figura 4**) (LOUKINOV et al. 2002). Sendo assim, por possuírem o mesmo domínio de ligação ao DNA, CTCF e BORIS têm a capacidade de se ligar aos mesmos sítios-alvo no DNA. No entanto, esses dois fatores não medeiam os mesmos efeitos porque apresentam regiões N- e C- terminais e modificações pós-traducionais diferentes entre si e associam-se a co-fatores distintos (HONG et al. 2005).

Até a pouco tempo atrás, acreditava-se que BORIS fosse um antígeno CT pelo fato de sua expressão ter sido observada inicialmente apenas em testículo normal e em células tumorais (VATOLIN et al. 2005). No entanto, JONES et al. (2011) demonstraram recentemente que o transcrito e a proteína BORIS são expressos tanto em células humanas normais quanto em

células tumorais, o que revela, portanto, que BORIS não pode ser classificado como um antígeno CT.

Nas células germinativas masculinas, apesar de possuírem o mesmo domínio de ligação ao DNA, CTCF e BORIS não competem entre si pela ligação aos mesmos sítios-alvo, porque apresentam uma expressão mutuamente excludente durante a espermatogênese (**figura 5**). A expressão de BORIS é restrita aos espermatócitos primários e coincide com uma diminuição da expressão de CTCF, com a desmetilação global do genoma e com a indução da expressão de genes CT. Subsequentemente, a expressão de CTCF é restaurada e a de BORIS, reprimida, re-estabelecendo-se as marcas de metilação paternas (LOUKINOV et al. 2002). Sendo assim, acredita-se que CTCF e BORIS possam estar relacionados, respectivamente, a metilases e a desmetilases (KLENOVA et al. 2002), o que constituiria um mecanismo de controle da expressão de diversos genes.

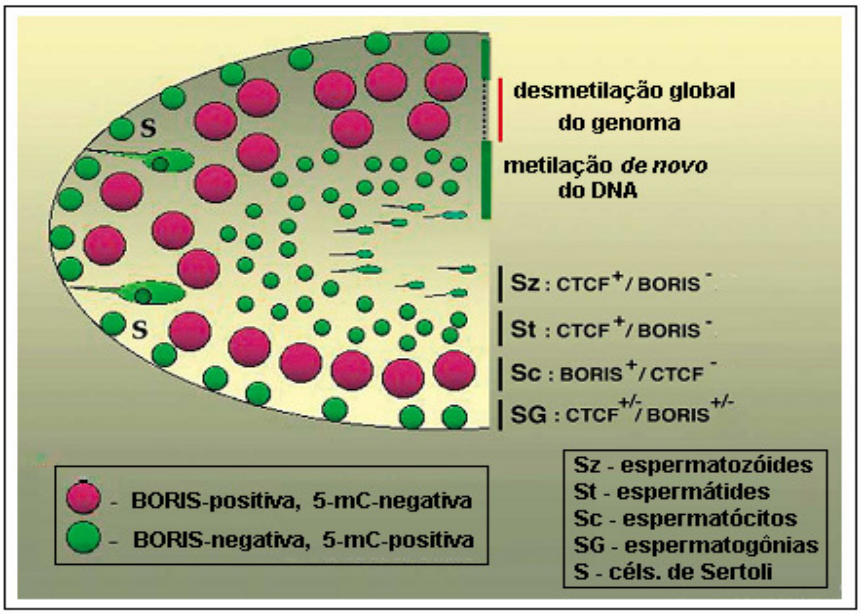

Figura 5 – *Representação esquemática dos perfis de metilação e de expressão de CTCF e de BORIS durante a espermatogênese.* CTCF e BORIS apresentam um padrão de expressão mutuamente excludente nas células germinativas masculinas e a expressão de CTCF coincide com a metilação do DNA enquanto que a expressão de BORIS, com a desmetilação (figura adaptada de LOUKINOV et al. 2002).

1.3.1. CTCF e BORIS no controle da expressão de antígenos CT

Nas células tumorais, CTCF e BORIS possuem características antagônicas: enquanto CTCF possui características de um gene supressor tumoral, BORIS é um suposto oncogene (revisto por KLENOVA et al. 2002). O gene BORIS está localizado na região 20q13, onde frequentemente são encontrados ganhos e/ou amplificações de sequências de DNA em diversos tipos de tumores (revisto por KLENOVA et al. 2002).

Além disso, ao contrário do que ocorre nas células gametogênicas masculinas, nas células tumorais, CTCF e BORIS podem ser co-expressos e, por possuírem os mesmos onze dedos-de-zinco, esses fatores podem competir entre si pela ligação aos mesmos sítios-alvo no DNA. Nesse sentido, trabalhos recentes sugerem que CTCF e BORIS podem competir entre si pela ligação a promotores de genes CT (HONG et al. 2005; VATOLIN et al. 2005; KANG et al. 2007; KOUPRINA et al. 2007; BHAN et al. 2011). Os trabalhos de HONG et al. (2005) e de VATOLIN et al. (2005) demonstraram de maneira mais direta que BORIS é capaz de substituir CTCF na região promotora de pelos menos dois genes codificantes de antígenos CT – MAGE-A1 e NY-ESO-1 – e que a troca de CTCF por BORIS leva à des-repressão desses genes.

No trabalho de HONG et al. (2005), inicialmente, os autores observaram que os perfis de expressão de BORIS (naquela época ainda considerado um antígeno CT) e do CT NY-ESO-1 estavam correlacionados positivamente em diversas linhagens celulares tumorais de pulmão. A partir desse dado, então, o grupo analisou se BORIS poderia contribuir para a des-repressão de NY-ESO-1 nessas linhagens tumorais. Para isso, ensaios de repórter luciferase foram realizados co-transfectando-se o vetor controle ou o vetor contendo uma sequência simplificada do promotor de NY-ESO-1 (sequência contendo o sítio de ligação comum a CTCF e BORIS) com o vetor que induzia o silenciamento ou a superexpressão de BORIS em linhagens celulares tumorais. Os resultados desses ensaios sugeriram que BORIS é capaz de

interagir com o promotor de NY-ESO-1 e, com isso, levar à des-repressão de NY-ESO-1 em células tumorais. Além disso, HONG et al. (2005) confirmaram que BORIS e CTCF podem se ligar a um mesmo sítio-alvo no promotor de NY-ESO-1 e, por meio de ensaios de imunoprecipitação de cromatina, demonstraram ainda que a substituição de CTCF por BORIS no promotor de NY-ESO-1 é capaz de induzir a expressão desse gene CT.

Dando continuidade a esses estudos, KANG et al. (2007) também realizaram ensaios de repórter luciferase, utilizando o vetor contendo a região promotora simplificada de NY-ESO-1 (com o sítio-alvo comum a CTCF e BORIS) clonada *upstream* ao gene da luciferase. Nesses experimentos, foi visto que, em linhagem celular tumoral expressando BORIS, a atividade do promotor de NY-ESO-1 aumentava de forma dose-dependente ao silenciamento de CTCF. Além disso, esse grupo mostrou que o fator de transcrição Sp-1 é capaz de interagir com BORIS na região promotora de NY-ESO-1 e contribuir para a des-repressão deste gene em células tumorais.

Em um outro trabalho, publicado por VATOLIN et al. (2005), foi mostrado que a troca de CTCF por BORIS na região promotora do gene MAGE-A1 pode levar à des-repressão desse CT em fibroblastos. Apesar de a regulação da expressão de MAGE-A1 por CTCF e BORIS ainda ser controversa – ao menos em melanoma e em linhagens celulares de tumor de ovário, conforme foi publicado, respectivamente, por KHOLMANSKIKH et al. (2008) e WOLOSZYNSKA-READ et al. (2011) – especula-se que CTCF e BORIS possam ter um papel importante na regulação da expressão de vários antígenos CT, o que explicaria a expressão coordenada dos mesmos nas células tumorais.

Outros trabalhos também mostraram uma participação específica de BORIS na ativação de genes CT em tumores. Em um desses estudos foi observado que BORIS está implicado na desmetilação coordenada de promotores e na re-ativação epigenética de genes CT em tumores de cabeça e pescoço e de pulmão (SMITH et al. 2009). Além disso, mais recentemente

BHAN et al. (2011) mostraram que a ligação de BORIS aos promotores dos genes CT MAGE-A2, -A3 e -A4 está associada com a ativação transcricional dos mesmos em linhagens celulares tumorais de pulmão.

Pensando na possível participação de CTCF e BORIS no controle da expressão de genes CT, é importante destacar que o nível de expressão da proteína CTCF nas células tumorais não é alterado em relação às células normais. Sendo assim, é provável que existam mecanismos biológicos capazes de inibir a atuação de CTCF nos promotores de genes CT em tumores. Isso possibilitaria a troca de CTCF por BORIS nesses promotores, proporcionando, desse modo, a des-repressão dos genes CT por intermédio de BORIS. Uma possibilidade de inativação de CTCF são as mutações em seu domínio de ligação ao DNA, o que já foi descrito por FILIPPOVA et al. em 2002. Outra possibilidade seria a existência de co-fatores que impedissem a atuação de CTCF. Além disso, ainda não se sabe se BORIS também pode atuar como uma versão dominante-negativa de CTCF (OHLSSON et al. 2010).

1.3.2. CTCF na regulação do ciclo celular

Diversos trabalhos têm demonstrado que além dos genes CT, CTCF pode regular a expressão de diversos outros genes – tais como: APP, BRCA-1, c-MYC, Igf2/H19, p16/INK4a, p19/ARF, p53, RB e TERT – considerados "reguladores-chave" da diferenciação, da senescência replicativa ou da parada do ciclo celular, processos estes frequentemente alterados em células tumorais (revisto por RECILLAS-TARGA et al. 2006; e FIORENTINO e GIORDANO 2011).

Os mecanismos biológicos pelos quais CTCF participa desses processos ainda são pouco conhecidos. Entretanto, é importante destacar que em uma revisão recente da literatura, FIORENTINO e GIORDANO (2011) concluíram que CTCF pode apresentar funções

biológicas divergentes de acordo com o contexto genômico considerado, e ainda que CTCF pode regular a expressão de seus genes-alvo de forma dependente do modelo celular adotado.

Além disso, sabe-se que CTCF pode sofrer uma modificação pós-traducional denominada poli(ADP-ribosil)ação ou PARilação, que consiste na transferência progressiva e sequencial de complexos de ADP-ribose a partir da coenzima NAD^+ para a proteína aceptora (FARRAR et al. 2011). Em 2009, DOCQUIER et al. demonstraram que, de acordo com o grau de parilação, CTCF pode existir sob duas formas: CTCF-130 e CTCF-180, que migram em SDS-PAGE com um peso molecular aparente de 130kDa (pouco PARilada) e de 180kDa (altamente PARilada), respectivamente. Os autores observaram ainda que somente a forma CTCF-180 é detectada em tecido mamário normal, mas que ambas as formas (CTCF-130 e CTCF-180) podem ser detectadas nos tumores de mama. Foi demonstrado que CTCF-180 pode ser associado ao bloqueio do ciclo celular e ao estado de quiescência das células normais de mama, enquanto que o aparecimento de CTCF-130 pode ser associada com a proliferação celular – ou seja, que a transição da forma CTCF-180 para CTCF-130 está correlacionada com o fenótipo tumoral de mama e com a proliferação celular.

Outros trabalhos também mostram fortes evidências de que CTCF pode participar do controle do ciclo celular e que a sua superexpressão pode levar à inibição do crescimento tumoral por apoptose ou por mecanismos moleculares ainda desconhecidos. Na linhagem de linfoma WEHI 231B, por exemplo, observou-se que a superexpressão de CTCF está associada com a inibição do crescimento celular e com a indução de apoptose. Foi proposto que esse efeito seja mediado pela repressão do oncogene c-Myc e pela ativação dos genes supressores de tumor p19/ARF, p21, p27 e p53, controladas por CTCF (QI et al. 2003).

Outras evidências de que CTCF pode participar do controle do ciclo celular surgiram de alguns trabalhos nos quais foi encontrada uma grande dificuldade de superexpressão dessa proteína em diversas linhagens celulares. RASKO et al. (2001), por exemplo, relataram a

dificuldade de superexpressar CTCF estavelmente em várias linhagens celulares tumorais e demonstraram que a expressão ectópica dessa proteína diminui a capacidade clonogênica das células devido a um forte bloqueio da progressão do ciclo celular. Nesse caso, a morte celular por apoptose não foi detectada e foi proposto que esse bloqueio tenha sido, ao menos parcialmente, decorrente da repressão do oncogene c-Myc controlada por CTCF. TORRANO et al. (2005) também observaram que a inibição transitória de CTCF leva ao aumento da proliferação da linhagem eritroleucêmica K562 enquanto que a superexpressão de CTCF leva a um retardamento da proliferação dessas células bem como a uma diminuição da capacidade clonogênica das mesmas por um mecanismo molecular desconhecido e diferente da apoptose.

Assim, em conjunto, esses trabalhos indicam que CTCF exerce um papel biológico importante na regulação do ciclo celular por mecanismos moleculares diversos e que podem variar de forma dependente da linhagem celular adotada como modelo de estudo (revisto por FIORENTINO e GIORDANO 2011).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Caracterizar o papel de CTSP-1 em células tumorais por meio da identificação inicial de proteínas que são expressas em tumores de próstata e que são capazes de interagir com esse antígeno.

2.2. Objetivos específicos

- Validar a interação entre as proteínas CTSP-1 e CTCF, identificada no sistema duplo-híbrido em leveduras, pelos ensaios de interação cruzada e de *pulldown*.
- Superexpressar CTSP-1/HA na linhagem celular de adenocarcinoma de pulmão H1299 e gerar clones superexpressando a proteína de forma estável.
- Avaliar a localização subcelular das proteínas CTSP-1/HA exógena e CTCF endógena nos clones de H1299.
- Analisar a existência de uma correlação entre a co-expressão de CTSP-1 e BORIS com o perfil de expressão de transcritos CT em linhagens celulares tumorais.
- Verificar o impacto da superexpressão de CTSP-1/HA sobre a atividade do promotor simplificado do gene CT NY-ESO-1 utilizando os clones de H1299.
- Avaliar o impacto da superexpressão de CTSP-1/HA sobre os níveis endógenos de expressão do transcrito e da proteína NY-ESO-1 nos clones de H1299.
- Analisar o efeito da superexpressão de CTSP-1/HA, 48h após a transfecção ou de forma estável, sobre o perfil do ciclo celular e sobre a capacidade clonogênica de H1299.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Sistema duplo-híbrido em leveduras

O sistema duplo-híbrido em leveduras foi utilizado para avaliar interações entre a proteína CTSP-1 e outras proteínas expressas em tumores de próstata.

Essa metodologia baseia-se em estudos sobre as propriedades dos fatores de transcrição eucarióticos. Observou-se que esses fatores são compostos por dois domínios independentes: [1] um domínio de ligação ao DNA (DL) – que interage com sequências específicas (operadores ou UAS: *Upstream Activating Sequence*) na região promotora do gene repórter – e [2] um domínio de ativação da transcrição (DA) – que induz o complexo da RNA polimerase II a iniciar a transcrição do repórter. Esses domínios podem ser separados entre si. No entanto, para que o fator de transcrição apresente atividade, é necessário que esses domínios (DL e DA) estejam próximos entre si na região promotora do gene repórter. Com base nisso, foi desenvolvida a metodologia de duplo-híbrido em leveduras para o estudo de interações proteína-proteína, conforme ilustrado na **figura 6**.

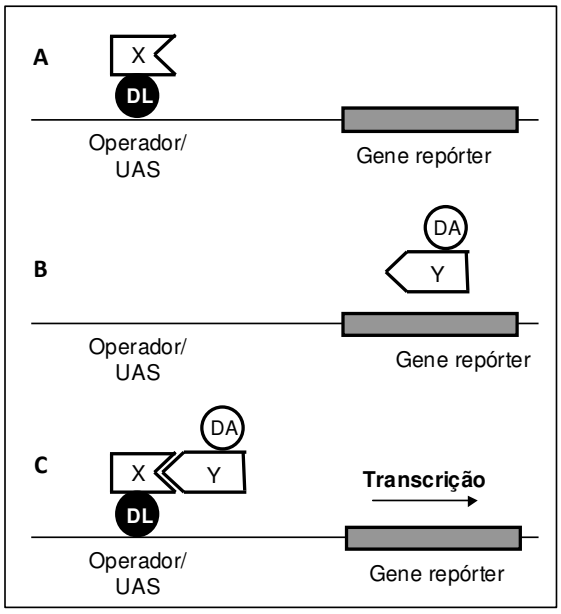

Figura 6 – *Sistema duplo-híbrido em leveduras.* **A** – uma proteína híbrida constituída por um domínio de ligação ao DNA (DL) e uma proteína X (isca) pode se ligar ao DNA, mas é incapaz de ativar a transcrição do repórter sem um domínio de ativação (DA). **B** – uma proteína híbrida formada por um domínio de ativação (DA) em fusão com um polipeptídeo Y (presa) não pode ativar a transcrição por não conseguir se ligar à sequência específica no DNA, operador ou UAS (*Upstream Activating Sequence*). **C** – quando ambas as proteínas híbridas são produzidas em uma levedura, se X e Y interagem entre si, DL e DA são aproximados e, assim, o gene repórter é transcrito (figura adaptada de FIELDS e STERNGLANZ 1994).

Nesse trabalho, foram utilizados vetores e cepas de leveduras do sistema *DupLex-A–Yeast Two-Hybrid System* (OriGene) e uma biblioteca de cDNAs de tumores de próstata, obtida comercialmente (OriGene) e preparada a partir de um *pool* de mRNAs de tumores prostáticos obtidos de oito indivíduos adultos.

Como descrito em detalhes a seguir, a isca (CTSP-1) foi clonada no vetor pGilda (com gene HIS3 para seleção em leveduras) e transformada em leveduras da cepa RFY206 contendo o vetor pSH18-34 (com o gene repórter lacZ e o gene URA3 para seleção em leveduras). Já os cDNAs da biblioteca clonados no vetor pJG4-5 (com o gene TRP1 para seleção em leveduras) foram transformados em leveduras da cepa EGY48, que apresenta o gene LEU2 integrado em seu genoma. È importante ressaltar que as proteínas híbridas (isca + DL ou presa + DA) deveriam ser expressas somente na presença de galactose e na ausência de glicose, uma vez que os vetores pGilda (da isca) e pJG4-5 (da biblioteca) possuem promotores GAL1. Leveduras que apresentaram interações proteína-proteína passaram a expressar os genes repórteres lacZ e LEU2 e a partir da análise dos fenótipos dos clones de leveduras em meios seletivos, os clones duplo-positivos ($lacZ^+$ e $LEU2^+$) foram selecionados. Os vetores pJG4-5/cDNA da biblioteca foram extraídos das leveduras selecionadas e sequenciados, permitindo, assim, a identificação da proteína que potencialmente interage com a isca.

3.1.1. Transformação da biblioteca em EGY48

Para a transformação das leveduras EGY48 com os vetores pJG4-5/cDNA da biblioteca, cinco colônias foram pré-inoculadas em 30ml de meio YPD e incubadas a 250rpm e 30°C por cerca de 16h até atingirem a $DO_{600nm} > 1,5$. Foram feitas triplicatas e cada uma das culturas foi transferida para 300ml de YPD. Os inóculos foram incubados a 250rpm e 30°C até a $DO_{600nm} = 0,5 \pm 0,1$. Após a centrifugação, os *pellets* foram ressuspendidos em um volume final de 50ml de água deionizada estéril e centrifugados novamente. O *pellet* celular foi

ressuspendido em 6ml de TE (Tris-EDTA)/acetato de lítio estéril (1x TE; 0,1M acetato de lítio). Foram realizadas 26 transformações e, para cada uma delas, quatro microlitros da biblioteca (0,5µg/µl) foram misturados com 20µl de 10mg/ml DNA carreador pré-incubado a 100°C por 20min, e com 200µl da suspensão de leveduras competentes. A cada tubo, foi adicionado 1,2ml de solução PEG/acetato de lítio (40% PEG; 0,1M acetato de lítio; 1x TE). As amostras foram homogeneizadas e incubadas a 30°C por 30min. Foram adicionados 140µl de dimetilsulfóxido (DMSO) a cada tubo e a solução foi homogeneizada delicadamente. Os tubos foram incubados a 42°C por 15min e, em seguida, em gelo por 2min. O volume final das transformações foi estimado e, em seguida, quatro diluições foram feitas: duas de 10 vezes e duas de 20 vezes, em um volume final de 100µl de 1x TE estéril. Cada uma das titulações foi plaqueada em SD(glicose) -Trp. O volume restante de leveduras foi plaqueado em 35 placas de 20x20cm^2 contendo SD(glicose) -Trp. Todas as placas foram incubadas a 30°C por aproximadamente 40h. As colônias foram raspadas, transferidas para água deionizada estéril e centrifugadas. Por fim, o *pellet* foi ressuspendido em um volume de solução de glicerol (65% glicerol; 0,1M $MgSO_4$; 25mM Tris pH 8,0) igual ao volume do *pellet* e, então, armazenado a -70°C. A partir das quatro titulações feitas, a média de unidades formadoras de colônias (cfu) e a eficiência da transformação foram calculadas.

3.1.2. Clonagem de CTSP-1 em pGilda

A maior fase aberta de leitura do gene CTSP-1 anteriormente clonada em nosso laboratório foi re-amplificada a partir de midiprep, utilizando-se dois *primer*s específicos: um contendo o sítio de restrição para a enzima *EcoRI* e o outro, para *XhoI*. Os *primers* utilizados foram o CTSP-1F (5' CGGAATTCATGAAGAAGACGACAATG 3') e o CTSP-1R (5' CCGCTCGAGCTATTCGTCAGGTGTTCT 3'). Um microlitro da midiprep diluída duzentas mil vezes foi utilizado como molde em uma reação de amplificação com volume

final de 25µl, contendo: 0,2µl *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen); 1x tampão da enzima; 1mM $MgSO_4$; 0,1mM dNTP; e 0,4µM de cada *primer*. O programa de amplificação foi: desnaturação do DNA a 94°C por 4min; 30 ciclos de 94°C por 1min, 58°C por 1min e 72°C por 1min; e extensão final a 72°C por 6min. O inserto amplificado e o vetor pGilda foram digeridos sequencialmente com as enzimas *EcoRI* e *XhoI* (New England Biolabs), purificados do gel de agarose utilizando-se o *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) e, por fim, foi feita a reação de ligação entre o inserto e o vetor utilizando-se a enzima T4 DNA ligase (New England Biolabs), conforme as instruções do fabricante. Dois microlitros dos produtos da ligação foram transformados em bactérias *E. coli* da cepa DH10B. Os clones foram analisados por reações de amplificação. Para isso, cada colônia foi utilizada como molde em uma reação com volume final de 12,5µl, contendo 0,15µl de *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen); 1x tampão da enzima; 1,5mM $MgCl_2$; 0,2mM dNTP e 0,3µM de cada *primer*. Os *primers* utilizados foram o pGildaF (5' CGTCAGCAGAGCTTCACC 3') e o pGildaR (5'ATCATAAGAAATTCGCCCGG 3'), que flanqueiam o sítio de clonagem do vetor. O programa de amplificação foi: desnaturação do DNA a 95°C por 2min; 27 ciclos de 95°C por 45s, 55°C por 45s e 72°C por 1min; e extensão final a 72°C por 10min. Os produtos de PCR foram analisados em gel de 1% agarose corado com brometo de etídeo. Em seguida, os clones foram inoculados em meio LB-ampicilina (0,1mg/ml) a 37°C por cerca de 16h e os DNAs plasmideais foram extraídos das bactérias utilizando-se o kit *Wizard Mini Preps DNA Purification System* (Promega). Por fim, as minipreps foram sequenciadas no sequenciador automático *ABI Prism 3100 DNA Sequencer* (Perkin Elmer) utilizando-se o *primer* pGildaF.

3.1.3. Transformação de RFY206 com pGilda/CTSP-1

Cerca de dez colônias de leveduras RFY206 pré-transformadas com o vetor pSH18-34 foram crescidas em placas contendo meio SD(glicose) -Ura e incubadas em 10ml desse meio

a 30°C por cerca de 16h. A densidade óptica foi ajustada para DO_{600} = 2,0 em 100ml desse meio e a cultura foi incubada a 30°C até a DO_{600} = 0,5 ± 0,1. A cultura foi centrifugada e *pellet* celular, lavado uma vez com água estéril e, depois, ressuspendido em um volume final de 0,5ml de TE/acetato de lítio estéril (1x TE; 0,1M acetato de lítio). Em seguida, para a transformação, foram misturados 0,1µg da miniprep de pGilda/CTSP-1 com 10µl de 10mg/ml DNA carreador pré-incubado a 100°C por 20min e com 100µl da suspensão de leveduras competentes. Também foi feito um controle negativo da transformação, onde não se adicionou a miniprep de pGilda/CTSP-1 às leveduras. As leveduras foram vortexadas, homogeneizadas com 600µl de PEG/acetato de lítio (40% PEG; 0,1M acetato de lítio; 1x TE) e incubadas por 30min a 30°C. Em seguida, foram adicionados 70µl de dimetilsulfóxido (DMSO) às leveduras controle e experimental e foi feito o choque térmico, incubando-se as leveduras a 42°C por 15min e, em seguida, em gelo por 2min. As leveduras foram centrifugadas e os *pellets*, experimental e controle, ressuspedidos em 100µl de 1x TE e plaqueados em meio SD(glicose) -Ura -His para a seleção dos transformantes. As placas foram incubadas a 30°C por cinco dias.

3.1.4. Indução da expressão da isca

Colônias isoladas de RFY206 contendo pGilda/CTSP-1 e pGilda sem isca foram inoculadas separadamente em 10ml de meio SD(glicose) -Ura -His e incubadas a 30°C por 16h. Em seguida, as DO_{600nm} foram ajustadas para 1,0.

Seis mililitros de cada uma das culturas foram centrifugados e os *pellets* celulares, lavados duas vezes com 3ml de meio seletivo SD(galactose-rafinose) -Ura -His. Por fim, os *pellets* foram ressuspendidos em 3ml do meio seletivo e incubados a 200rpm e 30°C por 6h. O mesmo procedimento de indução foi realizado por 20h. Culturas não induzidas também foram feitas e crescidas nas mesmas condições, por 6h e 20h, em meio com glicose. Após o

tempo de incubação, as culturas foram centrifugadas e o *pellet*, ressuspendido no volume residual. As DO_{600nm} das amostras foram medidas, as amostras foram centrifugadas, e para a DO_{600nm} = 4, sessenta microlitros de tampão de amostra foram adicionados às leveduras. As amostras foram fervidas e submetidas a SDS-PAGE para a realização do *Western Blot* conforme descrito a seguir.

3.1.5. *Western Blot*

As amostras foram fracionadas em SDS-PAGE 12% acrilamida e depois transferidas para membrana de nitrocelulose (Armersham), a qual foi bloqueada com 5% leite PBST (137mM NaCl; 2,7mM KCl; 10mM Na_2HPO_4; 1,8mM KH_2PO_4; 0,1% Tween) durante 1h à temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo anti-LexA feito em coelho (Invitrogen) diluído 1:7000 em 5% leite PBST durante 2h à temperatura ambiente. Após três lavagens, de 10min cada, com o PBST, a incubação ocorreu com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado a HRP (Amersham) diluído 1:3000 em PBST por 1h à temperatura ambiente. Por fim, após três lavagens, de 10min cada, com PBST, foi realizada a reação utilizando-se a solução *ECL Western Blotting Analysis System* (Amersham), sendo as membranas expostas a filmes radiográficos *Hyperfilm ECL* (Amersham).

3.1.6. Teste de auto-ativação da isca

Duas placas, uma com o meio SD(glicose) -Ura -His e outra com o meio SD(galactose/rafinose) -Ura -His, ambas contendo 80µg/ml X-Gal e 1x tampão BU pH 7,0 (7mg/ml $Na_2HPO_4.7H_2O$; 3mg/ml NaH_2PO_4), foram utilizadas para repassar colônias isoladas da levedura RFY206 contendo os seguintes vetores: [1] pSH18-34 + pSH17-4 (controle positivo); [2] pSH18-34 + pGilda/CTSP-1 (isca); [3] pSH18-34 + pRFHM1 (controle

negativo) ; [4] pSH18-34 + pGilda sem isca. As placas foram incubadas a 30°C durante 3 dias e a coloração das colônias foi monitorada.

4.1.7. Varredura da biblioteca com a isca

Colônias isoladas de leveduras da cepa RFY206 transformada com os vetores pSH18-34 e pGilda/CTSP-1 foram inoculadas para 20ml de meio SD(glicose) -Ura -His e incubadas a 240rpm e 30°C por cerca de 16h. A cultura foi diluída para a DO_{600nm} = 0,2 em 40ml do meio seletivo e, incubada a 30°C e 230rpm até a DO_{600nm} = 1,0. Trinta mililitros dessa cultura foram centrifugados e o *pellet* de leveduras foi ressuspendido em água deionizada estéril em um volume final de 1ml. Nesse momento, a concentração celular era de aproximadamente 10^9 células/ml.

Um volume correspondente a 2,3 x 10^8 cfu das leveduras RFY206 contendo a isca LexA/CTSP-1 foram misturados a um volume correspondente a 1,15 x 10^8 cfu da leveduras EGY48 contendo os vetores pJG4-5/cDNA da biblioteca. A mesma quantidade de leveduras RFY206 com a isca foi misturada com um controle negativo (leveduras EGY48 contendo o vetor pJG4-5 sem inserto). As misturas foram centrifugadas, ressuspendidas em 100µl de meio não-seletivo YPD e plaqueadas em placas contendo YPD-ágar. As placas foram incubadas a 30°C por 15h. As leveduras foram raspadas da placa utilizando-se 1ml de meio líquido indutor da expressão proteica, SD(galactose/rafinose) -His -Ura -Trp +Leu, e as células foram transferidas para 100ml do mesmo meio. A indução da expressão das proteínas híbridas isca e presas foi feita a 240rpm e 30°C durante 6h. Trinta mililitros das culturas foram centrifugados e os *pellets* celulares, ressuspendidos em 30ml de água deionizada estéril e novamente centrifugados, sendo, por fim, ressuspendidos em água deionizada estéril para um volume final de 5ml. As DO_{600nm} foram determinadas e as suspensões de leveduras (experimental e controle) foram diluídas seriadamente em água deionizada estéril desde uma concentração inicial de 10^8 células/ml até uma concentração final de 10^2 células/ml. A duas

primeiras diluições das leveduras experimentais foram plaqueadas, cada uma, em 20 placas SD(galactose/rafinose) His -Ura -Trp -Leu e as demais diluições das leveduras experimentais e controle foram plaqueadas em placas contendo esse mesmo meio. Foram utilizados 100µl de cada diluição. A atividade do gene repórter LEU2 foi determinada pelo monitoramento do crescimento das leveduras nesse meio seletivo ao longo de 4 dias.

3.1.8. Identificação dos clones duplo-positivos

Todas as colônias diploides que cresceram em meio seletivo indutor [SD(galactose/rafinose) -Ura -His -Trp -Leu], ou seja, todos os clones $LEU2^+$ que tinham a possibilidade de apresentar interações entre a isca e alguma presa da biblioteca, foram repassados para placas SD(glicose) -Ura -His -Trp em posições pré-determinadas. Após 40h, utilizando-se um carimbo de veludo, essas leveduras foram repassadas para as seguintes placas: **(a)** SD(glicose) -Ura -His -Trp -Leu; **(b)** SD(galactose/rafinose) -Ura -His -Trp -Leu; **(c)** SD(glicose) -Ura -His -Trp +X-gal; **(d)** SD(galactose/rafinose) -Ura -His -Trp +X-gal (80µg/ml). As placas foram incubadas a 30°C durante 4 dias e o crescimento e a coloração das colônias foram sendo monitorados ao longo desse tempo. Como controle negativo, foram utilizadas leveduras diploides contendo os vetores pSH18-34 + pJG4-5 + pRFHM-1 e como controle positivo, diploides contendo pSH18-34 + pJG4-5 + pSH17-4.

3.1.9. PCR dos clones duplo-positivos

Os clones de leveduras duplo-positivos ($lacZ^+$ e $LEU2^+$) foram transferidos para 50µl de água deionizada e aquecidos a 95°C por 15min para causar a lise celular. Cinco microlitros desses lisados foram utilizados como molde em reações de amplificação em um volume final de 25µl, contendo 0,3µl Taq DNA polimerase (Invitrogen); 1x tampão da enzima; 1,5mM

$MgCl_2$; 0,2mM dNTP; e 0,4µM de cada *primer*. Os *primers* utilizados na reação foram o pJG4-5Fus F (5' TCATGAAATTGAAGCGGATG 3') e o pJG4-5 R (5' GCCGACAACCTTGATTG 3'), que flanqueiam o sítio múltiplo de clonagem do vetor pJG4-5. O programa de amplificação foi: desnaturação a 95°C por 4min; 30 ciclos de 95°C por 1min, 50°C por 1min e 72°C por 3min; e extensão final a 72°C por 10min. Os produtos de PCR foram analisados em gel de 1% agarose corado com brometo de etídeo.

3.1.10. Digestão dos produtos de PCR com *HaeIII* e *HinfI*

Os clones que amplificaram foram re-amplificados para obtenção de massa em um volume total de 50µl de reação, analisados em gel de 1% agarose e, então, digeridos com as enzimas de restrição *HaeIII* e *HinfI*. As digestões foram feitas a 37°C por 2h, utilizando-se cerca de 8,6µl dos produtos de PCR; 0,2µl de *HaeIII* (New England Biolabs); 0,2µl de *HinfI* (New England Biolabs); e 1x NEBuffer 2 em uma reação com volume final de 10µl. Os padrões de digestão foram analisados em gel de 1% agarose. Os produtos de PCR dos clones de leveduras que apresentaram insertos com diferentes padrões de restrição foram purificados do gel utilizando-se o *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen).

3.1.11. Extração dos vetores pJG4-5/cDNA dos clones duplo-positivos

Cada colônia de leveduras diploides foi inoculada em 1,5ml de meio SD(glicose) -Trp a 30°C por cerca de 16h. As culturas foram centrifugadas e a cada um dos *pellets* celulares foram adicionados 200µl de solução de lise (2% Triton X-100; 1% SDS; 100mM NaCl; 10mM Tris-Cl pH 8,0; 1mM Na_2EDTA), 200µl de água deionizada e de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e 300mg de *glass beads*. Após serem vortexadas por 2min, as amostras foram centrifugadas a 13200rpm por 5min e as fases

aquosas superiores foram coletadas. Em seguida, foi adicionado isopropanol às amostras em volume igual ao da fase coletada. Após nova centrifugação, os sobrenadantes foram descartados, um mililitro de 70% etanol foi adicionado às amostras e essas foram centrifugadas. Os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* plasmideais, ressuspendidos em 40µl de água deionizada. As amostras foram analisadas em gel de 1% agarose corado com brometo de etídeo.

Um microlitro de cada miniprep foi utilizado como molde em reações de amplificação, conforme descrito no **item 3.1.9**. Os produtos de PCR foram analisados em gel de 1% agarose e posteriormente purificados utilizando-se o *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen). As amostras foram sequenciadas e o *primer* utilizado foi o pJG4-5Fus F.

De posse das sequências, foi verificado se os insertos foram clonados em fase com o domínio B42 no vetor pJG4-5, analisando-se a presença do sítio de restrição da enzima *EcoRI* (utilizado para a clonagem dos insertos). Em seguida, a identidade das sequências foi analisada utilizando-se o programa *BLASTN* (do inglês *Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide*).

A partir de dados da literatura que demonstravam uma participação das proteínas candidatas em processos biológicos importantes para as células tumorais – tais como proliferação, migração e apoptose – e da disponibilidade de anticorpos comerciais específicos contra essas proteínas, selecionamos trinta e uma delas para as validações de sua interação com CTSP-1 em leveduras pelo método de interação cruzada, descrito a seguir.

3.1.12. Sequenciamento

Os produtos de PCR (**item 3.1.9**) e as minipreps de pJG4-5/cDNA (**item 3.1.11**) referentes aos clones duplo-positivos foram sequenciados utilizando-se o *primer* pJG4-5Fus F e o sequenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems).

3.2. Ensaio de interação cruzada

As leveduras diploides utilizadas nas minipreps continham três vetores diferentes – pSH18-34, pGilda/CTSP-1 e pJG4-5/cDNA da biblioteca – todos eles apresentando a mesma marca de seleção em bactérias (gene de resistência à ampicilina). Como o objetivo era recuperar apenas os vetores pJG4-5/cDNAs candidatos, foram realizadas as transformações das minipreps obtidas em bactérias *E. coli;* e, em seguida, para identificar as colônias transformantes que carregavam o vetor de interesse, foram feitas reações de amplificação utilizando *primers* específicos para o mesmo.

Portanto, inicialmente vinte microlitros de bactérias *E. coli* eletrocompetentes da cepa DH10B foram eletroporadas com 2µl de cada uma das minipreps de leveduras. Um mililitro de meio LB foi adicionado às bactérias e estas foram incubadas a 37°C por 1h. As bactérias foram plaqueadas em meio LB-ágar contendo 0,1mg/ml de ampicilina e incubadas a 37°C por 16h. Em seguida, utilizando-se *primers* flanqueando o sítio múltiplo de clonagem do vetor pJG4-5, foi realizada a PCR de colônias conforme descrito acima. Os produtos de PCR foram analisados em gel de 1% agarose a fim de se identificar os clones que apresentavam os insertos de interesse e estes clones foram inoculados em meio LB-ágar contendo 0,1mg/ml de ampicilina por 16h. Os DNAs plasmideais foram extraídos das bactérias utilizando-se o kit *Wizard Mini Preps DNA Purification System* (Promega). As minipreps foram sequenciadas para a confirmação da identidade dos clones candidatos.

Posteriormente, foi feito o ensaio de interação cruzada (**figura 7**) para a confirmação dos fenótipos, mas, para isso, primeiro foram feitas as transformações de cada vetor pJG4-5/cDNA de interesse em novas leveduras EGY48, do mesmo modo descrito no **item 3.1.3**. Nesse experimento, também foram utilizadas leveduras transformadas com determinados vetores para a geração dos diploides controles: cepa RFY206 transformada com **(a)** pSH18-34 + pGilda ou **(b)** pSH18-34 + pBait; e cepa EGY48 transformada com **(a')** pJG4-5 ou **(b')**

pTarget. O acasalamento **(a)** + **(a')** serviu como controle negativo e o acasalamento **(b)** + **(b')**, como controle positivo do experimento.

Assim, para o ensaio de interação cruzada, inicialmente as leveduras RFY206 dos controles e as transformadas com pSH18-34 + pGilda/CTSP-1 (provenientes de um mesmo clone) foram plaqueadas em linhas horizontais em meio SD(glicose) -Ura -His. Por sua vez, as leveduras EGY48 dos controles e as transformadas com pJG4-5/cDNA do candidato (provenientes de uma mesmo clone) foram plaqueadas em linhas verticais em meio SD (glicose) -Trp (**figura 7**). Essas placas foram incubadas a 30°C por cerca de 3 dias.

As leveduras RFY206 e EGY48 foram transferidas para uma mesma placa contendo meio de cultura YPD, não seletivo, utilizando-se carimbos de veludo (**figura 7**). Como os plaqueamentos dessas cepas foram feitos de forma cruzada, o acasalamento e, portanto, a formação de leveduras diploides, ocorreram somente nas intersecções das linhas horizontais e verticais. A placa foi incubada a 30°C por cerca de 2 dias e, em seguida as leveduras foram transferidas para quatro tipos de meios de cultura seletivos (**figura 7**). Como os vetores pJG4-5 e pGilda apresentavam um promotor induzível por galactose, somente na presença desse açúcar e na ausência de glicose é que as proteínas isca e presas híbridas deveriam ser expressas.

① SD(galactose/rafinose) -Ura -His -Trp contendo X-Gal;

② SD(glicose) -Ura -His -Trp contendo X-Gal;

③ SD(galactose/rafinose) -Ura -His -Trp -Leu;

④ SD(glicose) -Ura -His -Trp -Leu.

Essas placas foram incubadas a 30°C durante 3 a 4 dias e, ao longo desse período, o crescimento das células em meio sem leucina e a coloração das mesmas em meio com X-Gal foram monitorados. Foram considerados clones duplo-positivos ($lacZ^+$ e $LEU2^+$) aqueles que ficaram azuis na placa ① e não na placa ② ($lacZ^+$) e que cresceram na placa ③ e não cresceram na placa ④ ($LEU2^+$) (**figura 7**).

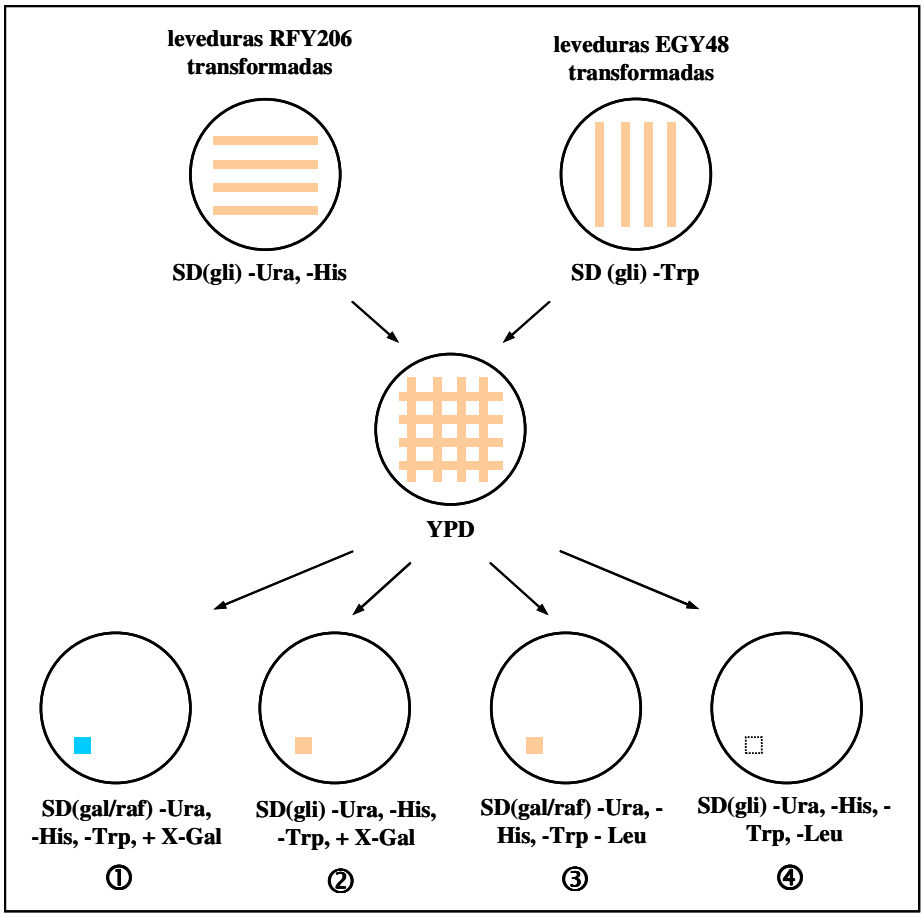

Figura 7 – *Esquema do ensaio de interação cruzada.* Foram feitos acasalamentos entre as leveduras das cepas RFY206 e EGY48 transformadas com os vetores de interesse e a análise posterior dos fenótipos. Nas quatro últimas placas, está o exemplo de um clone considerado duplo positivo ($lacZ^+$ e $LEU2^+$) pela análise de seus fenótipos.

3.3. *GST-pulldown*

3.3.1. Clonagem de CTSP-1 em pGEX-2T

A maior fase aberta de leitura do gene CTSP-1 foi clonada em vetor de expressão pGEX-2T (GE Healthcare). Para isso, o inserto foi amplificado utilizando-se os *primers* SPCLONE-F (5' CGAGATCTATGAAGAAGACGACAATG 3') e SPCLONE-R (5' CGGAATTCCTATTCGTCAGGTGTTCT 3'). O inserto foi purificado do gel de agarose e digerido com as enzimas de restrição *BglII* e *EcoRI*. O vetor foi digerido com as enzimas *BamHI* e *EcoRI*, uma vez que a extremidade resultante da digestão com *BglII* é compatível

com a gerada pela digestão com *BamHI*. As digestões foram feitas sequencialmente, realizando-se entre as mesmas, a extração do DNA com fenol/clorofórmio e a precipitação com etanol. Após as digestões, foram feitas a ligação, a transformação de bactérias e a seleção dos clones positivos, utilizando-se os *primers* pGEX2T-F (5' TCCAGCAAGTATATAGCATG 3') e pGEX2T-R (5' ACAAGCTGTGACCGTCTC 3'). Os mesmos *primers* foram utilizados nas reações de sequenciamento de pGEX-2T/CTSP-1.

3.3.2. Ensaio de *GST-pulldown*

Após a indução da expressão das proteínas GST e CTSP-1/GST recombinante em sistema bacteriano, foi feita uma análise da solubilidade das proteínas e, em seguida, as frações solúveis dos lisados bacterianos foram utilizadas nos ensaios de *GST-pulldown*. Quatro incubações diferentes foram realizadas nesse ensaio: (a) 30µl de *beads* + lisado bacteriano com CTSP-1/GST; (b) 40µl de *beads* + lisado bacteriano com CTSP-1/GST; (c) 30µl de *beads* + lisado bacteriano com GST e (d) 30µl de *beads*. Inicialmente, para cada condição, células da linhagem celular A2058 (melanoma) – que sabidamente expressam as proteínas candidatas para as quais havia anticorpos comerciais disponíveis para a análise de expressão por *Western Blot* – foram cultivadas até atingirem uma confluência de 60-70%. Para a preparação do lisado celular, as células foram lavadas duas vezes com PBS pH 7,3 (137mM NaCl; 2,7mM KCl; 10mM Na_2HPO_4; 1,8mM KH_2PO_4). Em seguida, as células foram raspadas das placas em PBS pH 7,3 e centrifugadas. Os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* celulares, ressuspedidos em 1ml de PBS pH 7,3. Após centrifugação, as células de cada condição foram ressuspendidas em 1ml de tampão de lise TLB [50mM Tris-HCl pH 7,4; 150mM NaCl; 1,5mM $MgCl_2$; 5mM EDTA; 10% glicerol; 1% Triton X-100; 1mM DTT; e 1x *Protease Inhibitor* (Amersham Biosciences)] e incubadas durante 30min a 4°C sob leve

agitação. Após esse tempo, os lisados celulares foram centrifugados a 14000rpm por 40min a 4°C. Os sobrenadantes foram reservados a 4°C.

Trinta microlitros de *Glutathione-Sepharose beads* (Amersham Pharmacia Biotech), foram lavados com 1ml de tampão de ligação (0,1mM DTT; 25mM NaCl; 20mM Tris-HCl pH 7,4) e centrifugados. O tampão foi removido e, em seguida, os *beads* foram incubados com 1ml do extrato bruto de bactérias expressando CTSP-1/GST ou GST durante 1h a 4°C. Para o controle dos *beads* sozinhos, estes foram incubados com 1ml de tampão de lise bacteriana. Após o tempo de incubação, os *beads* foram lavados três vezes com 1ml de tampão de ligação.

Posteriormente, os *beads* de cada condição foram incubados com os extratos proteicos de A2058 durante 2h a 4°C. Após esse tempo, os tubos foram centrifugados a 13000xg e 4°C por 1min e os *beads* foram lavados cinco vezes com 1ml de tampão de lavagem (50mM Tris-HCl pH 7,4; 150mM NaCl; 1,5mM $MgCl_2$; 5mM EDTA; 10% glicerol; 0,1% Triton X-100; e 1mM DTT) e, em seguida, mais duas vezes com 1ml de tampão de lavagem contendo 0,01% SDS. Após a máxima remoção do tampão, os *beads* foram vortexados 1min com 25µl de tampão de amostra. Os tubos foram centrifugados a 16000xg durante 7min e, por fim, os sobrenadantes foram separados e reservados.

3.3.3. *Western Blot*

O *Western Blot* foi realizado de modo semelhante ao descrito no **item 3.1.5**, sendo utilizado um gel de 6% acrilamida. A membrana foi incubada com o anticorpo primário anti-CTCF feito em coelho (Upstate) diluído 1:5000 em 5% leite PBST por aproximadamente 16h a 4°C. Como controle positivo da reação, cerca de setenta microgramas do extrato proteico total da linhagem tumoral A2058 foram aplicados no gel (*input*).

3.4. Análise do perfil de expressão de genes CT, BORIS e CTCF

3.4.1. Linhagens celulares tumorais

Linhagens celulares tumorais, obtidas comercialmente da ATCC (*American Type Culture Collection*), foram utilizadas para avaliar o perfil de expressão de quinze genes CT, incluindo CTSP-1, além do gene CTCF e BORIS. Para isso, vinte e duas linhagens celulares tumorais foram selecionadas: A172 (glioblastoma), A2058 (melanoma maligno), A549 (carcinoma de pulmão), CaSki (carcinoma de cérvix), DU145 (carcinoma de próstata), FADU (carcinoma de células escamosas da faringe), H1155 (adenocarcinoma de pulmão), H1299 (carcinoma pulmonar), H358 (adenocarcinoma de pulmão), HeLa (adenocarcinoma cervical), HL-60 (leucemia aguda mielocítica), MCF-7 (adenocarcinoma de mama), MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama), MDA-MB-436 (adenocarcinoma de mama), PC3 (adenocarcinoma de próstata), SAOS-2 (osteossarcoma), SCABER (carcinoma de células escamosas da bexiga), SK-LC-17 (carcinoma de pulmão), SKMEL-25 (melanoma), SW-480 (adenocarcinoma coloretal), T98G (glioblastoma multiforme) e U266 (mieloma). As linhagens foram cultivadas de acordo com as especificações do fornecedor.

3.4.2. Extração dos RNAs

As linhagens celulares foram cultivadas em placas p100 e após apresentarem uma confluência aproximada de 70%, o meio foi aspirado e quatro mililitros de Trizol (Invitrogen) foram adicionados a cada placa. Os lisados celulares foram agitados à temperatura ambiente durante 15min e 800µl de clorofórmio foram adicionados a cada amostra. As amostras foram agitadas vigorosamente durante 30s e, após um intervalo de 5min à temperatura ambiente, foram centrifugados a 3200xg por 30min a 4°C. A fase superior de cada amostra foi transferida para quatro tubos, sendo adicionados 500µl de isopropanol a cada um. As amostras foram homogeneizadas e após um intervalo de 10min à temperatura ambiente, foram

centrifugadas a 12000xg por 30min a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e os *pellets*, lavados duas vezes com 1ml de 75% etanol. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram descartados e os pellets, ressuspendidos em 40µl de água tratada com DEPC.

A integridade dos RNAs extraídos foi analisada aplicando-se 1µg de RNA total em gel de 1% agarose. Antes de ser aplicado, o RNA foi desnaturado a 65°C por 5 minutos, sendo mantido em condição desnaturante em tampão de amostra contendo ureia (2x TAE; 30% glicerol; 7M ureia; traços de azul de bromofenol). Foram considerados íntegros os RNAs que apresentavam as bandas correspondentes aos RNAs ribossômicos 28S e 18S bem evidentes e na razão 2:1.

3.4.3. Tratamento dos RNAs com DNase

A fim de eliminar a contaminação com DNA genômico dos RNAs extraídos, estes foram tratados com DNase (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. A eficiência dos tratamentos foi analisada por meio do teste de *hMLH1* (*human mut-L homologue* 1). Nesse teste, reações de amplificação foram realizadas utilizando-se 200ng de cada RNA total, 1U de *Taq Platinum DNA polimerase* (Invitrogen), 1x tampão da enzima, 1,5mM $MgCl_2$, 0,1mM dNTPs e 0,4µM de cada um dos *primers* específicos para *hMLH1*, desenhados nos introns 12 e 13 desse gene (HMLH-F: 5' TGGTGTCTCTAGTTCTGG 3' e HMLH-R: 5' CATTGTTGTAGTAGCTCTGC 3'). As condições da reação foram: desnaturação a 94°C por 5min; 35 ciclos de 45s a 94°C, 45s a 55°C, 1min a 72°C; e extensão final de 6min a 72°C. Como controle positivo, uma amostra de RNA contaminada com DNA genômico foi utilizada. Os produtos das reações foram analisados em gel de 8% acrilamida corado com prata e a ausência do fragmento de tamanho esperado (250pb) indicava a eficiência na eliminação do DNA genômico contaminante.

3.4.4. RT-PCR *(Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction)*

Para a síntese de cDNAs, dois microgramas de RNA total de testículo humano normal (Clontech) e de cada um dos RNAs extraídos das linhagens celulares tumorais foram incubados a 65°C durante 5min na presença de 250ng de oligo(dT), 50ng de *random primers* e 0,77mM dNTPs, em volume final de 13µl. Em seguida, as amostras foram incubadas no gelo e foram adicionadas às mesmas 1x *first strand buffer*, 0,01M DTT, 40U de *RNAse OUT Recombinant RNase Inhibitor* (Invitrogen) e 200U de *SuperScript III RT* (Invitrogen). As reações foram incubadas a 50°C por 1 hora e depois a 70°C por 15min.

A qualidade dos cDNAs sintetizados foi analisada por PCR, na qual foram utilizados *primers* que amplificam um fragmento na região 5' do gene *Notch-1,* que possui 7665pb. Na reação, foram utilizados 200ng de cada *RNA* total, 0,4µM de cada um dos *primers* específicos para o gene *Notch-1* (Notch-1 F: 5' CCAACCAGTTCTCCTGC 3' e Notch-1 R: 5' GTGGTTAGGGCAGTCATC 3'), 1U de *Taq Platinum DNA polimerase* (Invitrogen), 1x tampão da enzima, 1,5mM $MgCl_2$, 0,2mM dNTPs e 0,4µM de cada *primer*. As condições da reação foram: desnaturação a 95°C por 5min; 35 ciclos de 45s a 95°C, 45s a 60°C, 1min a 72°C; e extensão final de 6min a 72°C. Os produtos das reações foram analisados em gel de 8% poliacrilamida corado com prata. A amplificação de um fragmento de 317pb indicava uma boa qualidade dos cDNAs sintetizados.

Os cDNAs foram, então, utilizados nas reações de amplificação para se avaliar o perfil de expressão de genes CT (**tabela 1**) e também dos genes BORIS e CTCF nas linhagens celulares tumorais selecionadas. As sequências dos *primers* utilizados para a amplificação de cada gene e o tamanho dos fragmentos esperados estão indicados na **tabela 1**.

As condições de amplificação foram: desnaturação a 94°C por 2min; 40 ciclos de 94°C por 45s, temperatura de hibridização dos *primers* por 45s, e 72°C por 1min; e extensão final a 72°C por 7min. Para o gene CTSP-1, as reações foram feitas em um volume total de 25µl, contendo: 1U de *Taq Platinum DNA polimerase* (Invitrogen), 1x tampão da enzima, 1,0mM

$MgCl_2$, 0,05mM dNTPs e 0,4µM de cada *primer*. Para os demais genes, as reações também foram realizadas em um volume total de 25ul, contendo: 1U de *Taq Platinum DNA polimerase*, 1x tampão da enzima, 1,0mM $MgCl_2$, 0,1mM dNTPs e 0,2µM de cada *primer*.

Tabela 1 – P*rimers* utilizados nas RT-PCR.

gene	sequência dos *primers*	tamanho do fragmento (pb)	Temp. de hibridização dos *primers*
CTSP-1	(F) 5' gctgtccattatgctgttaac 3'	418	58°C
	(R) 5' tgcatttaaacttatcaactc 3'		
CTCF	(F) 5' agatctggacgacaatgag 3'	186	50°C
	(R) 5' cctgtattctggtcttcaac 3'		
SSX-1	(F) 5' ctaaagcatcagagaagagaagc 3'	422	
	(R) 5' agatctcttattaatcttctcagaaa 3'		
CT45	(F) 5' ctctgccatgtccaaagcaa 3'	80	60°C
	(R) 5' aagtcatcaatctgagaatccaattg 3'		
MAGEA2	(F) 5' tcagggagttgatgaccttgt 3'	159 / 257	
	(R) 5' agtgcctcgggtcctactt 3'		
GAGE	(F) 5' tatgcggcccgagcagtt 3'	209	
	(R) 5' cctgcccatcaggaccatc 3'		
BORIS	(F) 5' ccctcattcagcaccagaa 3'	297	
	(R) 5' ctgatccacacttctccgaa 3'		
MAGEA10	(F) 5' ggaacccctcttttctacaga 3'	410 / 500	
	(R) 5' tcctctggggtgcttggtatta 3'		
MAGEA1	(F) 5' ggccgaaggaacctgacccag 3'	246	65°C
	(R) 5' agggcctcttgttgggcctcaa 3'		
NY-ESO-1	(F) 5' ccccaccgcttcccgtg 3'	275	
	(R) 5' ctggccactcgtgctggga 3'		
BAGE-1	(F) 5' tggctcgtctcactctgg 3'	275	
	(R) 5' tcctgttgagctgccgtct 3'		
LAGE-1	(F) 5' ctgcgcaggatggaaggtgcccc 3'	332 / 561	
	(R) 5' gcgcctctgccctgagggagc 3'		
MAGEA3/6	(F) 5' gaagccggcccaggctcg 3'	423	
	(R) 5' ggagtcctcataggattggct 3'		
MAGEA4	(F) 5' gcgagctgctctgtctgac 3'	523	
	(R) 5' aaggactctgcgtcaggc 3'		
PRAME	(F) 5' ctgtactcatttccagagccaga 3'	561	
	(R) 5' tattgagagggtttccaaggggtt 3'		
MAGEC1	(F) 5' gacgaggatcgtctcaggtcagc 3'	632	
	(R) 5' acatcctcaccctcaggaggg 3'		
MAGEA12	(F) 5' attctcgccctgagcaacgg 3'	835	
	(R) 5' gatgcctccaacacactcagct 3'		

No controle positivo das RT-PCR, foi utilizado cDNA de testículo humano normal como molde. No controle negativo, nenhum cDNA foi posto no tubo. As reações foram feitas em duplicata, e em casos de resultados diferentes para um mesmo gene, uma reação adicional foi realizada. Todos os produtos das amplificações foram analisados em gel de 8% acrilamida corado com prata.

3.5. Superexpressão de CTSP-1 em H1299

3.5.1. Clonagem de CTSP-1 em pcDNA3/HA ou pEGFP-C1

A maior fase aberta de leitura do gene CTSP-1 foi amplificada por PCR a partir da construção pET28a/CTSP-1 disponível no laboratório. Os *primers* utilizados foram: pcDNA3/HA/CTSP-1 F (5' CGGGATCCATGAAGAAGACGACAATG 3') e pcDNA3/HA/CTSP-1 R (5' CGGAATTCCGTTCGTCAGGTGTTCTTTC 3'), que apresentam o sítio de restrição para as enzimas *BamHI* e *EcoRI*, respectivamente. Um microlitro da miniprep pET28a/CTSP-1 foi utilizado como molde em uma reação de amplificação com volume final de 50µl, contendo: 1U de *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen); 1x tampão da enzima; 2mM MgSO4; 0,1mM dNTP; e 0,5µM de cada *primer*. O programa de amplificação foi: desnaturação do DNA a 94°C por 5min; 35 ciclos de 94°C por 30s, 55°C por 30s e 68°C por 1min; e extensão final a 68°C por 10min. O produto de PCR foi purificado do gel de agarose utilizando-se o *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen). Em seguida, o inserto foi subclonado em vetor pGEMT Easy (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. Dois microlitros dos produtos da ligação foram transformados em bactérias *E. coli* da cepa DH10B, por eletroporação, e estas foram plaqueadas em meio CG contendo 100µg/ml de ampicilina. Para verificar quais colônias continham o inserto foram feitas PCR de colônias, conforme descrito anteriormente. Para as

minipreps, os DNAs plasmideais foram extraídos das bactérias utilizando-se o kit *Wizard Mini Preps DNA Purification System* (Promega).

Para a clonagem do inserto no vetor de expressão pcDNA3/HA (vetor pcDNA3, fornecido pela empresa Invitrogen, ao qual foi adicionada a sequência do epitopo HA), cerca de 10μg de cada vetor, pGEMT Easy/CTSP-1 e pcDNA3/HA, foram digeridos com a enzima de restrição *BamHI* (New England Biolabs), conforme as instruções do fabricante. Os DNAs foram extraídos com fenol/clorofórmio e precipitados com etanol e, em seguida, digeridos com a enzima de restrição *EcoRI* (Fermentas Life Sciences). O inserto e o vetor digeridos foram, então, purificados de gel de agarose e ligados utilizando-se a enzima *T4 DNA ligase* (New England Biolabs), de acordo com as instruções do fornecedor. Dois microlitros dos produtos da ligação foram transformados em bactérias *E. coli* da cepa DH10B e os clones foram analisados por reações de amplificação, conforme descrito acima, utilizando-se os *primers* específicos para o vetor pcDNA3/HA: T7 (5' TAATACGACTCACTATAGGG 3') e SP6 (5' ATTTAGGTGACACTATAG 3'). Após a miniprep da construção pcDNA3/CTSP-1/HA, esta foi sequenciada utilizando-se os *primers* T7 e SP6. A sequência de HA foi clonada a 3' da fase aberta de leitura de CTSP-1. s midipreps foram feitas utilizando-se o *QIAGEN Plasmid Midi Kit* (Qiagen).

A clonagem da maior fase aberta de leitura de CTSP-1 no vetor pEGFP-C1 (BD Biosciences) foi realizada de forma semelhante. A construção pEGFP-C1/CTSP-1 permite a expressão da proteína CTSP-1 em fusão (no seu N-terminal) com a proteína GFPmut1 (nesse trabalho denominada simplestemente GFP). A GFPmut1 expressa pelo vetor é uma variante da proteína GFP (*Green Fluorescent Protein*), otimizada para os níveis de fluorescência emitida e de expressão em células de mamífero.

3.5.2. Transfecção e seleção dos clones transfectados

A linhagem celular tumoral H1299 (carcinoma pulmonar) foi cultivada de acordo com as instruções do fornecedor. Células dessa linhagem foram transfectadas com o vetor pcDNA3/HA ou com a construção pcDNA3/CTSP-1/HA utilizando-se o reagente *Fugene 6* (Roche). Como um controle para a seleção posterior dos clones transfectados, células parentais foram cultivadas nas mesmas condições. Na véspera da transfecção, foram plaqueadas $7{,}5x10^4$ células H1299 de forma a se obter cerca de 50 a 80% de confluência celular no dia posterior ao plaqueamento. A proporção de *Fugene 6* : DNA utilizada na transfecção foi de 6µl:1µg, e cerca de 48h após a transfecção, 800µg/ml de antibiótico neomicina (Sigma) foram adicionados às células. O meio, sempre contendo essa concentração de antibiótico, foi sendo trocado de dois em dois dias e após cerca de sete dias, as células parentais morreram na presença do antibiótico. Foram feitas diluições limitantes de cada grupo – das células transfectadas com pcDNA3/HA e das transfectadas com pcDNA3/CTSP-1/HA – em placas de 96 poços, com o objetivo de se obter apenas uma célula por poço e, assim, obterem-se clones transfectados estavelmente pela seleção com antibiótico. O meio de cultura, sempre contendo o antibiótico, continuou sendo trocado frequentemente e a seleção dos clones estáveis continuou por mais três semanas aproximadamente.

3.5.3. Análise da expressão de CTSP-1/HA pelos clones H1299

3.5.3.1. *Western Blot*

Células dos clones de H1299 transfectados com pcDNA3/HA ou com pcDNA3/CTSP-1/HA foram cultivadas em meio contendo 200µg/ml de neomicina (Sigma). Em seguida, as células foram tripsinizadas e contadas. Cem microlitros do tampão RIPA (50mM Tris-Cl pH 7,4; 120mM NaCl; 5mM EDTA; 0,5% NP-40) contendo inibidores de proteases (Amersham Biosciences) foram adicionados a cada 2×10^6 células. Estas foram ressuspendidas e

mantidas em gelo por 10min. Os lisados foram centrifugados a 13000rpm durante 15min a 4°C; os sobrenadantes foram reservados e os *pellets*, descartados. As concentrações das proteínas foram determinadas a 595nm utilizando-se reagente de Bradford (BioRad) e espectrofotômetro (*Microplate Reader Benchmark* - BioRad).

O *Western Blot* foi realizado de modo semelhante ao descrito no **item 3.1.5**, sendo utilizado um gel de 12% acrilamida e 70µg de cada um dos extratos proteicos totais. A membrana foi incubada com o anticorpo primário anti-HA feito em coelho (Zymed) diluído 1:500 em 5% leite PBST por aproximadamente 16h a 4°C. Como um controle de *loading*, o ensaio também foi feito com o anticorpo anti-αβ-tubulina feito em coelho (Cell Signaling) diluído 1:1000 em 5% leite PBST por aproximadamente 16h a 4°C.

3.5.3.2. Citometria de fluxo com imuno-marcação de CTSP-1/HA

Um milhão de células de cada um dos clones de H1299 superexpressando CTSP-1/HA (clones CT-A10, -B1, -C1, -E9, -F9 e -H10) e dos clones vetor vazio (clones VV-H6, -H8, -H9, -H15 e -H20) foram centrifugadas e ressuspendidas em 800µl de PBS gelado. Em seguida, foram adicionados aos poucos 200µl de uma solução 18,5% formaldeído em PBS, sob agitação. Após a incubação em gelo por 30min, as amostras foram centrifugadas por 6min a 150xg e a 4°C. Os sobrenadantes foram removidos e os *pellets* celulares, lavados duas vezes com PBS gelado. Para a permeabilização das células, estas foram ressuspendidas em 1ml do tampão A (0,2% Tween20 e 2% SFB em PBS) e incubadas por 15min a 37°C. As células foram centrifugadas e os *pellets* celulares, ressuspendidos em 70µl de anticorpo primário anti-HA feito em coelho (Zymed) diluído 1:200 em tampão A. As células foram, então, incubadas em gelo por 30min, sendo homogeneizadas a cada 10min. Após duas lavagens com o tampão A, os *pellets* celulares foram ressuspendidos em 70µl de anticorpo anti-IgG de coelho Alexa Fluor 488 (Invitrogen) diluído 1:1000 em tampão A. Após 30min

de incubação em gelo, com homogeneização a cada 10min, as amostras foram lavadas duas vezes com tampão A e depois incubadas com streptavidina-aloficocianina (Invitrogen) diluída 1:400 em tampão A. As amostras foram incubadas em gelo por 30min, sendo homogeneizadas a cada 10min. Por fim, as células foram novamente lavadas duas vezes com o tampão A e ressuspendidas em 300µl do mesmo, sendo, então, analisadas no citômetro *FACSCalibur*, utilizando o programa computacional *Cell Quest* (Becton Dickinson).

3.5.3.3. Imunofluorescências

As células dos clones de H1299 foram plaqueadas em lamínulas de vidro (13mm, Knitel Glaser) e mantidas em cultura até atingirem um estado subconfluente. As lamínulas foram lavadas duas vezes com PBS e depois as células foram fixadas por incubação em solução de 3,7% formaldeído em PBS durante 15min à temperatura ambiente. Após três lavagens com PBS gelado, para a permeabilização celular, as amostras foram incubadas com 0,5% Triton X-100 em PBS. Em seguida, para o bloqueio de sítios inespecíficos, as amostras foram incubadas em 5% soro fetal bovino (SFB) e 0,5% Triton X-100 diluídos em PBS durante 30min à temperatura ambiente. Após esse tempo, cada lamínula foi invertida sobre 40µl do anticorpo primário anti-CTCF feito em camundongo (Upstate) 1:500 e/ou anti-HA feito em coelho (Zymed) 1:200 diluídos em 5% SFB em PBS. As amostras foram incubas por 30min à temperatura ambiente em câmara úmida, lavadas por três vezes, de 5min cada, em PBS gelado e depois invertidas, em 40µl de anticorpo secundário anti-IgG de camundongo Alexa Fluor 488 (Invitrogen) e/ou anti-IgG de coelho Alexa Fluor 568 (Invitrogen), de forma sequencial, por 30min cada à temperatura ambiente e em câmara úmida no escuro. Após três lavagens com PBS gelado, as lamínulas foram invertidas em 40µl de DAPI (4',6-diamidino-2-fenil-indol) diluído 1:1000 em PBS por 5min à temperatura ambiente e no escuro. As lamínulas

foram lavadas e depois coladas sobre lâminas de vidro (Knitel Glaser) para a visualização em microscópio confocal *Zeiss LSM510 – multifóton coherent chamilion versão Zen*.

3.6. Monitoramento da localização subcelular de CTSP-1/GFP

Para o monitoramento da localização subcelular de CTSP-1/GFP em H1299, a população de células transfectadas estavelmente com o vetor pEGFP/CTSP-1 foi analisada em microscópio de fluorescência invertido Olympus IX-70, sendo retiradas fotografias das mesmas sob luz fluorescente ou visível em intervalos de tempo regulares ao longo de sete horas.

3.7. Análise do impacto da superexpressão de CTSP-1/HA sobre os níveis de expressão de NY-ESO-1 endógeno em H1299

3.7.1. Ensaio de repórter luciferase

No ensaio de repórter luciferase, foram utilizados três clones da linhagem celular tumoral H1299 transfectados com o vetor pcDNA3/HA (clones VV-H6, VV-H8 e VV-H9) e três clones H1299 superexpressando a proteína CTSP-1/HA (clones CT-B1, CT-C1 e CT-E9). Em uma placa de 96 poços, foram plaqueadas 4,0 x 10^3 de células de cada um dos clones em triplicata. No dia seguinte, estas foram co-transfectadas com o vetor pCMV/βGal (que permite a expressão constitutiva da enzima β-galactosidase) e com a construção pGL3ESO-826 (que apresenta a região promotora do gene *cancer-testis* NY-ESO-1 contendo o sítio de ligação de CTCF/BORIS clonada *upstream* ao gene da *firefly* luciferase), gentilmente cedidos pela Dra. Laura Schiero (do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer em São Paulo) e pelo Dr. David S. Schrump (do *Center for Cancer Research* em Bethesda), respectivamente. As transfecções foram feitas com o reagente *Fugene 6* (Roche), de acordo com as instruções do fabricante, na proporção de 6:1 (µl de *Fugene 6* : µg de DNA), sendo utilizados 0,6µl do

reagente; 25ng de pCMV/βGal e 75ng de pGL3/ESO-826. Como controles negativos, as células de um poço da placa foram transfectadas com o vetor pCMV/βGal na ausência do pGL3/ESO-826 e vice-versa. Cerca de 48h após as transfecções, as células foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas por 15min à temperatura ambiente com o tampão de lise do kit *Luciferase Assay System* (Promega). Para as leituras da atividade da *Firefly* luciferase, em uma placa branca de 96 poços, vinte microlitros do lisado celular foram incubados, por 5min e sob agitação, com o mesmo volume do tampão da luciferase fornecido no kit. As leituras foram feitas utilizando-se o programa *Wallac1420* e o aparelho *1420 Multilabel Counter* (Perkin Elmer). Para o ensaio de β-galoctosidase, foi utilizado o kit *β-Galactosidase Enzyme Assay System* (Promega), conforme as instruções. Esse ensaio baseia-se no fato de a enzima β-galactosidase de *E. coli*, expressa a partir da construção pCMV/βGal, hidrolisar o composto ONPG (2-nitrofenilgalactoside) em β-D-galactose e o-nitrofenol, substrato este que apresenta coloração amarela quando em solução aquosa e que absorve a luz em um comprimento de onda de 420nm. Resumidamente, em placas de 96 poços, a cada 30µl do lisado, foram adicionados 20µl de *Reporter Lysis* Buffer e 50µl de *Assay 2X Buffer*. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente até que apresentassem coloração amarela. As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 420nm. Os cálculos foram feitos da seguinte maneira: primeiramente, os valores das atividades da luciferase foram divididos pelos valores da beta-galactosidade. Em seguida, como os ensaios foram feitos em triplicatas para cada clone, foram calculadas as médias das triplicatas dessas razões. Essa média, por sua vez, foi dividida pelo valor da absorbância de beta-galactosidases. Por fim, foram calculadas as médias de valores para os três clones vetores vazio e outra média para os três clones superexpressando CTSP-1/HA. Os resultados finais das atividades relativas da luciferase entre esses dois grupos foram comparados pelo teste de Mann Whitney.

3.7.2. PCR em tempo real

Os cDNAs de células de seis clones de H1299 superexpressando CTSP-1/HA (clones CT-A10, -B1, -C1, -E9, -F9 e –H10) e de seis clones vetor vazio (VV-H6, -H8, -H9, -H14, -H15 e -H20) foram utilizados em ensaios de PCR em tempo real para se avaliar se a superexpressão de CTSP-1 era capaz de alterar os níveis de expressão de NY-ESO-1. As sequências dos *primers* utilizados nessas reações, incluindo os *primers* dos genes normalizadores (GAPDH, GUSbeta, HMBS, HPRT1, PUM1 e RPL27) estão listados na **tabela 2**.

Tabela 2 – P*rimers* utilizados na PCR em tempo real.

Gene	Sequências dos Primers	[F + R] (nM)
NY-ESO-1	**F:** 5' CGCCTGCTTGAGTTCTACC 3' **R**: 5' TTCAGAAGCACCCCTGGCAC 3'	200
GAPDH	**F:** 5' GTCCACTGGCGTCTTCACCA 3' **R:** 5' GTGGCAGTGATGGCATGGAC 3'	400
GUSbeta	**F:** 5' GAAAATACGTGGTTGGAGAGCTCATT 3' **R:** 5' CCGAGTGAAGATCCCCTTTTTA 3'	200
HMBS	**F:** 5' GGCAATGCGGCTGCAA 3' **R:** 5' GGGTACCCACGCGAATCAC 3'	300
HPRT1	**F:** 5' TGACACTGGCAAAACAATGCA 3' **R:** 5' GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT 3'	400
PUM1	**F:** 5' CCAGGCCAGCGGAAGAT 3' **R:** 5' TGTACTTACGAAGAGTTGCGATGTG 3'	200
RPL27	**F:** 5' ATCGCCAAGAGATCAAAGATAA 3' **R:** 5' TCTGAAGACATCCTTATTGACG 3'	200

Legenda:

F: *sequência do primer Forward;* ***R:*** *sequência do primer Reverse;* **[F + R]** – concentração final de primers F e R utilizada para amplificar cada fragmento; ***NORMALIZADORES:*** ***GAPDH*** *- glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase;* ***GUSbeta*** *- glucuronidase beta;* ***HMBS*** *- hydroxymethylbilane synthase;* ***HPRT1*** *- hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (Lesch-Nyhan syndrome);* ***PUM-1*** *- pumilio homolog ;* ***RPL27*** *- ribosomal protein L27*

A detecção dos produtos de PCR foi realizada com o reagente *SYBR Green Dye* (Applied Biosystems) e as reações foram feitas em *termociclador ABI Prism 7300 Sequence Detection System* (Applied Biosystems). Em todas as reações foram utilizados 10ng de cDNA, 10µl de

SYBR Green Dye Master Mix (Applied Biosystems) e para cada gene utilizou-se uma concentração final de *primers forward* e *reverse* determinada (**tabela 2**). Para cada amostra analisada, a reação foi feita em duplicata. As condições de amplificação foram: incubação a 50°C por 2min e desnaturação a 95°C por 10min, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 16s e anelamento e extensão a 60°C por 1min. A especificidade das reações foi confirmada através da análise da curva de dissociação dos produtos amplificados ao final da amplificação.

Também foram realizados ensaios de PCR em tempo real para seis genes normalizadores (**tabela 2**) utilizando-se o cDNA de cada um dos clones como molde a fim de determinar, por meio do programa computacional *Genorm*, quais deles apresentavam uma menor variação de expressão nas amostras analisadas, ou seja, quais deles eram os mais estáveis e os mais adequados para a normalização dos resultados obtidos (VANDESOMPELE et al. 2002). Os resultados do Gen*orm* demonstraram que os seis genes endógenos estavam igualmente adequados para as normalizações. Sendo assim, utilizando-se esse programa, foi calculado, para cada um dos clones, um fator de normalização, baseado na média geométrica dos valores de Ct obtidos para cada gene normalizador, nas diferentes amostras. Os valores dos fatores de normalização foram utilizados para os cálculos que definiriam a diferença de expressão dos genes analisados entre cada um dos clones em relação ao clone controle H1299 VV-H6. Para o cálculo da expressão diferencial pelo método de quantificação relativa foi utilizado o modelo matemático proposto por PFAFFL (2001).

3.7.3. *Western Blot*

O *Western Blot* foi realizado de modo semelhante ao descrito no **item 3.1.6**, sendo utilizado um gel de 12% acrilamida e 70µg de cada um dos extratos proteicos totais. A membrana foi incubada com o anticorpo primário anti-NY-ESO-1 feito em camundongo

(gentilmente cedido pelo Dr. Loyd Old, do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer de Nova Iorque) diluído para 0,4μg/ml em 1% BSA (albumina sérica bovina – Sigma) PBST por aproximadamente 16h a 4°C. Nesse caso, o bloqueio havia sido realizado com 3% BSA e o anticorpo secundário utilizado foi o anti-IgG de camundongo conjugado a HRP (Amersham) diluído 1:3000 em PBST. Como u3m controle de *loading*, o ensaio também foi feito com o anticorpo anti-αβ-tubulina feito em coelho (Cell Signaling) diluído 1:1000 em 5% leite PBST por aproximadamente 16h a 4°C.

3.7.4. Citometria de fluxo com imuno-marcação de CTSP-1/HA e de NY-ESO-1

Esse ensaio foi realizado de forma semelhante ao descrito no **item 3.5.3.2** Entretanto, nesse caso, as células dos clones de H1299 foram imuno-marcadas sequencialmente da seguinte maneira: as células foram centrifugadas e os *pellets* celulares, ressuspendidos em 70μl de anticorpo primário anti-HA feito em coelho (Zymed) diluído 1:200 em tampão A. As células foram, então, incubadas em gelo por 30min, sendo homogeneizadas a cada 10min. Após duas lavagens com o tampão A, os *pellets* celulares foram ressuspendidos em 70μl de anticorpo anti-IgG de coelho biotinilado (Invitrogen) diluído 1:400 em tampão A. Após 40min de incubação em gelo, com homogeneização a cada 10min, as amostras foram lavadas duas vezes com tampão A e depois incubadas com streptavidina-aloficocianina (Invitrogen) diluída 1:400 em tampão A. As amostras foram incubadas em gelo por 30min, sendo homogeneizadas a cada 10min. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com o tampão A e posteriormente incubadas com 70μl de anti-NY-ESO-1 feito em camundongo e diluído 1:20 em tampão A durante 30min no gelo, sendo homogeneizadas a cada 10min. Após a incubação por 30min, e homogeneização a cada 10min, com o anti-IgG de camundongo Alexa 488, as células foram lavadas duas vezes com o tampão A e ressuspendidas em 300μl do mesmo. Como controles desse experimento, utilizamos células

do clone CT-C1 incubadas apenas com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo Alexa 488 e também as células do clone vetor vazio VV-H6 incubadas com ambos os anticorpos primários e seus respectivos secundários.

3.8. Análise do impacto da superexpressão de CTP-1/HA sobre a regulação do ciclo e da capacidade clonogênica de células H1299

3.8.1. Análise do ciclo de células H1299 superexpressando CTSP-1/HA 48h após as transfecções

Células H1299 foram plaqueadas e transfectadas conforme descrito anteriormente com pcDNA3/HA ou pcDNA3/CTSP-1/HA ou pEGFP. Também foram utilizadas células H1299 parentais cultivadas apenas com o reagente de transfecção *Fugene 6* (Roche). As transfecções foram feitas em duplicata de modo que após cerca de 36h, foi adicionada 0,6µg/ml de colcemida (Gibco) às células de uma das placas, sendo as células da outra placa cultivadas sem a droga. Também foram analisadas as células H1299 parentais. As células foram mantidas em cultura por mais 12h na presença e na ausência da droga.

Em seguida, um milhão de células foi centrifugado e as células, ressuspendidas em 800µl de PBS gelado, sendo posteriormente adicionados, gota-a-gota, duzentos microlitros de uma solução 18,5% formaldeído em PBS sob agitação suave. Após a incubação em gelo por 30min, as amostras foram centrifugadas por 6min a 150xg e a 4°C. Os sobrenadantes foram removidos e os *pellets* celulares, lavados duas vezes com PBS gelado. Para a permeabilização celular, as células foram ressuspendidas em 1ml do tampão A (0,2% Tween20 e 2% SFB em PBS) e incubadas por 15min a 37°C. As células foram centrifugadas e os *pellets*, ressuspendidos em 70µl de anticorpo anti-HA diluído 1:200 em tampão A (exceto as células transfectadas com pEGFP). Após a incubação em gelo por 30min e homogeneização a cada 10min, as células foram lavadas duas vezes com o tampão A e os *pellets*, ressuspendidos em

40µl de anticorpo anti-IgG de coelho - Alexa Fluor 488 diluído 1:1000 em tampão A. Após a incubação em gelo por 30min, com homogeneização a cada 10min, as células foram lavadas duas vezes com o tampão A. Para a marcação do DNA, as células foram incubadas durante 30min e a 37°C, com 70µl de uma solução contendo iodeto de propídeo [0,02µg/µl IP; 0,0002µg/µl de RNAse A (Qiagen) em solução 2% SFB e 0,2% Tween 20 em PBS]. Por fim, as células foram analisadas por citometria de fluxo e a análise das curvas de células nas fases G0/G1, S e G2/M foi feita utilizando-se o programa computacional *Cell Quest*. De forma mais detalhada, para as análises de ciclo celular, as populações celulares foram delimitadas segundo sua forma e complexidade no *dot plot* SSC x FSC; em seguida, de acordo com a existência de células individuais no *dot plot* FL3A x FL3W; e, por fim, de acordo com a expressão (população P_{pos}) ou não (população P_{neg}) da proteína CTSP-1/HA ou GFP. A partir dessas delimitações, os ciclos celulares foram determinados e, nos histogramas, foram marcadas as regiões referentes a G0/G1, S e G2/M.

3.8.2. Análise do ciclo dos clones de H1299 superexpressando CTSP-1/HA

Células H1299 parentais e as dos clones VV-H6, VV-H8, CT-B1 e CT-C1 foram mantidas em placas de 100mm em estado de subconfluência e foram cultivadas na presença e na ausência de 0,6µg/ml de colcemida (Gibco) por 12h. Em seguida, elas foram analisadas conforme descrito no item anterior.

3.8.3. Ensaios clonogênicos

Para esses ensaios, um mesmo número de células H1299 parentais; que haviam completado 48h em cultura desde a transfecção com pcDNA3/HA ou pcDNA3/CTSP-1/HA (10.000 células); ou as células dos clones VV-H6, VV-H8, CT-B1 e CT-C1 (100 células) foram plaqueadas em placas de 60mm, em duplicata. No caso das células transfectadas, cerca

de 24h após os plaqueamentos, foram adicionados 800µg/ml de neomicina (Sigma) ao meio de cultura para a seleção das células transfectadas. Além disso, o antibiótico foi adicionado nessa mesma concentração às células H1299 parentais como um controle para a seleção das células resistentes. Após cerca de 12 a 18 dias em cultura, quando todas as células parentais controle haviam morrido no caso das células transfectadas, ou quando o tamanho das colônias formadas na placa era visível a olho nu no caso dos clones, as células foram lavadas com PBS e fixadas com solução de 3,7% formaldeído por 15min. Em seguida, foram coradas com solução de cristal violeta [0,1% cristal violeta (Sigma); 2% etanol] por 10min. O número de colônias foi contado e foi feita uma média da duplicata de cada amostra em triplicatas experimentais.

3.8.4. Avaliação do nível de expressão de CTSP-1/HA nas populações de H1299 48h e 12 dias após as transfecções.

Células H1299 foram transfectadas com pEGFP ou com pcDNA3/CTSP-1/HA conforme descrito no **item 3.5.2**. Após 48h das transfecções, foram adicionados 800µg/ml de neomicina (Sigma) ao meio de cultura dessas células bem como de células H1299 parentais (controle). O meio de cultura contendo neomicina (Sigma) foi sendo trocado a cada três dias até que todas as células parentais tivessem morrido para assegurar a seleção apenas as células resistentes ao antibiótico e, assim, possibilitar a obtenção das populações expressando GFP ou CTSP-1/GFP de forma estável. Antes de processar essas células para a análise em citômetro de fluxo, novas transfecções de células H1299 foram feitas com o vetor pEGFP u pcDNA3/CTSP-1/HA, novamente da mesma forma descrita no **item 3.5.2**. Dessa vez, no entanto, após as 48h das transfecções, as células transfectadas transitoriamente foram processadas, de forma paralela ao processamento das populações transfectadas estavelmente. Esses processamentos foram feitos no mesmo dia para evitar que eventuais variações

metodológicas, tal como a diluição dos anticorpos, interferissem nas comparações dos resultados finais entre o grupo de células analisadas 48h após as transfecções e o grupo de células analisadas 12 dais após as trasnfecções. O processamento das células consistiu na fixação das mesmas com formaldeído e, no caso das células transfectadas com pcDNA3/CTSP-1/HA, na posterior imuno-marcação com o anticorpo primário anti-HA feito em coelho e com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho Alexa Fluor 488 (conforme descrito no **item 3.5.3.2**). As amostras foram aplicadas no citômetro de fluxo e, em seguida, utilizando o programa computacional *Cell Quest* (Becton Dickinson), foram construídos *density-plots* representando FSC em função da intensidade de fluorescência emitida para cada amostra. Para a comparação dos níveis de proteína expressa nas células transfectadas transitoriamente e estavelmente, em todas as amostras foi determinada a porcentagem de células que apresentavam uma mesma faixa de intensidade de fluorescência emitida.

3.8.5. Ensaio de apoptose

Esse ensaio foi feito por marcação das células com anexina-V/Alexa Fluor 488 e/ou iodeto de propídeo, utilizando o kit da Invitrogen e seguindo as instruções do fabricante. Foram analisadas células H1299 parentais e células H1299 que haviam completado 48h de transfecção com pcDNA3/HA ou pcDNA3/CTSP-1/HA. Como controles, foram utilizadas células H1299 cultivadas com estaurosporina (Cell Signaling), um agente indutor de apoptose, e depois incubadas ou não com iodeto de propídeo. Basicamente, as células foram tripsinizadas, lavadas com PBS, e depois incubadas com tampão contendo anexina-V/Alexa Fluor 488 e/ou iodeto de propídeo durante 15min à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram ressuspendidas em 300µl de tampão e analisadas em citômetro *FACSCalibur*, utilizando o programa computacional *Cell Quest* (Becton Dickinson).

4. RESULTADOS

4.1. Identificação das interações CTSP-1/proteínas candidatas

4.1.1. Caracterização da isca LexA/CTSP-1

Para que uma proteína híbrida possa ser utilizada como isca na varredura de uma biblioteca no sistema duplo-híbrido em leveduras, ela deve ser expressa de forma estável e deve ser incapaz de auto-ativar a transcrição dos genes repórteres na ausência de uma interação isca/presa. Portanto, a fim de verificar se a isca LexA/CTSP-1 apresentava esses dois pré-requisitos, realizamos os ensaios de *Western Blot* e de auto-ativação, respectivamente.

4.1.1.1. *Western Blot* para avaliar a expressão da isca

A maior fase aberta de leitura de CTSP-1 foi clonada no vetor pGilda, o qual contém um promotor GAL1, induzível na presença de galactose e na ausência de glicose no meio de cultura. Para avaliarmos a expressão estável da isca LexA/CTSP-1, cultivamos as leveduras transformadas com o vetor pGilda ou pGilda/CTSP-1 em meio contendo glicose ou galactose. Em seguida, analisamos os extratos proteicos totais das leveduras por *Western Blot*, utilizando o anticorpo anti-LexA (**figura 8**).

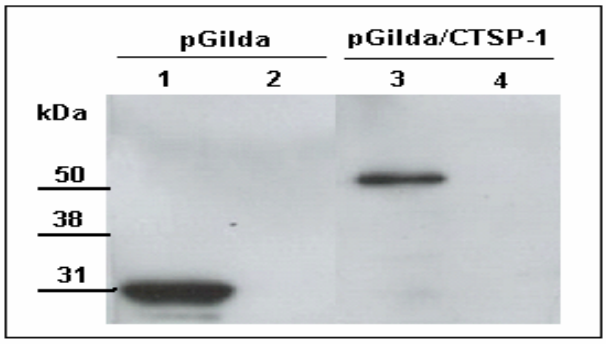

Figura 8 – *Avaliação da expressão da proteína LexA/CTSP-1.* Leveduras RFY206 transformadas com pGilda ou pGilda/CTSP-1 foram cultivadas em meio com galactose (colunas 1 e 3) ou com glicose (colunas 2 e 4). Os extratos proteicos totais foram analisados por *Western Blot* utilizando-se o anticorpo anti-LexA. Os pesos moleculares de LexA e LexA/CTSP-1 são de ~30kDa e ~55kDa, respectivamente.

Como podemos observar na **figura 8**, tanto a proteína LexA (~ 30kDa), utilizada como controle positivo, quanto a proteína LexA/CTSP-1 (~55kDa) foram expressas pelas leveduras cultivadas em meio contendo galactose, o mesmo não sendo observado na presença de glicose.

4.1.1.2. Teste de auto-ativação

Confirmada a expressão estável da proteína híbrida LexA/CTSP-1 em leveduras, a seguir, avaliamos a capacidade dessa isca em auto-ativar a transcrição do gene repórter na ausência de uma interação isca/presa.

Para isso, cultivamos as leveduras RFY206 transformadas com os vetores pSH18-34 (que contém o gene repórter lacZ) e pGilda/CTSP-1 em meio seletivo contendo X-Gal e glicose ou galactose (**figuras 9A** e **9B**, respectivamente) e acompanhamos a coloração das leveduras.

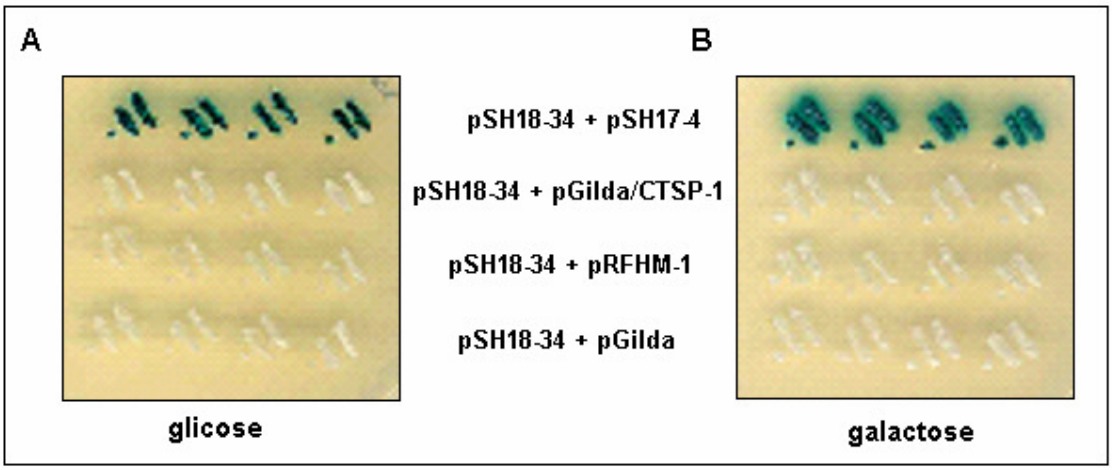

Figura 9 – *Teste de auto-ativação da isca.* Leveduras da cepa RFY206 transformadas com pSH18-34 + pSH17-4 (controle positivo); pSH18-34 + pGilda/CTSP-1; pSH18-34 + pRFHM-1 (controle negativo); ou pSH18-34 + pGilda (controle negativo) em meio -Ura -His, contendo X-Gal e (**A**) glicose ou (**B**) galactose.

Como podemos observar na **figura 9B**, em meio contendo galactose, as colônias não desenvolveram coloração azul, indicando, portanto, que a isca LexA/CTSP-1 é incapaz de auto-ativar a transcrição do gene repórter lacZ. Como controle positivo, utilizamos as leveduras RFY206 transformadas com os vetores pSH18-34 e pSH17-4. O vetor pSH17-4 permite a expressão constitutiva da proteína híbrida formada pelo domínio de ligação ao DNA (DL) LexA

de *E. coli* com o domínio de ativação (DA) da transcrição GAL4 de levedura. Portanto, essa proteína é capaz de se ligar ao DNA e de recrutar a RNA polimerase II, ativando a transcrição do repórter lacZ e, consequentemente, levar à formação de colônias azuis em ambos os meios de cultura (primeira linha da **figura 9**). Como controles negativos, utilizamos as leveduras RFY206 transformadas com os vetores pSH18-34 e pGilda vazio (quarta linha da **figura 9**), ou com os vetores pSH18-34 e pRFHM-1. Este último vetor permite a expressão constitutiva de uma proteína híbrida formada pelo DL LexA de *E. coli* com o homeodomínio da proteína bicoide de *Drosophila melanogaster*, o qual, por não ser um DA, não induz a transcrição do gene repórter (terceira linha da **figura 9**).

4.1.2. Varredura da biblioteca de cDNAs de tumores de próstata com a isca LexA/CTSP-1

Para a formação de leveduras diploides, acasalamos as leveduras RFY206 contendo os vetores pGilda/CTSP-1 e pSH18-34 (que contém o gene repórter lacZ) com as leveduras EGY48 contendo o gene repórter LEU2 integrado em seu genoma e transformadas com os vetores pJG4-5/cDNA da biblioteca de tumores de próstata. Escolhemos a biblioteca de tumores de próstata porque, conforme nosso grupo havia observado, o transcrito CTSP-1 é expresso em uma fração significativa de amostras desse tipo de tumor (14/24 ou 58% das amostras analisadas), sendo observada também uma alta frequência de anticorpos contra a proteína CTSP-1 recombinante no soro de pacientes com tumor prostático (37/147 ou 25% das amostras de soro de pacientes com câncer de próstata analisadas) (PARMIGIANI et al. 2006, 2008).

Inicialmente, na varredura da biblioteca com a isca, obtivemos 480 clones capazes de crescer em meio de cultura seletivo sem leucina (clones LEU2+). Esses clones foram, então, transferidos para posições pré-determinadas de placas contendo diferentes meios seletivos, os quais permitiam analisar a expressão do outro gene repórter (lacZ) bem como checar a

dependência da interação por galactose e, ao mesmo tempo, re-analisar a expressão do repórter LEU2 (**figura 10**).

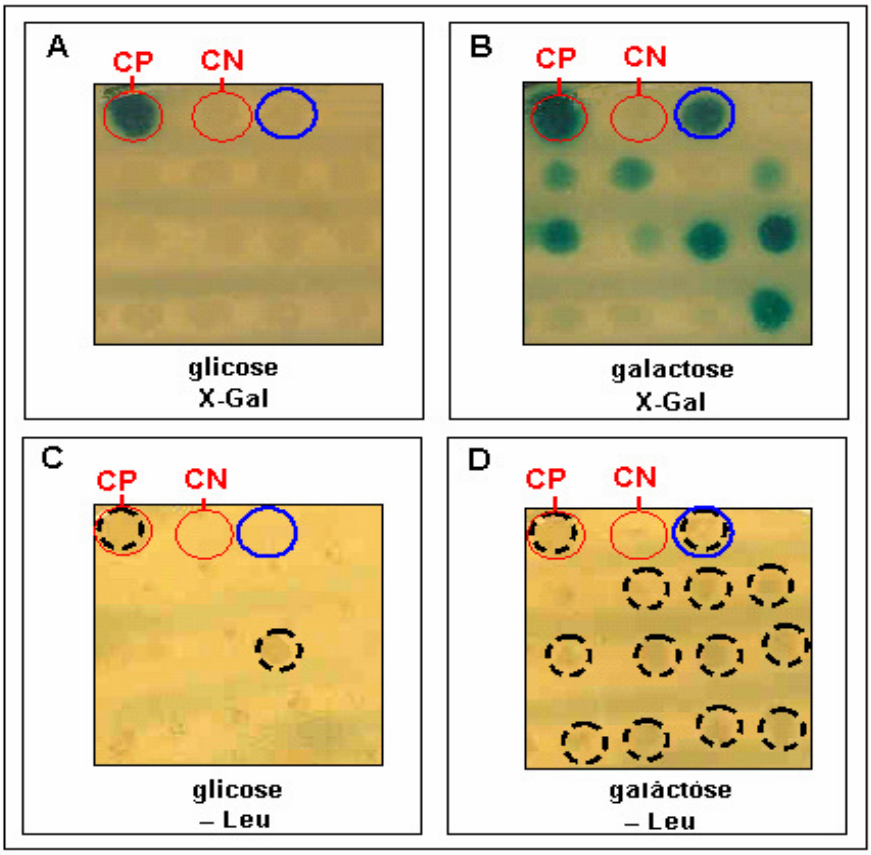

Figura 10 – *Exemplo de análise da transcrição do genes repórteres lacZ (A e B) e LEU2 (C e D) pela observação fenotípica das leveduras.* As leveduras diploides contendo o gene LEU2 integrado em seu genoma transformadas com os vetores pSH18-34, pJG4-5 e pSH17-4 foram utilizadas como controles positivos (CP); as leveduras diploides contendo o gene LEU2 integrado em seu genoma e os vetores pSH18-34, pJG4-5 e pRFHM-1 foram utilizadas como controles negativos (CN). Todos os clones foram cultivados em meio -Ura -His -Trp e (**A**) X-Gal e glicose; (**B**) X-Gal e galactose; (**C**) -Leu e glicose; e (**D**) -Leu e galactose. Em (**C**) e (**D**), os clones que cresceram estão circulados com linhas tracejadas para facilitar a visualização. Um exemplo de clone duplo-positivo ($lacZ^+$ e $LEU2^+$) está circulado em azul.

Uma vez que a expressão das proteínas LexA/CTSP-1 e B42/polipeptídeo da biblioteca é regulada pelo promotor GAL1, estas são expressas somente na presença de galactose e na ausência de glicose. Assim, em meio seletivo contendo X-Gal, os clones $lacZ^+$ devem apresentar coloração branca na presença de glicose (**figura 10A)** e azul na presença de galactose

(**figura 10B**). Os clones LEU2$^+$, por sua vez, não devem crescer em meio sem leucina contendo glicose (**figura 10C**), mas sim em meio contendo galactose (**figura 10D**). Portanto, após as observações dos fenótipos, excluímos os clones revertentes e selecionamos somente os clones duplo-positivos (lacZ$^+$ e LEU2$^+$) para as próximas análises. No total, obtivemos 156 clones duplo-positivos e um exemplo está circulado em azul na **figura 10**.

Como observamos na **figura 10B**, os clones apresentaram diferentes intensidades de coloração azul. No entanto, é importante ressaltar que a intensidade da coloração não pode ser correlacionada com a importância biológica da interação proteína-proteína nem com a afinidade das interações entre essas proteínas em células humanas. Fazer essa correlação não é possível, porque, além da afinidade, muitos outros parâmetros podem influenciar os fenótipos das leveduras, tais como a localização nuclear, o nível de expressão, a estabilidade e a estrutura tridimensional das proteínas híbridas que estão sendo expressas (VIDAL e LEGRAIN 1999).

4.1.3. Análise dos clones duplo-positivos (lacZ$^+$ e LEU2$^+$)

Em uma próxima etapa, realizamos reações de amplificação dos insertos contidos no vetor pJG4-5 dos clones duplo-positivos para identificarmos as proteínas candidatas a interagir com CTSP-1 em leveduras.

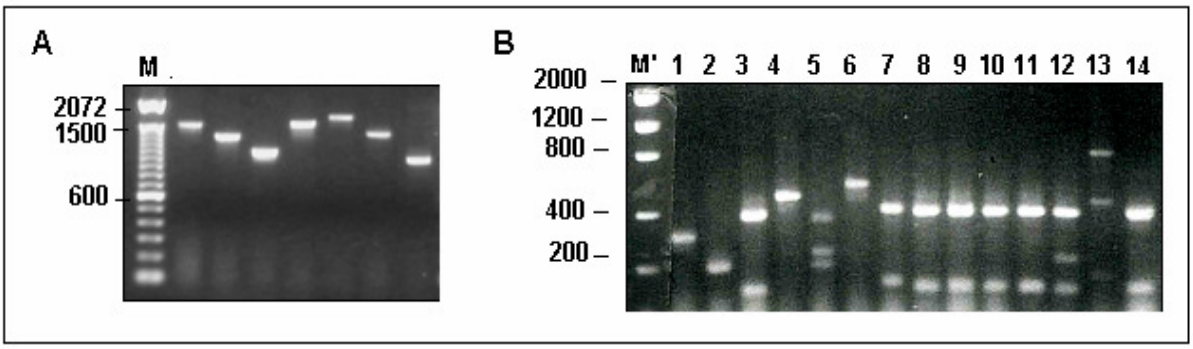

Figura 11 – *Exemplos de análises dos clones duplo-positivos (lacZ$^+$ e LEU2$^+$).* **A –** produtos de PCR de clones duplo-positivos. **B –** produtos de PCR digeridos com as enzimas de restrição *HaeIII* e *HinfI*. Gel de agarose corado com brometo de etídeo. M – *100bp DNA mass ladder*; M' – *low DNA mass ladder*.

A **figura 11A** mostra exemplos dos produtos de PCR obtidos, cujos tamanhos variaram de 200 a 2500pb. Para determinarmos se as bandas de tamanhos iguais representavam um mesmo inserto e, com isso, excluirmos os clones repetidos dos sequenciamentos posteriores, digerimos os produtos de PCR com as enzimas *HaeIII* e *HinfI*, que reconhecem sítios de restrição de quatro pares de base, e analisamos os mapas de restrição (**figura 11B**). Os mapas das colunas 3, 7 a 11 e 14, por exemplo, mostram que os produtos amplificados correspondem a um mesmo inserto e, sendo assim, selecionamos apenas um deles para o sequenciamento.

Para alguns dos clones selecionados na varredura da biblioteca, não conseguimos amplificar o inserto presente no vetor pJG4-5 a partir dos lisados de leveduras. Sendo assim, extraímos os plasmídeos dos clones e realizamos PCRs utilizando *primers* específicos para as regiões flanqueadoras do sítio de clonagem do vetor pJG4-5. Em seguida, sequenciamos os produtos das amplificações. Em alguns casos, também transformamos os vetores pJG4-5/cDNA em bactérias para a posterior purificação dos plasmídeos e o sequenciamento dos mesmos.

Com o objetivo de verificar se as sequências dos cDNAs da biblioteca haviam sido clonadas em fase com a sequência do domínio B42 no vetor pJG4-5, analisamos as partes iniciais dos cromatogramas de sequenciamento em busca do sítio de restrição da enzima *EcoRI*, que foi utilizada para as clonagens dos cDNAs da biblioteca no vetor. Após a confirmação da clonagem em fase, utilizamos o programa *BLASTN* (*Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide*) e o banco de dados do genoma e dos transcritos humanos para identificarmos os clones selecionados. Com isso, obtivemos uma lista de cinquenta e uma proteínas candidatas (**ANEXO I**) expressas em tumores de próstata que interagiam com o antígeno CTSP-1 em leveduras. A partir de dados da literatura que demonstravam uma atuação das proteínas candidatas em processos biológicos importantes para as células tumorais (tais como proliferação, migração e apoptose) e da disponibilidade de anticorpos comerciais específicos

contra essas proteínas, selecionamos trinta e uma delas para as validações de sua interação com CTSP-1 pelo método de interação cruzada.

4.2. Validação das interações CTSP-1/proteínas candidatas

4.2.1. Validação das interações CTSP-1/candidatas pelo ensaio de interação cruzada

Para excluirmos os candidatos falso-positivos que apresentaram os fenótipos de clones positivos devido a mutações revertentes para a marca LEU2 ou a efeitos metabólicos indiretos ainda desconhecidos (SEREBRIISKII et al. 2000), realizamos o ensaio de interação cruzada, que consiste em recuperar os vetores pJG4-5/cDNA dos clones duplo-positivos e re-transformá-los em leveduras EGY48 para depois ser repetido o processo de acasalamento com as leveduras RFY206 contendo os vetores pSH18-34 e pGilda/CTSP-1. Nesse ensaio, os clones falso-positivos são excluídos porque não reproduzem os fenótipos observados inicialmente (**figura 12**).

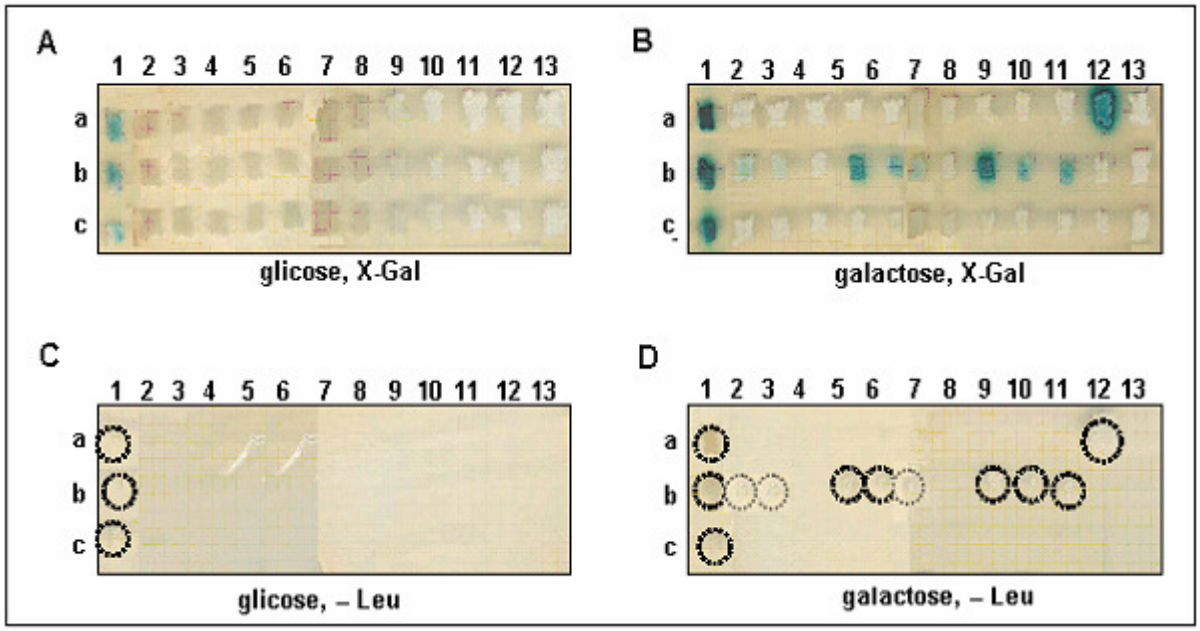

Figura 12 – *Exemplo de ensaio de interação cruzada.* Ensaio realizado para a validação das interações CTSP-1/proteínas candidatas em leveduras. Leveduras EGY48 transformadas com pJG4-5 contendo (1) ZBTB16, (2) YWHAZ, (3) YWHAB, (4) TPT1, (5) RYBP, (6) RSF1, (7) PSMC3, (8) NFKB1, (9) MDFI, (10) CTCF, ou (11) BACH-1, ou transformadas com (12) pTarget ou (13) pJG4-5 vazio foram plaqueadas em linhas verticais e leveduras RFY206 transformadas com (a) pSH18-34 + pBait, (b) pSH18-34 + pGilda/CTSP-1, ou (c) pSH18-34 + pGilda foram plaqueadas em linhas horizontais. Os fenótipos das leveduras diploides resultantes dos acasalamentos entre essas cepas foram analisados em quatro meios de cultura seletivos: (**A**) SD(glicose) -Ura -His -Trp contendo X-Gal; (**B**) SD(galacatose/rafinose) -Ura -His -Trp contendo X-Gal; (**C**) SD(glicose) -Ura -His -Trp -Leu; e (**D**) SD(galactose/rafinose) -Ura -His -Trp -Leu. Em (**C**) e (**D**), as leveduras que cresceram foram circulados para facilitar a visualização.

A **figura 12** mostra um exemplo de resultado obtido no ensaio de interação cruzada. Uma vez que a expressão das proteínas híbridas LexA/CTSP-1 e B42/proteína candidata é regulada por um promotor induzível por galactose, os clones lacZ$^+$, em um meio seletivo para os diploides (-Ura -His -Trp) contendo X-Gal, não sofrem alteração de cor na presença de glicose (**figura 12A**) e desenvolvem uma coloração azul na presença de galactose (**figura 12B**). Os clones LEU2$^+$, por sua vez, em meio seletivo para os diploides (-Ura -His -Trp) e para as interações (-Leu), não crescem na presença de glicose (**figura 12C**), mas crescem na presença de galactose (**figura 12D**). Como observamos na **figura 12**, as leveduras diploides expressando

as proteínas candidatas BACH-1, CTCF, MDFI, PSMC3, RSF1, RYBP, YWHAB e YWHAZ (colunas 11, 10, 9, 7, 6, 5, 3 e 2, respectivamente) foram capazes de reproduzir o fenótipo $lacZ^+$ e $LEU2^+$ nos ensaios de interação cruzada, sugerindo que essas proteínas realmente são capazes de interagir com CTSP-1 quando expressas em leveduras. As leveduras com expressão da proteína ZBTB16 (coluna 1) apresentaram ativação dos repórteres mesmo na presença de glicose e, portanto, essa proteína candidata foi excluída das análises. As leveduras com expressão de TPT1 e NFKB1 (colunas 4 e 8, respectivamente) não apresentaram alterações de fenótipos na presença de galactose; sendo portanto excluídas das análises por representarem candidatos falso-positivos. As células diploides resultantes do acasalamento entre as leveduras RFY206 contendo os vetores pSH18-34 e pBait e as leveduras EGY48 contendo o vetor pTarget (diploides da coluna 12/linha a) foram utilizadas como controles positivos do experimento, pois as proteínas Bait e Target são capazes de interagir entre si, restaurando a atividade do fator transcricional. Os diploides formados pelo acasalamento entre as leveduras RFY206 contendo pSH18-34 e pGilda vazio e as leveduras EGY48 contendo pJG4-5 vazio (diploides da coluna 13/linha c) foram utilizados como controles negativos. Ao todo, por meio do ensaio de interação cruzada, validamos a interação de CTSP-1 com 16 das 31 proteínas analisadas em leveduras (**tabela 3**).

Tabela 3 – *Proteínas candidatas analisadas no ensaio de interação cruzada*

Proteína *	Nome completo da proteína
BACH1	***BTB and CNC homology 1***
BAG5	*BCL2-associated athanogene 5*
BAT2D1	***BAT2 domain containing 1***
CTCF	***CCCTC-binding factor***
DNAJA2	*DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 2*
FLNB	*filamin B, beta*
GSDML	*gasdermin-like*
HSP90B1	*heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member*
HSPD1	*heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)*
MDFI	***MyoD family inhibitor***
MORG1	*mitogen-activated protein kinase organizer 1*
MUC20	***Mucin 20, cell surface associated***
N4BP1	***Nedd4 binding protein 1***
NFKB1	*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p105)*
NME3	*non-metastatic cells 3*
NOL8	*nucleolar protein 8*
PPM1A	***protein phosphatase 1A (formerly 2C)***
PSMC3	***proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 3***
PSMD4	***proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 4***
RSF1	***remodeling and spacing factor 1***
RYBP	***RING1 and YY1 binding protein***
SSR1	***Signal sequence receptor, alpha (translocon-associated protein alpha***
SSU72	*SSU72 RNA polymerase II CTD phosphatase homolog (S. cerevisiae)*
TNRC5	*trinucleotide repeat containing 5*
TPT1	*Tumor protein, translationally-controlled 1*
TTC1	***tetratricopeptide repeat domain 1***
USP1	***ubiquitin specific peptidase 1***
YWHAB	***tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, beta***
YWHAZ	***tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta***
ZBTB16	*zinc finger and BTB domain containing 16*
ZCRB1	*zinc finger CCHC-type and RNA binding motif 1*

** As proteínas escritas em negrito são as que tiveram sua interação com CTSP-1 validada em levedura pelo ensaio de interação cruzada; as demais são falso-positivas.*

Dentre as dezesseis proteínas candidatas validadas pelo ensaio de interação cruzada, selecionamos a proteína CTCF para dar continuidade a esse trabalho porque sua interação com CTSP-1 foi inicialmente observada também em linhagem celular tumoral humana pelo

ensaio de GST-*pulldown*, descrito no próximo item. Além disso, dados da literatura a respeito das funções biológicas de CTCF nos motivaram a analisar sua possível interação com o antígeno CTSP-1.

É importante destacar que todos os quatro clones duplo-positivos ($lacZ^+$ e $LEU2^+$) de CTCF que identificamos no ensaio de duplo-híbrido em leveduras geraram um produto de PCR de aproximadamente 950pb, que, como foi visto por sequenciamento, codifica a região N-terminal de CTCF (dados não apresentados). Apesar das similaridades estruturais entre CTCF e BORIS, essas proteínas possuem regiões N-terminais diferentes entre si e, por isso, baseados nesses dados, não podemos assumir que CTSP-1 também interaja com BORIS.

4.2.2. Validação da interação CTSP-1/CTCF por *GST-pulldown*

A interação entre CTSP-1 e CTCF, inicialmente validada em leveduras, foi avaliada, em seguida, pelo ensaio de *GST-pulldown* utilizando o extrato proteico de células de uma linhagem tumoral humana.

Para a realização desse ensaio, inicialmente, expressamos as proteínas GST (Glutationa S-transferase) e CTSP-1/GST em bactérias *E. coli*. Ambas as proteínas se encontravam nas frações solúveis dos lisados bacterianos. Assim, após a incubação das *beads* de glutationa-sefarose com as frações solúveis dos lisados de bactérias expressando GST ou CTSP-1/GST, incubamos as *beads* lavadas com o extrato proteico total da linhagem celular de melanoma A2058. Em seguida, após lavarmos as *beads* com tampão, eluímos as amostras e as analisamos por *Western Blot* utilizando o anticorpo anti-CTCF (**figura 13**).

A linhagem A2058 foi escolhida para a realização dos ensaios de *pulldown* porque havíamos verificado por RT-PCR e *Western Blot* que tanto o transcrito quanto a proteína CTCF, respectivamente, são abundantemente expressos nessa linhagem.

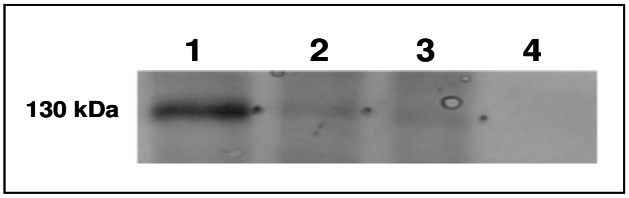

Figura 13 – *Validação da interação CTSP-1/CTCF em linhagem celular tumoral humana*. O *Western Blot* foi realizado com o anticorpo anti-CTCF. 1 - *input* (extrato proteico total de A2058); 2 – *pulldown* realizado com CTSP-1/GST e 40µl de *beads*; 2 – *pulldown* realizado com CTSP-1/GST e 30µl de *beads*; 4 - *pulldown* realizado com GST e 40µl de *beads*. A seta indica o tamanho esperado para a proteína CTCF (~ 130kDa).

Como podemos observar na **figura 13**, uma banda de tamanho esperado para CTCF (~130kDa) foi detectada apenas nas colunas do *input* (controle positivo) e dos *pulldowns* com CTSP-1/GST (colunas 2 e 3 da **figura 13**), não sendo observada no *pulldown* com GST (coluna 4 da **figura 13**). Esses dados indicam que a proteína CTSP-1 é capaz de interagir com CTCF também em linhagem celular tumoral humana, o que corrobora com o resultado do sistema duplo-híbrido em leveduras.

4.3. Análise do perfil de expressão de um painel de genes CT e de CTCF em linhagens celulares tumorais

Como foi descrito na introdução desse trabalho, dados da literatura mostraram que CTCF e BORIS são capazes de regular a expressão de genes CT (HONG et al. 2005; VATOLIN et al. 2005; KANG et al. 2007; KOUPRINA et al. 2007). Dois desses trabalhos mostraram que os promotores de genes CT – mais especificamente de NY-ESO-1 e de MAGE-A1 – apresentam sítios de ligação para CTCF/BORIS e que a troca de CTCF por BORIS nesses sítios leva à des-repressão dos genes CT (HONG et al. 2005; VATOLIN et al. 2005). O mecanismo que regula a troca de CTCF por BORIS na região promotora dos CT ainda é desconhecido. Sabe-se que as proteínas CTCF e BORIS apresentam o mesmo domínio central de ligação ao DNA, mas que possuem regiões N- e C-terminais diferentes, podendo, assim,

apresentar proteínas parceiras e/ou modificações pós-traducionais diferentes e, com isso, atuar de modos distintos entre si. Nesse contexto e diante dos nossos dados de duplo-híbrido e de *pulldown*, que evidenciaram que CTSP-1 é capaz de interagir com CTCF, nos questionamos se o antígeno CTSP-1 era capaz de modular a atividade de CTCF e de interferir na competição entre CTCF e BORIS pela ligação ao promotor de alguns genes CT, participando, desse modo, na regulação da expressão desses genes em células tumorais.

Frente a essa questão, inicialmente, buscamos analisar, por RT-PCR, se existia uma correlação dos perfis de expressão de CTSP-1, de CTCF e de BORIS com os perfis de expressão de 14 genes CT em 22 linhagens tumorais derivadas de diferentes tipos histológicos de tumores. Analisamos todos os produtos das amplificações em gel de acrilamida corado com prata. As reações foram feitas em duplicata e em casos de resultados diferentes para um mesmo transcrito, fizemos uma reação adicional.

Os resultados obtidos nas RT-PCRs estão mostrados na **tabela 4**. Podemos ver nas últimas três linhas dessa tabela que os dois genes CT GAGE e SSX-1 e também CTCF são expressos em todas as linhagens celulares tumorais analisadas.

Tabela 4 – *Perfil de expresssão de genes CT , de BORIS e de CTCF em linhagens celulares tumorais dividas de acordo com a expressão de CTSP-1 e de BORIS*

	Grupo 1: CTSP-1+ e BORIS+							Grupo 2: CTSP-1- e BORIS+								Grupo 3: CTSP-1- e BORIS-						
GENE	DU145	A172	H1155	SAOS2	U266	A2058	SKLC17	CASKI	MDA436	SW480	A549	H358	SKMEL25	MDA231	H1299	HL60	FADU	T98G	MCF7	HeLa	SCABER	PC3
CTSP-1	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+
BORIS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–
BAGE-1	–	+	+	–	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+	–	–	–	+	+	+	–
CT45	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	–	+	–
LAGE-1	–	–	–	+	+	+	+	–	–	–	+	–	–	+	–	–	–	–	–	+	–	–
MAGEA1	–	+	+	+	+	+	+	–	–	–	+	+	+	+	+	–	–	+	+	+	+	–
MAGEA2	–	+	+	+	+	+	+	–	+	–	+	+	+	+	+	–	–	–	–	+	+	–
MAGEA3/6	–	+	+	+	+	+	+	–	–	–	+	+	+	+	+	–	–	+	–	+	+	–
MAGEA4	–	–	+	+	+	+	+	–	+	–	–	–	–	–	+	–	+	–	–	–	+	–
MAGEA10	–	+	+	+	+	+	+	–	+	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–
MAGEA12	–	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	–	–	+	–	+	+	–
MAGEC1	+	–	+	+	+	+	+	–	–	+	–	–	+	+	+	–	–	+	–	–	–	–
NY-ESO-1	–	–	–	+	+	+	+	–	–	+	–	+	+	+	+	–	–	–	+	–	+	–
PRAME	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+
GAGE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SSX-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CTCF	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

legenda
+ RT-PCR +
– RT-PCR –

Sabendo que todas as linhagens celulares tumorais expressam CTCF endógeno, as dividimos em três grupos, de acordo com o padrão de expressão de CTSP-1 e de BORIS: (grupo 1) linhagens CTSP-1$^+$ e BORIS$^+$; (grupo 2) linhagens CTSP-1$^-$ e BORIS$^+$; e (grupo 3) linhagens CTSP-1$^-$ e BORIS$^-$. Na **tabela 5**, estão indicados os três grupos de linhagens e as razões entre o número de CT expressos e o número total de CT analisados (com a exceção de GAGE e SSX-1, que são expressos em todas as linhagens analisadas) bem como as porcentagens de CT expressos em cada linhagem.

Tabela 5 – *Média de transcritos CT expressos nas linhagens celulares tumorais agrupadas de acordo com a expressão de CTSP-1 e de BORIS.*

Grupo 1 CTSP1+ e BORIS+				Grupo 2 CTSP1- e BORIS+				Grupo 3 CTSP1- e BORIS-			
linhagem		CT+ / CT total	% CT+	Linhagem		CT+ / CT total	% CT+	linhagem		CT+ / CT total	% CT+
1	DU145	3/12	25	1	CaSki	2/12	17	1	HL60	1/12	8
2	A172	8/12	67	2	MDA436	6/12	50	2	FADU	3/12	25
3	H1155	10/12	83	3	SW480	6/12	50	3	T98G	5/12	42
4	SAOS2	11/12	92	4	A549	8/12	67	4	MCF7	6/12	50
5	U266	11/12	92	5	H358	8/12	67	5	HeLa	7/12	58
6	A2058	12/12	100	6	SKMEL25	9/12	75	6	SCABER	9/12	75
7	SKLC17	12/12	100	7	MDA231	10/12	83				
				8	H1299	11/12	92				
Média		**9,6/12**	**80,0**	**Média**		**7,5/12**	**62,5**	**Média**		**5,2/12**	**43,3**

Podemos observar na **tabela 5** que as linhagens BORIS e CTSP-1 positivas (grupo 1) apresentaram um número médio de genes CT expressos [80% ou 9,6/12] maior do que as linhagens CTSP-1 negativas e BORIS positivas (grupo 2) [62,5% ou 7,5/12], que, por sua vez, apresentaram um número médio de genes CT expressos maior do que as linhagens CTSP-1 e BORIS negativas (grupo 3) [43,3% ou 5,2/12]. As porcentagens de CT expressos nos grupos 1 e 3 são estatisticamente diferentes entre si ($p < 0.03$, One-way ANOVA). Dentre as 22 linhagens tumorais analisadas, somente a PC3 (adenocarcinoma de próstata) era CTSP-1 positiva e BORIS negativa (**tabela 4**).

Esses dados, de natureza qualitativa, sugeriam que a co-expressão de CTSP-1 e de BORIS poderia estar correlacionada com um aumento significativo do número médio de genes CT sendo expressos em algumas linhagens celulares tumorais. Portanto, era possível que CTSP-1 e BORIS atuassem positivamente e de forma cooperativa no controle da expressão de alguns CT. Isso estaria de acordo com nossa hipótese inicial de que CTSP-1 seria capaz de modular a atividade de CTCF, interferindo, dessa forma, na regulação da expressão de genes CT mediada por CTCF e BORIS. Diante desses dados preliminares, então, decidimos avaliar de forma mais sistemática o impacto da superexpressão de CTSP-1 sobre os níveis de expressão de antígenos CT.

4.4. Superexpressão de CTSP-1/HA na linhagem tumoral H1299

Com o objetivo de avaliar funcionalmente a interação entre CTSP-1 e CTCF e analisar o impacto da superexpressão de CTSP-1 sobre o perfil de expressão de antígenos CT, optamos por superexpressar CTSP-1 na linhagem humana de adenocarcinoma de pulmão H1299. Escolhemos essa linhagem porque ela não expressa níveis detectáveis de CTSP-1 (**tabela 4** e coluna 9 da **figura 14**), mas expressa níveis constitutivos de CTCF e de BORIS (**tabela 4**) e também porque essa foi a linhagem utilizada no trabalho em que HONG et al. (2005) demonstraram que CTCF e BORIS podem regular a expressão do antígeno CT NY-ESO-1.

Para a superexpressão estável de CTSP-1, transfectamos células H1299 com a construção pcDNA3/CTSP-1/HA, a qual permite a expressão da proteína CTSP-1 fusionada ao epítopo de hemaglutinina (CTSP-1/HA). Em seguida, por diluição limitante e utilizando o antibiótico neomicina, selecionamos clones superexpressando CTSP-1/HA estavelmente e clones transfectados com o vetor pcDNA3/HA (clones vetor vazio). Por fim, analisamos os níveis de expressão de CTSP-1/HA utilizando o anticorpo anti-HA em ensaios de *Western Blot* (exemplos na **figura 14**).

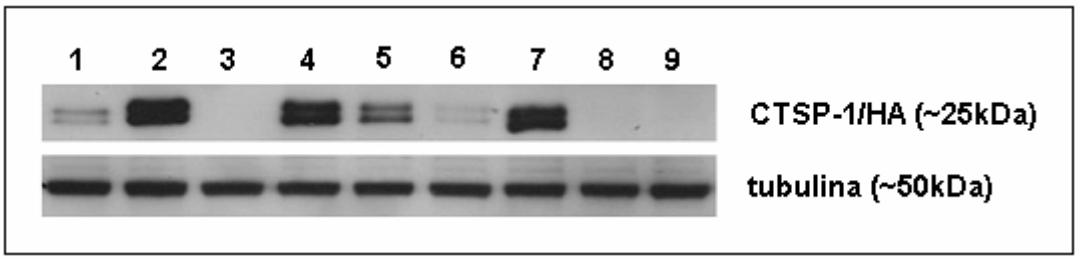

Figura 14 – *Avaliação da superexpressão da proteína CTSP-1/HA em clones de H1299.* O *Western Blot* foi realizado com os extratos proteicos totais das células. O anticorpo anti-HA foi utilizado para a detecção da proteína CTSP-1/HA (~25 kDa) e o anticorpo contra a tubulina (~50kDa) foi utilizado para o controle de carregamento das das amostras no gel. **1** a **8** – extratos proteicos totais de clones de H1299 transfectados estavelmente com o vetor pcDNA3/CTSP-1/HA **9** – extrato proteico total de células H1299 parentais. Foram detectadas duas bandas específicas de CTSP-1/HA, cujos tamanhos eram semelhantes entre si (~25 kDa e ~28 kDa).

Como mostrado na **figura 14**, obtivemos alguns clones de H1299 superexpressando a proteína CTSP-1/HA. Em todos esses clones, detectamos duas formas da proteína, cujos tamanhos eram bastante semelhantes (~25 kDa e ~28kDa). Possíveis explicações para a existência dessas duas formas de CTSP-1/HA são: (1) a proteína sofre algum tipo de modificação pós-traducional, como fosforilação ou glicosilação, existindo nas células em sua forma modificada e não-modificada, o que já foi descrito para outras proteínas por MUSIL et al. (1990) e WATANABE et al. (2004), por exemplo; ou (2) duas isoformas da proteína CTSP-1/HA podem ser expressas devido à existência de um sítio alternativo de tradução localizado *downstream* ao códon AUG inicial do transcrito CTSP-1/HA (KOZAK 1991).

A partir das análises de *Western Blot*, selecionamos clones de H1299 superexpressando CTSP-1/HA (denominados de CT-A10, CT-B1, CT-C1, CT-E9, CT-F9 e CT-H10) e clones vetor vazio (denominados de VV-H6, VV-H8, VV-H9, VV-H10, VV-H14 e VV-H20) como as ferramentas celulares para os estudos funcionais subsequentes. De maneira complementar, quantificamos os níveis de expressão de CTSP-1/HA nesses clones por citometria de fluxo utilizando o anticorpo primário anti-HA e um anticorpo secundário conjugado ao fluoróforo Alexa Fluor 488 (**figura 15**).

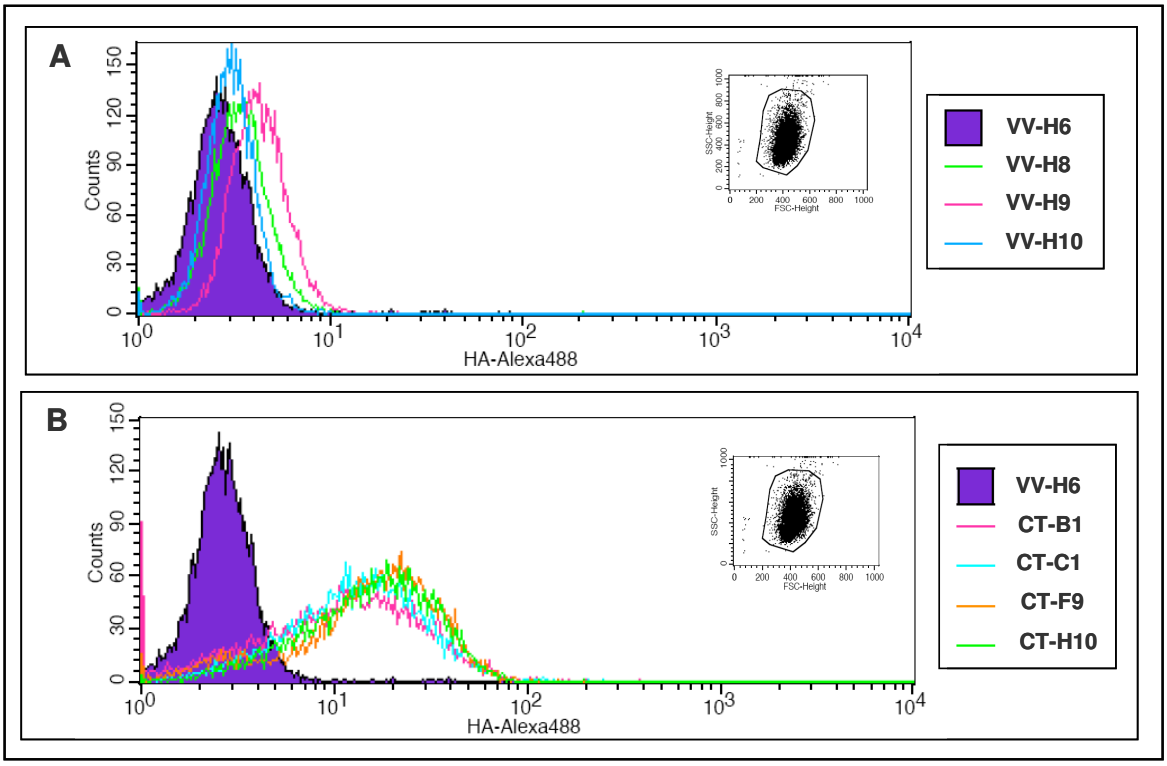

Figura 15 – *Citometria de fluxo de clones H1299 vetor vazio e superexpressando a proteína CTSP-1/HA imuno-marcados com anti-HA.* Foi utilizado um anticorpo secundário conjugado a Alexa 488. Os histogramas representam o número de células em função da intensidade de fluorescência emitida para cada amostra, em escala logarítmica. (**A**) clones de H1299 vetor vazio (VV-H6, -H8, -H9, -H10). (**B**) clones de H1299 superexpressando CTSP-1/HA (CT-A10, -B1, -C1, -F9 e -H10). Foram analisadas 10.000 células *gated* (*dot blot* ao lado de cada histograma) para cada amostra. Os histogramas preenchidos em roxo representam o controle negativo (i.e. clone VV-H6 sem prévia incubação com anti-HA).

Podemos observar na **figura 15A** que todos os clones H1299 vetor vazio eram negativos para a CTSP-1/HA, enquanto que os clones H1299 superexpressando CTSP-1/HA apresentaram níveis variados de expressão dessa proteína (**figura 15B**). Curiosamente, apesar de suas origens clonais, notamos uma ampla variação intraclonal nos níveis de expressão de CTSP-1/HA em todas as quatro populações analisadas (**figura 15B**). Apesar de essa variação indicar a existência de uma heterogeneidade intraclonal quanto ao nível de expressão de CTSP-1/HA, todos os quatro clones apresentaram um perfil de expressão de CTSP-1/HA monomodal, o que reforça a origem clonal das células.

4.5. Localização subcelular de CTSP-1/HA e de CTCF endógena em H1299

Para que proteínas possam interagir fisicamente *in vivo*, obviamente é necessário que elas estejam localizadas próximas entre si. Portanto, a fim de determinar a localização subcelular das proteínas CTSP-1 exógena e CTCF endógena e de verificar se elas co-localizam, utilizamos o clone CT-C1, que superexpressa CTSP-1/HA, em ensaios de imunocitoquímica com detecção por imunofluorescência. Para isso, utilizamos os anticorpos primários anti-HA e anti-CTCF, reconhecidos pelos anticorpos secundários conjugados a Alexa Fluor 568 (vermelho) e 488 (verde), respectivamente. Como controle da especificidade de expressão de CTSP-1/HA, utilizamos as células H1299 do clone VV-H6, que haviam sido transfectadas com o vetor vazio. Em seguida, capturamos imagens das células em microscópio confocal (**figura 16**).

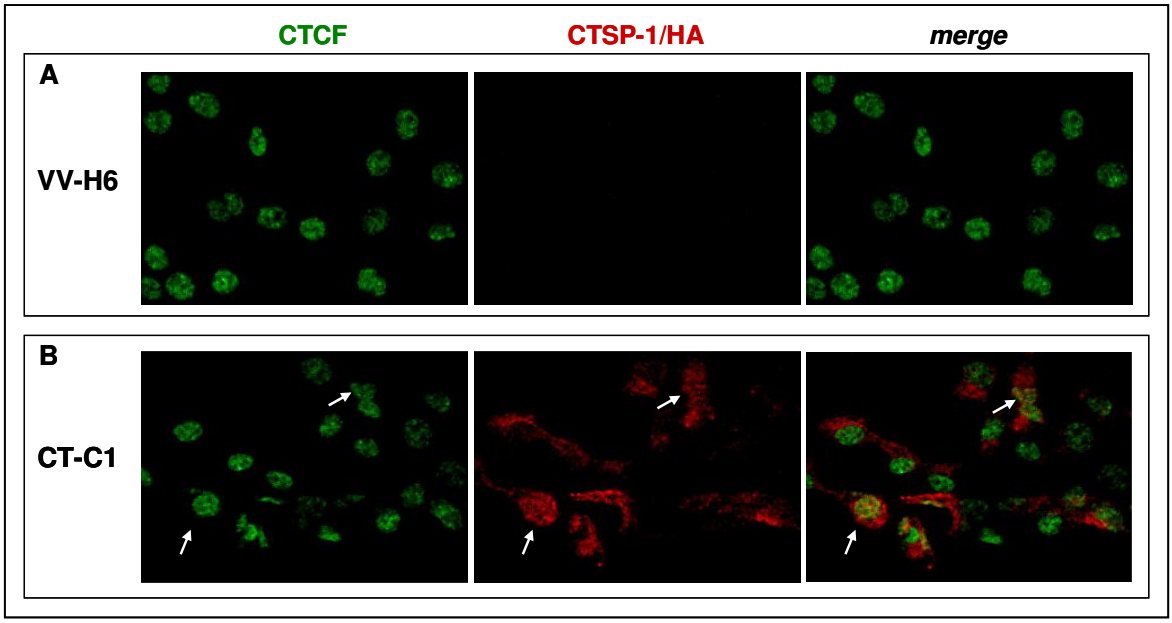

Figura 16 – *Localização subcelular de CTSP-1/HA exógena e CTCF endógena em células dos clones de H1299.* Células dos clones (**A**) VV-H6 e (**B**) CT-C1 foram imuno-marcadas com os anticorpos primários anti-CTCF e anti-HA, reconhecidos, respectivamente, pelos anticorpos secundários conjugados a Alexa Fluor 488 (verde) e Alexa Fluor 568 (vermelho). As setas indicam células em que CTSP-1/HA e CTCF co-localizam-se no núcleo. Observa-se uma heterogeneidade nos níveis de expressão de CTSP-1/HA nas células do clone CT-C1. As imagens são representativas das células analisadas e foram capturadas em microscópio confocal.

Como podemos observar na **figura 16**, a proteína CTCF endógena apresentou expressão constitutiva em todas as células H1299 com uma localização restrita aos núcleos, o que já havia sido mostrado por trabalhos com CTCF em outras linhagens celulares (ZHANG et al. 2004; DOCQUIER et al. 2005; KANG et al. 2007). Já a proteína CTSP-1/HA apresentou localização citoplasmática na grande maioria das células, mas também foi encontrada tanto no citoplasma quanto no núcleo em cerca de 10% das células H1299. Nessa fração de células, observamos a co-localização nuclear de CTSP-1/HA e CTCF (setas na **figura 16B**). A co-localização pode ser identificada na imagem pela coloração amarela resultante da sobreposição das fluorescências verde (de CTCF) e vermelha (de CTSP-1/HA). Além disso, corroborando com os nossos resultados de citometria de fluxo (**figura 15B)**, observamos na **figura 16B** a existência de uma grande variação intraclonal nos níveis de expressão de CTSP-1/HA. Condições alternativas de permeabilização celular e de imuno-marcação, bem como a utilização de outros clones e subclones de H1299 foram testadas, mas a heterogeneidade intraclonal de expressão de CTSP-1/HA continuou sendo observada (dados não apresentados).

Com o objetivo de analisar a localização subcelular das proteínas CTCF endógena e CTSP-1/HA exógena de forma mais detalhada, também fizemos secções transversais (YZ e XZ) de células do clone H1299 CT-C1 imuno-marcadas contra as proteínas CTCF endógena (em verde) e CTSP-1/HA exógena (em vermelho) (**figura 17A**). Analisamos também a correlação da intensidade das fluorescências de emissão verde e vermelha bem como da de DAPI (corante de DNA, em azul) em células apresentando ou não a co-localização dessas proteínas (**figura 17B**).

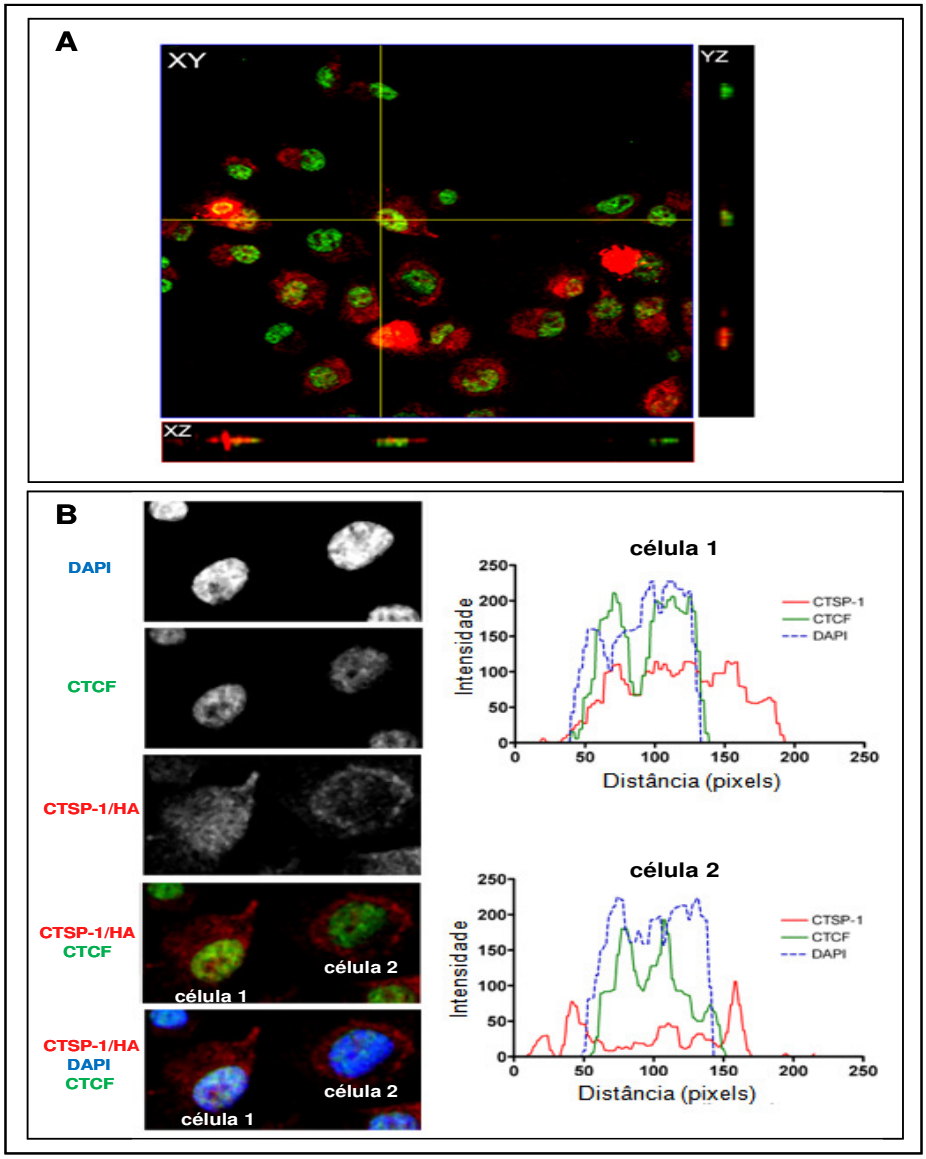

Figura 17 – *Análise da co-localização das proteínas CTCF endógena e CTSP-1/HA exógena.* **A** – secções transversais (YZ e XZ) das linhas amarelas traçadas na população de células do clone H1299 CT-C1. Células H1299 do clone CT-C1 foram imuno-marcadas contra as proteínas CTCF endógena (verde) e CTSP-1/HA exógena (vermelha). A partir da imagem da secção óptica XY, foram feitas secções transversais (YZ e XZ) das linhas amarelas, sendo observadas células co-localizando e não-co-localizando as proteínas no núcleo celular. **B** – à esquerda estão mostradas as imagens das células do clone H1299 CT-C1 e à direita, os perfis de intensidade dos sinais de DAPI (que marca o núcleo em azul), de CTCF (verde) e de CTSP-1/HA (vermelho) de uma célula que apresenta co-localização das proteínas CTCF endógena e CTSP-1/HA exógena (célula 1) e de uma célula vizinha que não apresenta essa co-localização (célula 2). Os perfis de intensidade representados nos gráficos referem-se a uma linha traçada verticalmente no meio da célula 1 ou 2 da imagem inferior à esquerda (linha não mostrada). As imagens são representativas das células analisadas e foram capturadas em microscópio confocal.

A **figura 17A** mostra a existência de uma heterogeneidade em relação à co-localização das proteínas CTCF endógena e CTSP-1/HA exógena na população de células do clone H1299 CT-C1; o mesmo sendo observado em outros clones. Nessa amostragem, cerca de 19% (5/26) das células apresentaram co-localização nuclear das proteínas. A célula central das secções transversais XZ e YZ da **figura 17A**, por exemplo, apresenta pontos em amarelo no núcleo, o que evidencia a co-localização das proteínas nesse compartimento subcelular.

Conforme está mostrado na **figura 17B**, para a visualização gráfica da ocorrência ou não da co-localização de CTSP-1/HA e de CTCF no núcleo celular, construímos gráficos de perfis de fluorescência. Esse tipo de gráfico analisa o padrão de distribuição das cores vermelha, verde ou azul, pixel por pixel, em uma linha traçada sobre uma imagem no padrão de cor RGB (*Red Green Blue*). Os perfis de fluorescência foram analisados ao longo de linhas verticais traçadas nas imagens de duas células vizinhas do clone H1299 CT-C1 (células 1 e 2). Na célula 1 da **figura 17B**, a semelhança entre os perfis de intensidade das fluorescências emitidas por CTSP-1/HA (em vermelho), por CTCF (em verde) e por DAPI (em azul) evidencia que essas duas proteínas podem co-localizar no núcleo celular, o que também pode ser observado na imagem dessa célula. Ao contrário, os perfis de fluorescência dessas proteínas observados na célula 2 da **figura 17B** são bastante diferentes entre si. Isso também pode ser visto na imagem da célula 2, na qual CTCF localiza-se apenas no núcleo e CTSP-1/HA apenas no citoplasma. Esses dados evidenciam que células H1299 vizinhas, de origem clonal, expressando CTSP-1/HA e mantidas em condições ideais de cultivo *in vitro*, apresentam padrões distintos de localização subcelular de CTSP-1, o que indica a possibilidade dessa proteína co-localizar com seu ligante CTCF.

4.6. Translocação de CTSP-1 entre o núcleo e o citoplasma

Diante dos dados do item anterior, nos questionamos se a proteína CTSP-1 poderia estar sofrendo uma translocação entre o citoplasma e o núcleo das células H1299. A fim de verificar essa hipótese em células vivas, independentemente da necessidade de anticorpos para detecção de CTSP-1, geramos células da linhagem H1299 expressando a proteína CTSP-1 em fusão com GFP (*Green Fluorescent Protein*) (CTSP-1/GFP). Células H1299 expressando CTSP-1/GFP foram plaqueadas em lamínulas e mantidas em condições ideais de cultivo e em sub-confluência (60-70% da confluência máxima). A localização subcelular de CTSP-1/GFP em células vivas foi acompanhada e fotografada periodicamente ao longo de 7 horas (**figura 18**).

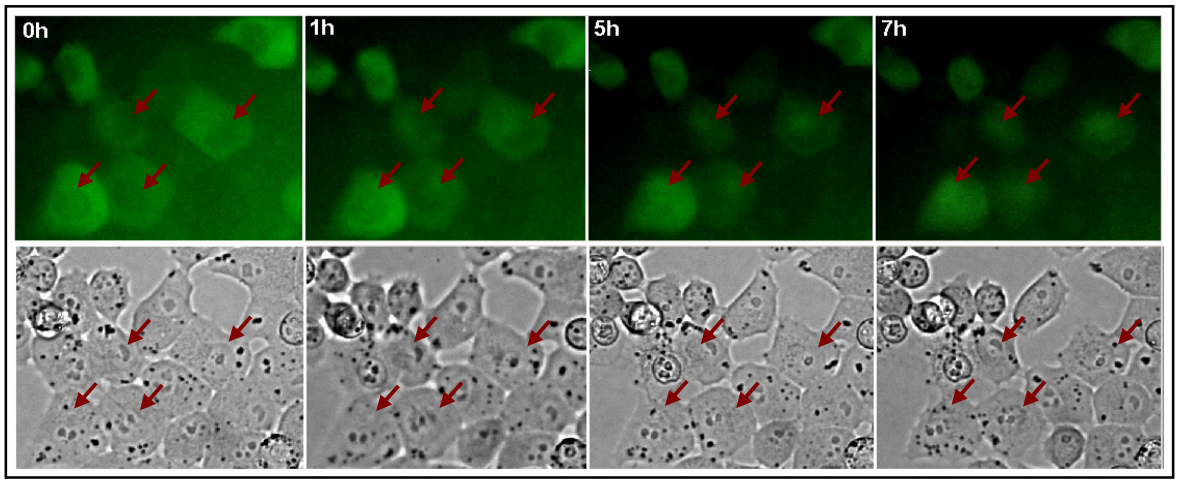

Figura 18 – *Translocação citoplasma/núcleo da proteína CTSP-1/GFP ao longo de 7h.* Células da população H1299 expressando estavelmente a proteína CTSP-1/GFP foram acompanhadas e fotografadas periodicamente ao longo de 7 horas. As fotografias mostradas referem-se aos tempos de 0, 1, 5 e 7 horas. **A –** microscopia de fluorescência. **B –** microscopia de luz visível. Como está indicado pelas setas, a proteína CTSP-1/GFP sofre uma translocação do citoplasma para o núcleo das células da linhagem tumoral H1299. Aumento de 300x.

A **figura 18** mostra que, no tempo 0h, a proteína CTSP-1/GFP apresentou uma localização predominantemente citoplasmática nas células H1299, com núcleos apresentando uma intensidade de fluorescência verde visivelmente próxima àquela do *background.* Nessa mesma figura, a cinética ao longo de 7h mostra um aumento progressivo de CTSP-1/GFP

nuclear, sugerindo que essa proteína transloca-se do citoplasma para o núcleo das células H1299.

4.7. Avaliação do impacto da superexpressão de CTSP-1/HA sobre a regulação da expressão de genes CT em H1299

4.7.1. Avaliação do impacto da superexpressão de CTSP-1/HA sobre a atividade do promotor simplificado de NY-ESO-1 em H1299

Para avaliarmos o papel de CTSP-1 na regulação da expressão de antígenos CT, escolhemos o CT NY-ESO-1 como modelo de estudo. Inicialmente, analisamos o impacto da superexpressão de CTSP-1 sobre a atividade do promotor simplificado de NY-ESO-1 por meio do ensaio de gene repórter luciferase.

Nesse ensaio, utilizamos a construção pGL3Basic/ESO-826, que apresenta a região do promotor de NY-ESO-1 contendo o sítio de ligação comum a CTCF e BORIS (denominado fragmento E3 por HONG et al. 2005) clonada *upstream* ao gene da *Firefly luciferase*. Utilizamos também o vetor pCMV/βGal, que permite a expressão constitutiva da enzima β-galactosidase, para a normalização dos resultados de medida de atividade da *Firefly luciferase*. Inicialmente, co-transfectamos esses dois vetores em células de três clones H1299 vetor vazio (clones VV-H6, -H8 e -H9) e de três clones H1299 superexpressando a proteína CTSP-1/HA (clones CT-B1, -C1 e -E9). Em seguida, após as leituras das atividades da luciferase e da β-galactosidase, normalizamos os valores e construímos o gráfico com os valores relativos de atividade do promotor simplificado de NY-ESO-1 (**figura 19**).

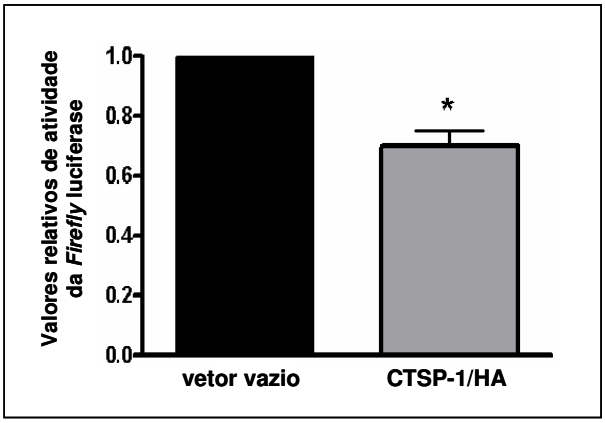

Figura 19 – *Análise do impacto da superexpressão de CTSP-1/HA sobre a atividade do promotor simplificado de NY-ESO-1.* Três clones H1299 vetor vazio (barra em preto; clones VV-H6, VV-H8 e VV-H9) e três clones H1299 superexpressando CTSP-1/HA (barra em cinza; clones CT-B1, CT-C1 e CT-E9) foram co-transfectados com pCMVβ/Gal e pGL3/ESO-826. Células controle foram transfectadas apenas com um dos vetores. Cerca de 48h após as transfecções, as células foram lisadas e as atividades da *firefly luciferase* e da β-galactosidase foram medidas. Os ensaios de luciferase foram feitos em triplicatas amostrais e experimentais e as médias de atividade da *firefly luciferase* foram calculadas e relativizadas pela atividade da β-galactosidase. Os valores foram posteriormente normalizados para os clones H1299 vetor vazio (* p = 0,002; Mann /Whitney).

A **figura 19** mostra que o grupo de clones H1299 superexpressando CTSP-1/HA apresentou uma redução significativa, de aproximadamente 30%, na atividade do promotor simplificado de NY-ESO-1 em comparação com os clones vetor vazio (p = 0,002).

4.7.2. Avaliação do impacto da superexpressão de CTSP-1/HA sobre os níveis endógenos de expressão de NY-ESO-1 em H1299

Para avaliarmos se havia um efeito da superexpressão de CTSP-1/HA sobre o nível de expressão de NY-ESO-1 endógeno, inicialmente, utilizamos seis clones H1299 vetor vazio e seis clones superexpressando a proteína em experimentos de PCR em tempo real e de *Western Blot* (**figura 20**).

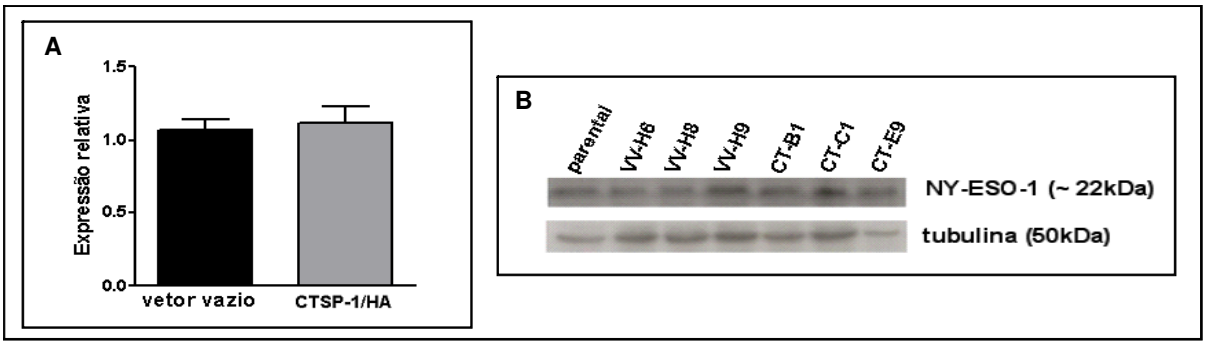

Figura 20 – *Análise do nível de expressão de NY-ESO-1 (~22 kDa) nos clones de H1299.* **A** – PCR em tempo real dos níveis de expressão de NY-ESO-1 nos clones H1299 contendo pcDNA3/HA (vetor vazio) e clones superexpressando a proteína CTSP-1/HA (CTSP-1/HA) ($p > 0,05$, One-Way ANOVA). **B** – *Western Blot* para análise do nível de expressão da proteína NY-ESO-1 endógena utilizando os extratos proteicos totais de células H1299 parentais e de três clones de cada grupo. A tubulina (50 kDa) foi analisada como um controle de *loading*.

Como mostrado na **figura 20A**, não observamos uma diferença consistente nos níveis de expressão do transcrito NY-ESO-1 comparando os dois grupos de clones entre si. Esse dado foi corroborado pelos resultados de *Western Blot*, realizado com o anticorpo anti-NY-ESO-1 (**figura 20**), que sugeriram não haver uma associação entre os níveis de expressão da proteína NY-ESO-1 endógena e os níveis de CTSP-1/HA sendo expressos nos clones de H1299.

Para refinarmos os dados de *Western Blot* e confirmarmos a ausência de efeito da superexpressão estável de CTSP-1/HA sobre os níveis endógenos de NY-ESO-1, utilizamos a metodologia de citometria de fluxo, que permite medições proteicas quantitativas mais sensíveis. Para isso, imuno-marcamos as células dos clones CT-B1 e CT-C1 com os anticorpos: anti-NY-ESO-1 (reconhecido por um anticorpo secundário conjugado a Alexa Fluor 488) e anti-HA (reconhecido por um anticorpo secundário biotinilado, o qual, por sua vez, é reconhecido pela streptavidina conjugada à aloficocianina). Também utilizamos o clone VV-H6 como controle negativo (**figura 21B**).

Sabendo que a expressão intraclonal de CTSP-1/HA nos clones superexpressando CTSP-1/HA era muito heterogênea (**figuras 15** e **16**), optamos por dividir as células dos clones CT-

B1 e CT-C1 em três subpopulações (S1, S2 e S3 nos *dotplots* da **figura 21 C** e **D**) de acordo com os níveis relativos de expressão de CTSP-1/HA (S1< S2 < S3). Isso permitiria detectarmos a existência de um eventual efeito dose-dependente entre os níveis de expressão de CTSP-1/HA e os níveis de expressão de NY-ESO-1 nas células H1299 (histogramas).

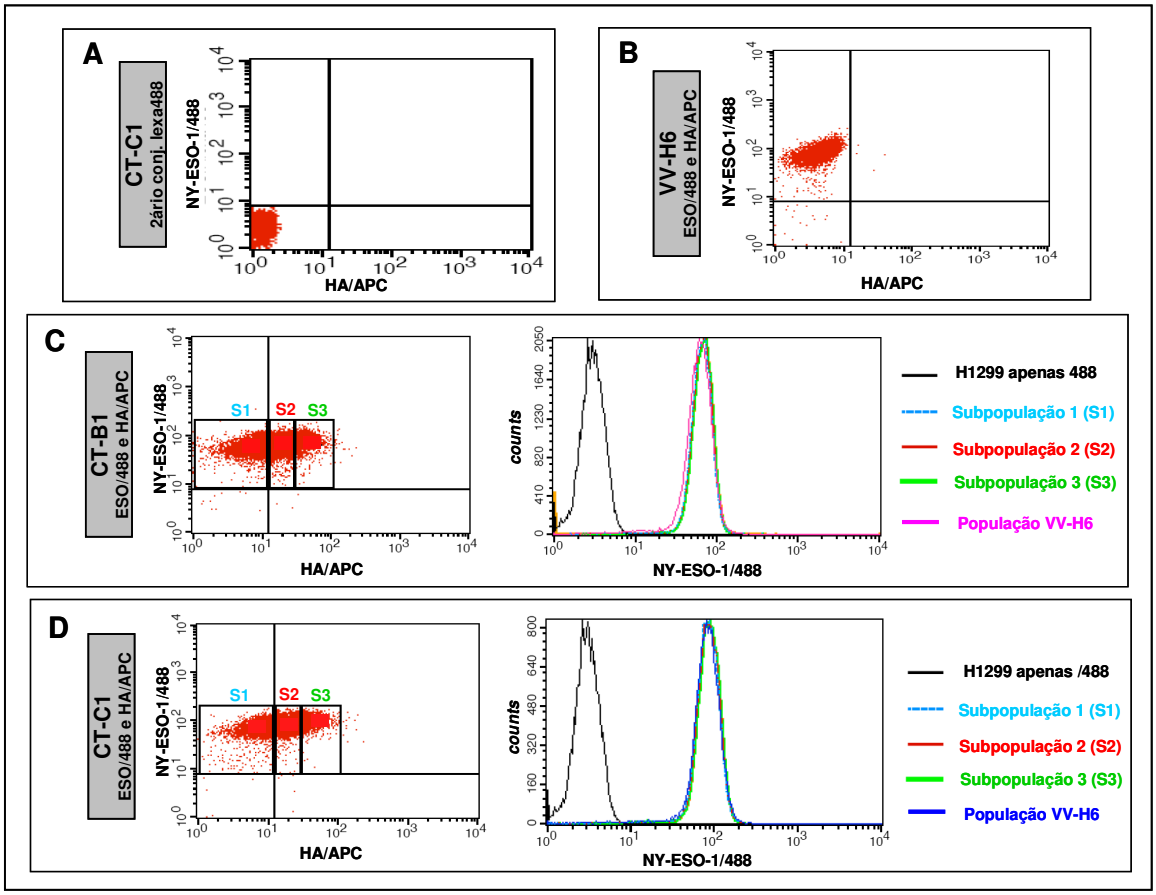

Figura 21 – *Análise de correlação entre os níveis de expressão de CTSP-1/HA e de NY-ESO-1 endógeno em clones de H1299 superexpressando CTSP-1/HA.* Células dos clones VV-H6, CT-B1 e -C1 foram imuno-marcadas e analisadas por citometria de fluxo. Os anticorpos utilizados foram o anti-HA, reconhecido por um anticorpo secundário biotinilado, que, por sua vez ,é reconhecido por estreptavidina-aloficocianina; e o anti-NY-ESO-1, reconhecido por um anticorpo conjugado a Alexa Fluor 488. **A** – clone CT-C1 incubado apenas com o anticorpo conjugado à Alexa Fluor 488 (controle negativo para a imuno-marcação com anti-NY-ESO-1). **B** a **D** – clones VV-H6, CT-B1 e -C1, respectivamente, imuno-marcados contra CTSP-1/HA e NY-ESO-1. Nos *dotplots* em **C** e **D**, as subpopulações S1, S2 e S3 correspondem a células com níveis crescentes de expressão de CTSP-1/HA (S1 < S2 < S3). Nos histogramas em **C** e **D**, o clone VV-H6 foram utilizadas como controle. A sobreposição dos histogramas das subpopulações S1, S2 e S3 bem como do histograma da população VV-H6 mostra que os níveis de expressão de NY-ESO-1 em H1299 não variaram, independente do nível de expressão de CTSP-1/HA.

Na **figura 21C**, podemos observar uma sobreposição dos histogramas de todas as subpopulações superexpressando CTSP-1/HA o que mostra, portanto, que os níveis de expressão de NY-ESO-1 não variam, independente de qual seja o nível de expressão de CTSP-1/HA nas células H1299.

Esse dado discorda daquele obtido no ensaio de repórter luciferase, no qual observamos uma redução da atividade do promotor de NY-ESO-1 nos clones superexpressando CTSP-1/HA em relação aos clones vetor vazio (**figura 19**). Uma possível explicação para essa diferença é que no ensaio de luciferase, somente um fragmento do promotor de NY-ESO-1 (fragmento E3 contendo o sítio de ligação comum a CTCF e a BORIS segundo HONG et al. 2005) foi clonado *upstream* ao gene da luciferase no vetor pGL3, ou seja, nesse experimento, a sequência do promotor de NY-ESO analisada é bastante simplificada em relação à sua sequência original e se encontra fora do seu contexto genômico nativo, o qual certamente é muito mais complexo do que o contexto do ensaio de luciferase.

4.8. Análise do impacto da superexpressão de CTSP-1/HA sobre a regulação do ciclo e capacidade clonogênica de células H1299

4.8.1. Avaliação do efeito da superexpressão de CTSP-1/HA sobre a progressão de células H1299 no ciclo

Como não observamos alterações nos níveis endógenos do CT NY-ESO-1 após a superexpressão de CTSP-1/HA na linhagem tumoral H1299, optamos por avaliar um efeito mais global dessa superexpressão sobre as atividades já descritas para CTCF nas células tumorais. Nesse sentido, já está bem estabelecido na literatura que CTCF é capaz de regular a expressão de vários genes, tais como: c-Myc, APP, BRCA-1, Igf2/H19, p16/INK4a, p19/ARF, p53, RB e TERT e, assim, atuar nos processos de diferenciação, senescência e

parada do ciclo celular, que frequentemente se encontram alterados em tumores (revisto por RECILLAS-TARGA et al. 2006; FIORENTINO e GIORDANO 2011).

Sendo assim, decidimos avaliar o efeito da superexpressão de CTSP-1/HA, 48h após a transfecção, sobre a progressão do ciclo de células H1299. Para isso, transfectamos células H1299 parentais com o vetor pcDNA3/HA vazio (vetor vazio) ou com pcDNA3/CTSP-1/HA ou ainda com o vetor pEGFP, o qual permite a expressão da proteína GFP (*Green Fluorescent Protein*). No ensaio de análise de ciclo celular, a proteína GFP serviu como um controle da especificidade dos efeitos de CTSP-1/HA sobre a distribuição das células ao longo das fases do ciclo celular distinguíveis pela metodologia de citometria de fluxo (G0/G1, S e G2/M). Após 36h da transfecção, adicionamos colcemida à metade das condições experimentais. A colcemida é um derivado da colchicina, um desestabilizador de microtúbulos capaz de reter as células na interface G2/M. A colcemida foi utilizada nesse ensaio para impedir que as células em divisão voltassem à fase G1 após a fase M, o que faria com que elas fossem confundidas com as células eventualmente impedidas a progredir por G1. Após 12h na presença ou na ausência da droga (totalizando 48h desde a transfecção), marcamos os DNAs celulares com iodeto de propídeo e, em seguida, analisamos o ciclo celular por citometria de fluxo.

Nesse ensaio, analisamos somente as células individuais (os agregados celulares foram excluídos das análises) e delimitamos duas subpopulações: as que expressavam e as que não expressavam CTSP1/HA, representadas, respectivamente, por P_{pos} e P_{neg} na **figura 22**. Em seguida, para cada uma dessas subpopulações, determinamos as porcentagens de células distribuídas em G0/G1, S e G2/M no ciclo celular e as comparamos com as células expressando a proteína controle GFP (histogramas da **figura 22**).

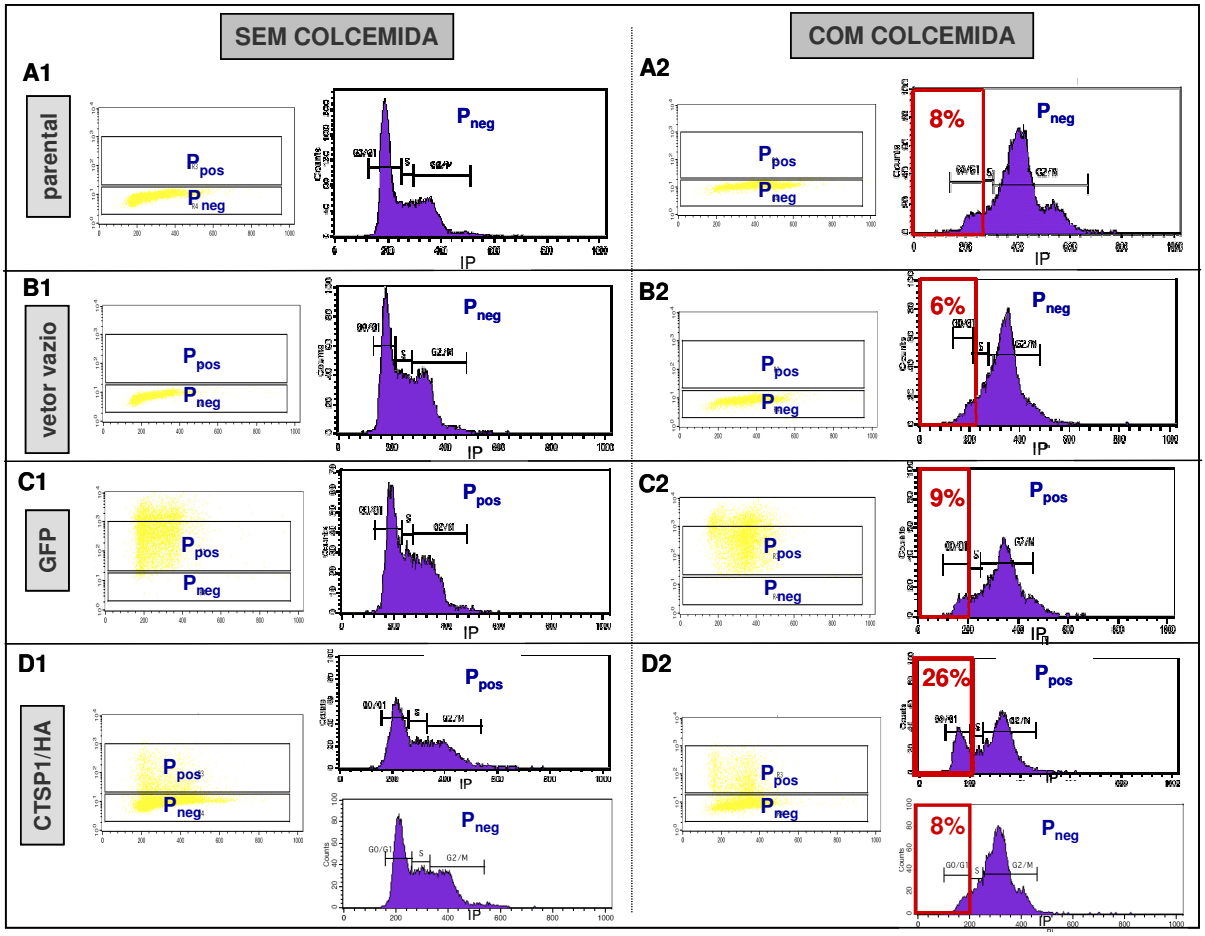

Figura 22 – *Análise do impacto da superexpressão de CTSP-1/HA após 48h da transfecção sobre o ciclo celular de H1299.* Foram analisadas: células H1299 parentais (**A1** e **A2**) e transfectadas com pcDNA3/HA (**B1** e **B2**, vetor vazio), ou pEGFP (**C1** e **C2**, GFP), ou pcDNA3/CTSP-1/HA (**D1** e **D2**, CTSP-1/HA). Após 36h das transfecções as células foram tratadas (lado direito da figura) ou não (lado esquerdoda figura) com colcemida. Após 48h das transfecções, os DNAs celulares foram marcados com iodeto de propídeo (IP) e as células, analisadas por citometria de fluxo. *Dotplot* com P_{pos} e P_{neg}: número de eventos x intensidade da fluorescência. Histogramas (em roxo): número de eventos x intensidade da fluorescência do IP. As células em G0/G1, S e G2/M foram delimitadas nos histogramas, conforme indicado. Nos histogramas do lado esquerdo (células tratadas com colcemida), as porcentagens de células em G0/G1 estão escritas em vermelho.

Como podemos observar na **figura 22**, as células controle (parental, vetor vazio e GFP) e as células transfectadas com CTSP-1/HA não tratadas com colcemida apresentaram perfis muito semelhantes de distribuição nas fases do ciclo celular. Entretanto, quando observamos as células controle tratadas com colcemida, notamos que cerca de 91 a 94% delas estava nas

fases S → G2/M do ciclo (histograma da **figura 22C2**), o que evidencia que a grande maioria delas estava progredindo no ciclo durante as horas experimentais. Já dentre as células que superexpressavam CTSP-1/HA 48h após as transfecções, apenas 74% delas estava nas fases S→ G2/M do ciclo celular. Nesse caso, observamos um pico em G0/G1, mesmo após o tratamento das células com colcemida (histograma superior da **figura 22D2**). Portanto, esses dados sugerem que a superexpressão de CTSP-1/HA 48h após as transfecções promove, direta ou indiretamente, um bloqueio ou um longo atraso do ciclo celular em G0/G1.

Em seguida, avaliamos se a superexpressão de CTSP-1/HA de forma estável também era capaz de interferir na progressão do ciclo das células H1299, assim como havíamos observado nas células superexpressando a proteína 48h após as transfecções (**figura 22D2**). Para isso, analisamos os ciclos celulares de clones superexpressando CTSP-1/HA (clones CT-B1 e -C1) comparativamente aos de clones vetor vazio (clones VV-H6 e -H8) após o tratamento ou não das células com colcemida (**figura 23**) seguida pela marcação do DNA com iodeto de propídeo.

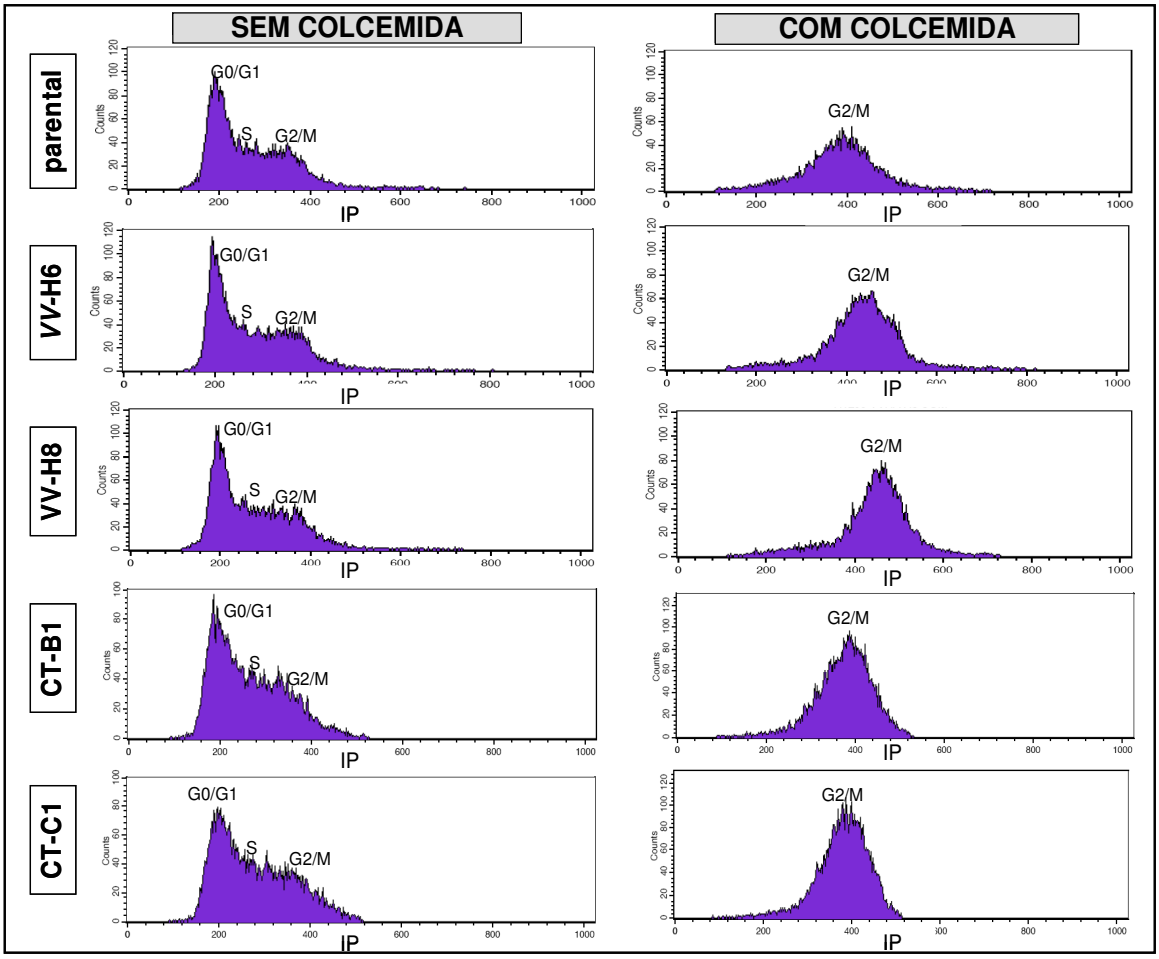

Figura 23 – *Análise do impacto da superexpressão estável de CTSP-1/HA sobre o ciclo celular de H1299.* Células de H1299 parentais, dos clones VV-H6, VV-H8, CT-B1 e CT-C1 foram tratadas (histogramas à direita) ou não (histogramas à esquerda) com colcemida durante 12h. Em seguida, os DNAs foram marcados com iodeto de propídeo (IP) e as células, analisadas por citometria de fluxo para a determinação dos ciclos celulares. Os histogramas mostram a distribuição do número de células em função da fluorescência emitida pelo IP.

Os dados da **figura 23** mostraram não haver diferenças significativas nos perfis dos ciclos das células H1299 parentais e dos clones após o seu tratamento ou não com colcemida. Como podemos observar para os clones CT-B1 e CT-C1, mesmo após o tratamento com colcemida, as células superexpressando CTSP-1/HA de forma estável não foram retidas em G0/G1, de modo contrário ao que observamos com as células superexpressando a proteína 48h após as transfecções (**figura 22D2**).

4.8.2. Avaliação do efeito da superexpressão de CTSP-1/HA sobre a capacidade clonogênica de células H1299

Sabendo que 48h após as transfecções, parte das células H1299 que superexpressam CTSP-1/HA sofrem uma retenção em G0/G1, a seguir, avaliamos se essa superexpressão podia alterar a capacidade clonogênica de H1299. Para isso, cerca de 48h após as transfecções, plaqueamos 10.000 células parentais ou transfectadas com pcDNA3/HA (vetor vazio) ou com pcDNA3/CTSP-1/HA (CTSP-1/HA) em placas de 60mm. Em seguida, adicionamos o antibiótico neomicina às culturas a fim de que as colônias fossem formadas a partir apenas das células transfectadas. Após 18 dias, fixamos e coramos as células com solução cristal violeta e contamos o número de colônias em cada placa. Calculamos a média de cada duplicata e a partir de dados de triplicatas experimentais independentes, analisamos o número de colônias formadas (**figura 24**).

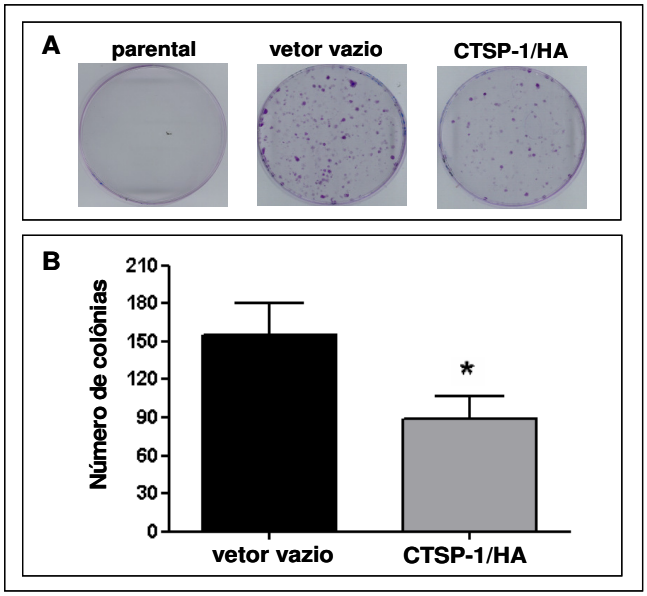

Figura 24 – *Ensaio clonogênico dependente de ancoragem de células H1299 superexpressando CTSP-1/HA depois de 48h das transfecções.* Depois de 48h das transfecções, células H1299 transfectadas com o vetor pcDNA3/HA (vetor vazio) ou com pcDNA3/CTSP-1/HA (CTSP-1/HA) e células parentais foram plaqueadas em duplicata. Cerca de 24h após o plaqueamento, foi adicionado o antibiótico neomicina. Quando todas as células parentais haviam morrido e as colônias eram visíveis, estas foram fixadas, coradas e contadas. Os experimentos foram feitos em triplicata. **A** – foto representativa dos resultados. **B** – gráfico do número de colônias formadas após a transfecção e seleção das células H1299 transfectadas (*p = 0,0043, One-Way ANOVA).

Observamos na **figura 24A** que, conforme o esperado, as células parentais não sobreviveram à ação da neomicina. Isso evidencia que as colônias formadas nas outras placas realmente originaram-se de células resistentes ao antibiótico e que, portanto, continham o vetor pcDNA3/HA ou pcDNA3/CTSP-1/HA. No gráfico da **figura 24B**, observamos uma redução aproximada de 60% no número de colônias formadas ($p = 0,0043$) ao compararmos as células superexpressando CTSP-1/HA (plaqueadas 48h após as transfecções) com as contendo o vetor vazio. Isso sugere que a proteína CTSP-1 possa induzir um bloqueio replicativo permanente em parte da população de H1299 durante os primeiros momentos em que é expressa.

Também avaliamos a capacidade clonogênica das células H1299 parentais, de clones expressando CTSP-1/HA de forma estável (clones CT-B1 e -C1) e de clones vetor vazio (clones VV-H6 e -H8) por meio de ensaios clonogênicos dependentes de ancoragem. Após 12 dias dos plaqueamentos em duplicata de cada clone, fixamos as células e as coramos com solução de cristal violeta (**figura 25A**). Em seguida, partindo de dados de triplicatas experimentais, contamos e analisamos o número de colônias formadas (**figura 25B**).

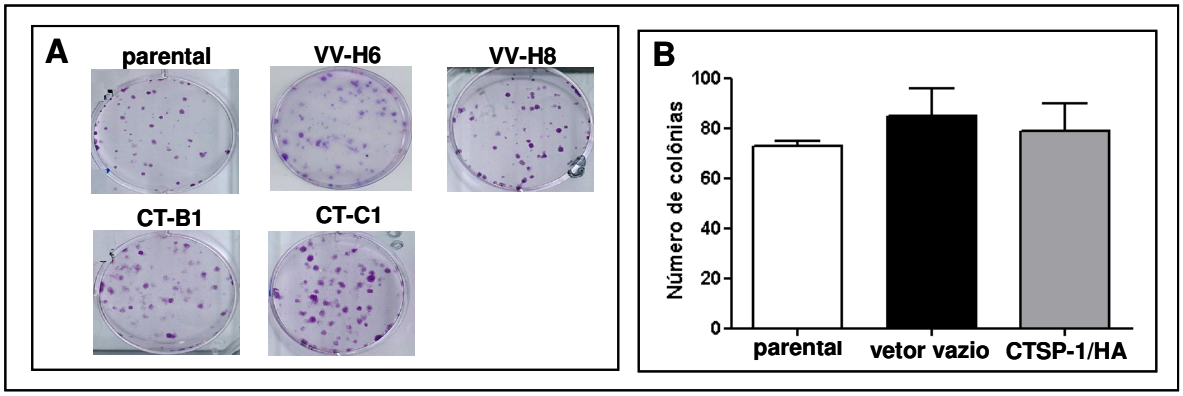

Figura 25 – *Avaliação do impacto da superexpressão estável de CTSP-1/HA em H1299 sobre sua capacidade clonogênica.* Células de H1299 parentais, dos clones VV-H6, VV-H8, CT-B1 e CT-C1 foram plaqueadas em duplicata e coradas com cristal violeta após 12 dias em cultura. Os ensaios foram feitos em triplicata. **A** – imagem representativa dos resultados obtidos. **B** – gráfico da média do número de colônias formadas nos ensaios clonogênicos. Os resultados foram agrupados para os clones vetor vazio e os clones superexpresssando CTSP-1/HA. A superexpressão estável de CTSP-1/HA não alterou a capacidade clonogênica das células H1299 ($p > 0,05$, One-Way ANOVA).

Como podemos visualizar na **figura 25**, ao contrário do que foi observado com as células H1299 superexpressando CTSP-1/HA e plaqueadas para o ensaio clonogênico 48h após as transfecções (**figura 24**), a superexpressão dessa proteína de forma estável não alterou a capacidade clonogênica dos clones CT-B1 e CT-C1 em relação aos controles. Esses dados corroboram com os resultados de bloqueio do ciclo celular (**figuras 22** e **23**) e, em conjunto, sugerem que os clones de H1299 superexpressando CTSP-1/HA de forma estável que obtivemos (clones "CT") originaram-se de células que conseguiram escapar do bloqueio em G0/G1.

4.8.3. Comparação dos níveis de expressão de CTSP-1/HA e de GFP entre populações de H1299 48h e 12 dias após as transfecções

Nossas análises demonstraram que a superexpressão de CTSP-1/HA 48h após as transfecções é capaz de levar à retenção de células H1299 em G0/G1 (**figura 22**) e à redução de sua capacidade clonogênica (**figura 24**). Diante desses dados, nos questionamos se havia uma seleção negativa atuando sobre células que expressavam altos níveis de CTSP-1. Para avaliarmos essa questão, transfectamos as células H1299 com pEGFP (que permite a superexpressão de GFP) ou com pcDNA3/CTSP-1/HA (que permite a superexpressão de CTSP-1/HA). Após 48h das transfecções, fixamos 50% das células com formaldeído. A outra parte da mesma população celular foi mantida em cultura sob seleção com o antibiótico neomicina para a obtenção de populações estáveis. Após 12 dias de cultivo, as populações selecionadas também foram fixadas. As imuno-marcações de ambas populações foram feitas no mesmo dia para evitarmos eventuais vieses metodológicos que dificultassem a comparação dos resultados obtidos para cada população (**figura 26**).

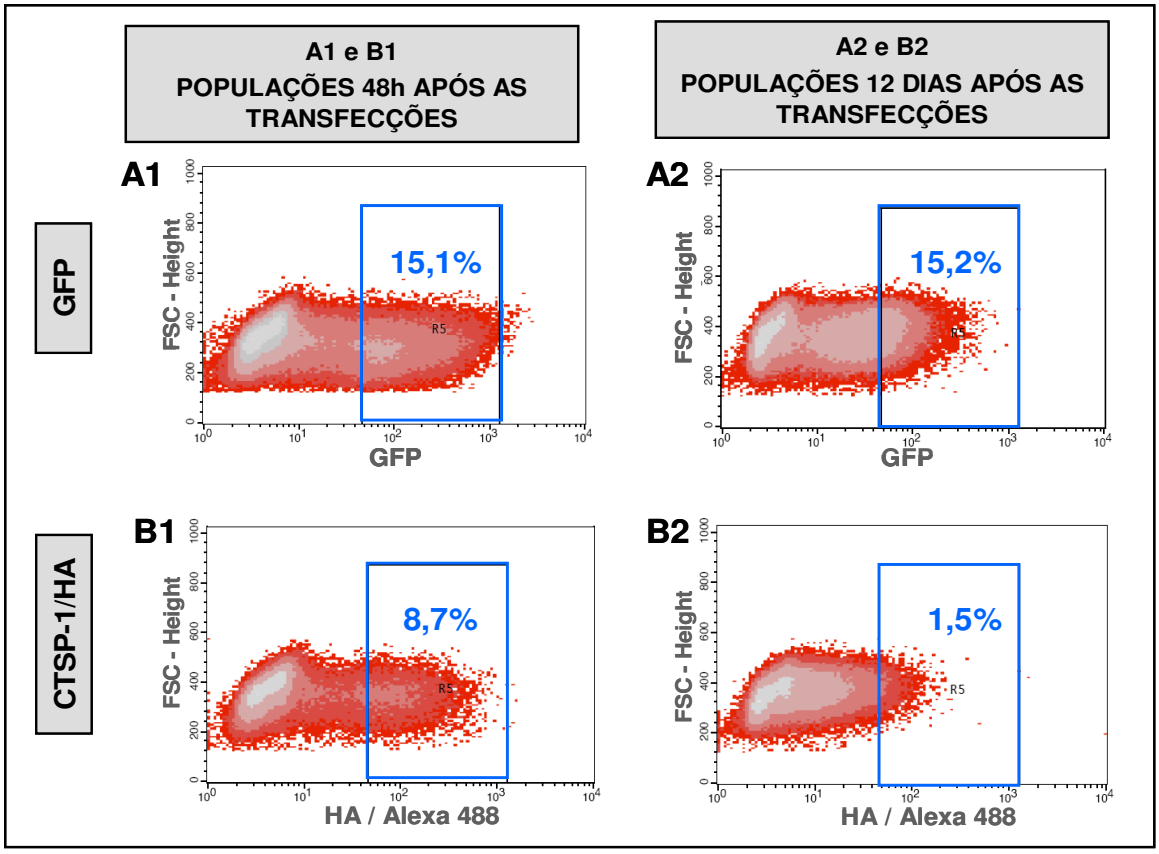

Figura 26 – *Comparação dos níveis de expressão de GFP e de CTSP-1/HA entre as populações de H1299 48h e 12 dias após as transfecções* . As células H1299 transfectadas com pEGFP (GFP – **A1** e **A2**) não foram imuno-marcadas. As células H1299 transfectadas com pcDNA3/CTSP-1/HA (CTSP-1/HA – **B1** e **B2**) foram imuno-marcadas com anti-HA e anticorpo secundário conjugado a Alexa Fluor 488 (verde). As análises foram feitas por citometria de fluxo e os gráficos mostram as populações celulares distribuídas de acordo com seu volume celular (*FSC-Height*) no eixo das ordenadas e segundo a intensidade da fluorescência emitida (*GFP* ou *HA/Alexa 488*) no eixo das abscissas, mostrada em escala logarítmica. As populações celulares estão representadas como *density-plots*, nos quais a intensidade da coloração branca aumenta proporcionalmente à densidade de células apresentando a mesma intensidade de sinal. Nos retângulos azuis, estão indicadas as porcentagens de células emitindo a faixa de fluorescência delimitada.

Como podemos observar na **figura 26**, as porcentagens de células apresentando a faixa de fluorescência relativa de ~50-1000 (delimitada no retângulo azul) são praticamente as mesmas entre as populações superexpressando GFP 48h após as transfecções e 12 dias após (~15%, **figuras 26A1** e **26A2**, respectivamente). Entretanto, nota-se uma tendência de que poucas células H1299 que superexpressam GFP 48h após a transfecção sejam selecionadas

negativamente durante o cultivo *in vitro* (**figura 26A**). Ao contrário, considerando-se essa mesma faixa de fluorescência, esse efeito de seleção negativa é muito pronunciado em células superexpressando CTSP-1: a porcentagem de células superexpressando CTSP-1/HA 48h após a transfecção (8,7%) é comparativamente maior do que a porcentagem de células superexpressando os mesmo níveis da proteína 12 dias após a transfecção (1,5%). Uma vez que essa diferença não foi observada para as células controle superexpressando GFP, esses resultados sugerem que as células H1299 que expressam níveis elevados de CTSP-1 são selecionadas negativamente durante a propagação *in vitro*.

4.8.4. Análise de morte celular por apoptose

Células retidas em G0/G1 podem entrar em apoptose ou em senescência celular. Sendo assim, inicialmente, avaliamos se a superexpressão de CTSP-1/HA em H1299 48h após as transfecções poderia levar à morte celular por apoptose.

É sabido que normalmente as células apresentam o fosfolipídeo de membrana fosfatidil serina (FS) localizado na face interna da membrana plasmática. Entretanto, células em apoptose apresentam uma característica peculiar que consiste na externalização da FS, que passa da face interna para a face externa da membrana plasmática. A anexina-V é uma proteína que se liga especificamente à FS. Com isso, a marcação da anexina-V com um fluoróforo permite a detecção, por citometria de fluxo, da FS externalizada e, consequentemente, a detecção das células apoptóticas. A anexina-V pode ser utilizada em conjunto com o iodeto de propídeo (IP), que se liga ao DNA de células cuja membrana não está íntegra e que, portanto, permite a distinção entre as células vivas e as mortas. Com isso, as células vivas (que têm pouca ou nenhuma fluorescência) podem ser distinguidas das células em apoptose inicial (anexina-V positivas e IP negativas) e das células em apoptose tardia ou em necrose (anexina-V e IP positivas).

No nosso caso, utilizamos células H1299 parentais ou transfectadas com pcDNA3/HA (vetor vazio) ou pcDNA3/CTSP-1/HA (CTSP-1/HA) e 48h após as transfecções, incubamos essas células com iodeto de propídeo (fluorescência vermelha) e anexina V conjugada ao fluoróforo Alexa Fluor 488 (fluorescência verde). Em seguida, analisamos essas células por citometria de fluxo (**figura 27**).

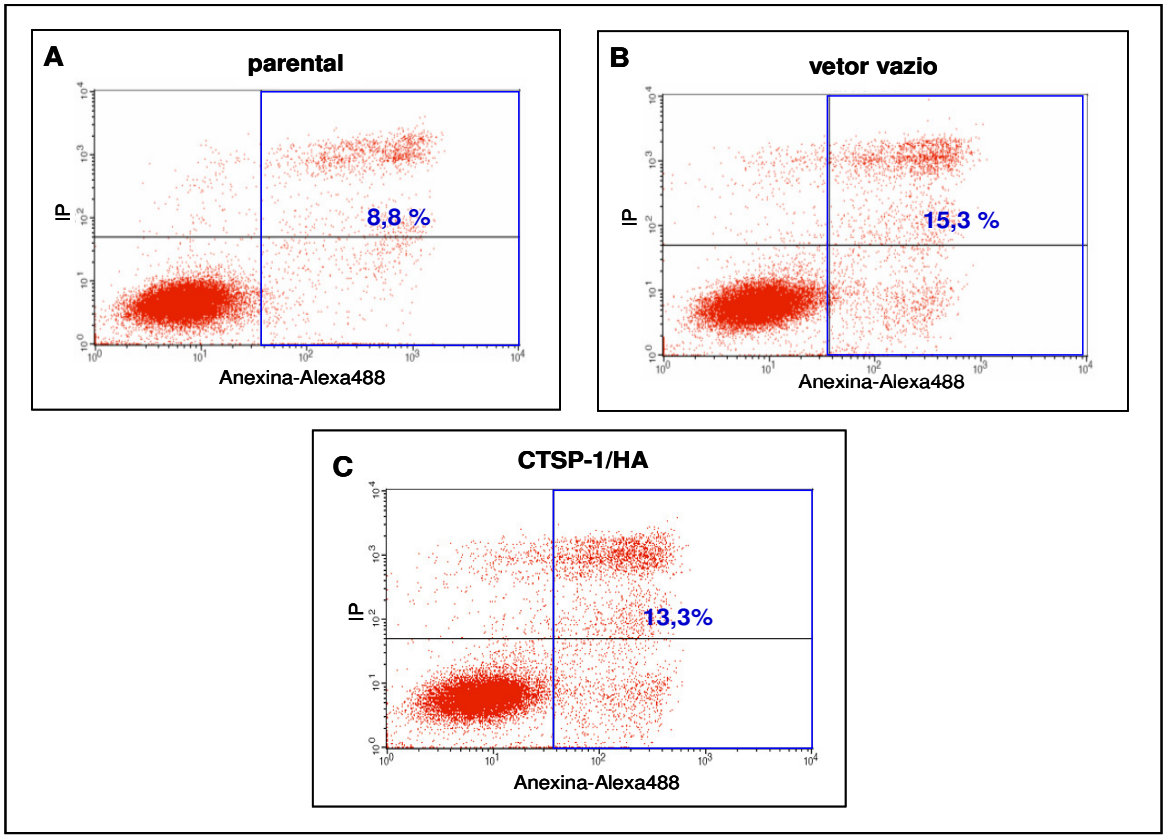

Figura 27 – *Avaliação de morte por apoptose em células H1299 superexpressando CTSP-1/HA 48h após as transfecções.* Após 48h das transfecções, as células foram incubadas com anexina-V/Alexa 488 e iodeto de propídeo (IP) e analisadas por citometria de fluxo. **A** – células H1299 parentais. **B** – células transfectadas com pcDNA3/HA (vetor vazio). **C** – células transfectadas com pcDNA3/CTSP-1/HA (CTSP-1/HA).

Como observamos no retângulo destacado em azul na **figura 27**, as porcentagens totais de células nos quadrantes superior-direito (células consideradas em apoptose tardia ou em necrose) e inferior-direito (células consideradas em apoptose inicial) foram bastante semelhantes entre o grupo de células transfectadas com o vetor vazio e o grupo de células

superexpressando CTSP-1/HA 48h após as transfecções (15,3% e 13,3%, respectivamente). A porcentagem de células parentais nesses quadrantes foi um pouco menor (8,8%). É importante mencionar que a tripsinização das células, realizada para soltá-las da placa de cultura, pode afetar tanto a integridade da membrana quanto a localização da fosfatidil serina. Com isso, as células detectadas nos quadrantes à direita nos *dotblots* desse ensaio não necessariamente se encontram em apoptose e, por isso, é importante fazer as análises comparativamente aos controles.

Os resultados da **figura 27** sugerem que a redução da capacidade clonogênica das células H1299 que superexpressam CTSP-1/HA 48h após as transfecções (**figura 22**) não está associada à ocorrência de morte celular por apoptose.

5. DISCUSSÃO

5.1. Interação entre CTSP-1 e CTCF

Nesse trabalho, procuramos caracterizar a função biológica de CTSP-1 em células tumorais, inicialmente, por meio da identificação de proteínas que são expressas em tumores de próstata e que são capazes de interagir fisicamente com esse antígeno. Para isso, realizamos o ensaio de duplo-híbrido em leveduras utilizando CTSP-1 como isca na varredura de uma biblioteca de cDNAs de tumores de próstata. Uma das proteínas identificadas por esse ensaio foi CTCF (*CCCTC-binding protein*).

A metodologia de duplo-híbrido em leveduras é bastante empregada na identificação de interações proteína-proteína em larga-escala. Entretanto, ela possui algumas limitações, dentre elas: (a) a impossibilidade de se analisar interações cooperativas entre mais de duas proteínas; (b) o fato de as interações detectadas ocorrerem sempre no núcleo, o que pode não representar o que ocorre biologicamente se esse não for o compartimento subcelular nativo das proteínas em análise; (c) a possibilidade de que as interações mediadas por modificações pós-traducionais das proteínas, tais como a fosforilação e a glicosilação, não sejam detectadas; e (d) a possibilidade de identificação de interações falso-positivas em alta frequência (FIELDS e STERNGLANZ 1994). Diante disso, as interações detectadas por esse sistema devem ser validadas por outras metodologias. Em nosso trabalho, a interação entre as proteínas CTSP-1 e CTCF, identificada por esse sistema, foi inicialmente validada em leveduras nos ensaios de interação cruzada (**figura 12**) e, posteriormente, confirmada em ensaios de *pulldown* (**figura 13**) e de co-localização subcelular (**figuras 16** e **17**). Este último revelou que a localização da proteína CTCF endógena na linhagem celular tumoral H1299 é exclusivamente nuclear enquanto que CTSP-1 parece transitar entre o núcleo e o citoplasma dessas células (**figura 18**). Isso sugere que a interação entre CTSP-1 e CTCF seja transitória e modulada por um

mecanismo biológico dependente do controle espaço-temporal de CTSP-1. Notavelmente, as evidências de translocação de CTSP-1/HA entre o núcleo e o citoplasma das células H1299 são concordantes com dados prévios do nosso grupo que mostraram que a proteína CTSP-1 endógena pode estar localizada nesses dois subcompartimentos tanto em células germinativas masculinas quanto em células de tumor de próstata (**figura 2**) (PARMIGIANI et al. 2006).

Com o objetivo de validar a interação entre as proteínas CTSP-1 e CTCF, nesse trabalho, também realizamos ensaios de co-imunoprecipitação, mas não obtivemos sucesso. Conseguimos imunoprecipitar a proteína CTCF eficientemente, mas não observamos a co-precipitação de CTSP-1/HA apesar das tentativas. Vale mencionar que o Dr. Dawn Farrar (da Universidade de Essex) e o Dr. Aristidis Moustakas (da Universidade de Upsala), pesquisadores que estudam CTCF há muitos anos, também relataram a impossibilidade de validação de algumas interações proteicas de CTCF por meio de ensaios de co-imunoprecipitação (dados pessoais não publicados).

5.2. Caracterização funcional de CTSP-1 considerando sua interação com CTCF

CTCF é uma proteína multifuncional que pode participar de processos biológicos diversos, atuando como: ativador ou repressor de promotores gênicos, bloqueador de *enhancers*, elemento insulador, ou ainda contribuir para os processos de *imprinting* genômico e de silenciamento do cromossomo X (revisto por RECILLAS-TARGA et al. 2006; e PHILLIPS e CORCES 2009). Recentemente, PHILLIPS e CORCES (2009) propuseram que tais funções tradicionalmente atribuídas a CTCF sejam, na realidade, papéis secundários dessa proteína, cuja função primária seria a de organizar globalmente a estrutura da cromatina.

Independente de qual seja o papel primário de CTCF, diante da multiplicidade de funções dessa proteína e diante da diversidade de processos dos quais ela pode participar, ao identificarmos a interação entre CTSP-1 e CTCF, ficava difícil inferir, com base apenas nesse

dado, uma possível função de CTSP-1 nas células tumorais. Nesse contexto e considerando a interação entre CTSP-1 e CTCF, dados da literatura que mostraram a participação de CTCF na regulação da expressão de genes CT (HONG et al. 2005; VATOLIN et al. 2005) e no controle do ciclo celular (RASKO et al. 2001; QI et al. 2003; DOCQUIER et al. 2005; TORRANO et al.2005; HEATH et al. 2008) nos motivaram a investigar uma possível participação de CTSP-1 nesses dois processos.

5.2.1. Análise do impacto da superexpressão de CTSP-1 sobre a regulação da expressão de genes CT na linhagem celular tumoral H1299

Já está bem estabelecido na literatura que existe uma tendência de expressão simultânea e não-aleatória de genes CT nos tumores (TAJIMA et al. 2003; TAYLOR et al. 2005) e que eventos epigenéticos – tais como a acetilação de histonas e, principalmente, a metilação de regiões promotoras – participam do controle da expressão desses genes (SIGALOTTI et al 2004; LIM et al. 2005; WOLOSZYNSKA-READ et al 2008). No entanto, o mecanismo regulatório que leva à expressão aberrante dos CT nos tumores ainda é desconhecido. Outra questão em aberto é se a expressão coordenada desses antígenos nos tumores está sob o controle de uma via regulatória comum.

Em 2001, OLD propôs um modelo interessante para explicar a expressão aberrante dos antígenos CT em tumores humanos, segundo o qual haveria a indução de um programa gametogênico/trofoblástico nas células tumorais. De acordo com esse modelo, os perfis de expressão dos CT em alguns tumores seriam equivalentes aos perfis de expressão desses genes nos gametas e nas células do trofoblasto em desenvolvimento. Isso poderia explicar o perfil de expressão simultâneo e não-randômico dos antígenos CT observado nas células tumorais. Além disso, foi proposto que a ocorrência de mutações específicas e/ou a atuação

de proteínas regulatórias ainda desconhecidas sejam essenciais para a indução desse programa nos tumores (OLD 2001).

Nesse contexto, os trabalhos publicados por HONG et al. e VATOLIN et al. (2005) mostraram que CTCF atua como um repressor da expressão de antígenos CT em células que, quando expressa, a proteína BORIS é capaz de deslocar CTCF da região promotora de genes CT – mais especificamente de NY-ESO-1 e MAGE-A1 – através de um processo ainda desconhecido, levando à des-repressão desses genes.

BORIS é uma proteína que apresenta os mesmos onze dedos-de-zinco centrais de CTCF (**figura 4**). Com isso, quando co-expressas, BORIS e CTCF podem competir entre si pela ligação aos mesmos sítios-alvo no DNA, mas podem atuar de maneiras diferentes por interagirem com proteínas parceiras distintas através de suas regiões N- e C- terminais, que são diferentes entre as duas proteínas (KLENOVA et al. 2002). KANG et al. (2007), por exemplo, demonstraram que o fator de transcrição Sp1 interage especificamente com BORIS, mas não com CTCF e que isso contribui para a des-repressão do antígeno CT NY-ESO-1 na linhagem celular tumoral H1299. Conforme observamos pelos dados de duplo-híbrido em leveduras, CTSP-1 interage com a porção N-terminal exclusiva de CTCF (diferente da de BORIS) o que sugere que CTSP-1 interaja apenas com CTCF.

Os níveis de expressão de CTCF nas células tumorais não são alterados em relação às células normais. Sendo assim, acredita-se que existam mecanismos moleculares capazes de inibir CTCF, permitindo, dessa forma, a atuação de BORIS nos promotores gênicos quando este é expresso pelas células. Uma possibilidade de inativação de CTCF é a ocorrência de mutações em seu domínio de ligação ao DNA, o que já foi demonstrado por FILIPPOVA et al. (2002). Outra possibilidade é que co-fatores modulem a atividade de CTCF de modo específico e, neste caso, seria interessante considerarmos a participação de CTSP-1. Além

disso, é possível que BORIS atue como uma versão dominante-negativa de CTCF (OHLSSON et al. 2010).

Com base nesses dados da literatura e frente à interação entre as proteínas CTSP-1 e CTCF que identificamos nesse trabalho, nos propusemos a investigar se o antígeno CTSP-1 era capaz de modular a atividade transcricional de CTCF, afetando indiretamente, dessa forma, a competição entre CTCF e BORIS pela ligação aos promotores de genes CT em células tumorais. Com esse objetivo, inicialmente, investigamos a existência de uma eventual correlação entre a expressão de CTSP-1 e de BORIS e a abundância de genes CT sendo expressos em linhagens celulares tumorais. Analisamos os padrões de expressão de CTCF, de BORIS, de CTSP-1 e de 14 outros genes CT em 22 linhagens celulares tumorais por RT-PCR (**tabela 4**). Com isso, conforme está mostrado na **tabela 5**, observamos que a co-expressão de CTSP-1 e de BORIS estava associada a um maior número médio de genes CT sendo expressos nas linhagens tumorais analisadas. Portanto, esses dados sugeriam que CTSP-1 e BORIS poderiam atuar de forma cooperativa na des-repressão de alguns genes CT em células tumorais.

Em um próximo momento, uma vez que HONG et al. (2005) haviam demonstrado que a troca de CTCF por BORIS no promotor de NY-ESO-1 pode induzir a expressão desse gene CT na linhagem celular tumoral H1299 e como havíamos visto que essas células não expressam níveis detectáveis de CTSP-1 endógeno (**tabela 4**), decidimos adotar a linhagem H1299 como um modelo celular para analisar o impacto da superexpressão de CTSP-1 sobre o nível de expressão do antígeno CT NY-ESO-1.

Inicialmente, geramos clones de H1299 contendo o vetor vazio e clones superexpressando CTSP-1/HA e os caracterizamos quanto aos níveis de expressão de CTSP-1 (**figuras 15** e **16**). Em seguida, utilizamos esses clones como ferramentas celulares para as análises de localização subcelular e para os estudos funcionais da proteína CTSP-1.

Os clones de H1299 foram inicialmente utilizados em ensaios de repórter luciferase para avaliarmos o impacto da superexpressão de CTSP-1/HA sobre a atividade do promotor simplificado de NY-ESO-1 (contendo o sítio de ligação comum a CTCF e BORIS). Com isso, observamos que a superexpressão de CTSP-1/HA nos clones estava associada a uma redução significativa da atividade da luciferase, o que sugeria, portanto, que a superexpressão de CTSP-1 poderia levar a uma redução da expressão de NY-ESO-1 em H1299 (**figura 19**). Entretanto, dados de PCR em tempo real e de *Western Blot* mostraram, respectivamente, não haver diferenças nos níveis endógenos de expressão do transcrito e da proteína NY-ESO-1 no grupo de clones superexpressando CTSP-1/HA comparativamente ao grupo de clones vetor vazio (**figura 20**).

Como havíamos observado, em ensaios anteriores, uma heterogeneidade intraclonal nos níveis de expressão de CTSP-1/HA em H1299 (**figuras 15** e **16**), imaginamos que talvez apenas as células expressando CTSP-1/HA em níveis elevados é que teriam os níveis endógenos de NY-ESO-1 reduzidos de forma significativamente detectável. Se esse fosse o caso, uma vez que nas metodologias de RT-PCR e de *Western Blot* analisamos todo o *pool* de células de cada clone, era possível que a heterogeneidade intraclonal nos níveis de expressão de CTSP-1/HA estivesse mascarando os resultados obtidos para os níveis de expressão de NY-ESO-1 (**figura 20**). Sendo assim, visando refinar os nossos dados, imuno-marcamos as proteínas CTSP-1/HA e NY-ESO-1 nas células dos clones H1299 superexpressando CTSP-1/HA e, em seguida, fizemos as análises por citometria de fluxo. Como mostrado na **figura 21**, observamos que não existe uma correlação dose-dependente entre os níveis de expressão da proteína CTSP-1 e os níveis endógenos de expressão de NY-ESO-1 na linhagem tumoral H1299.

Com base nestes últimos resultados, acreditamos que a redução da atividade do promotor simplificado de NY-ESO-1 observada nos clones superexpressando CTSP-1/HA

comparativamente aos clones controle nos ensaios de repórter luciferase (**figura 19)** não reflita o que ocorre no contexto genômico nativo do promotor de NY-ESO-1 em células H1299, o qual certamente é muito mais complexo do que o contexto desse ensaio. Apesar disso, é interessante mencionar que CTCF é capaz de regular a expressão de diversos genes além dos genes CT (revisto por FIORENTINO e GIORDANO 2011) e que CTCF pode se ligar a diversos motivos de DNA cujas sequências de bases são bastante variáveis (FILIPPOVA et al. 1996). Portanto, frente a esses dados e diante do nosso resultado de repórter luciferase, não podemos excluir a possibilidade de que a superexpressão de CTSP-1 em H1299 realmente cause uma redução da atividade de um promotor de um gene regulado por CTCF, que não o gene NY-ESO-1. Estando de acordo com essa ideia, RODRIGUEZ et al. (2011) demonstraram que o silenciamento de CTCF não tem um efeito global sobre a regulação da expressão de seus genes-alvo, pois foi observado que o silenciamento de CTCF leva à inibição da reativação dos genes do lócus INK4/ARF, mas não altera os níveis de expressão do gene c-Myc, o qual também é regulado por CTCF.

Frente aos nossos dados que mostraram que a superexpressão de CTSP-1/HA não altera os níveis de expressão do CT NY-ESO-1 na linhagem tumoral H1299, também é importante mencionar que VATOLIN et al. (2005) demonstraram que a simples indução da expressão de BORIS em fibroblastos (células normais e que, portanto, não expressam o antígeno CTSP-1) é suficiente para levar à des-repressão do gene CT MAGE-A1. Além disso, BHAN et al. (2011) também demonstraram que a ligação de BORIS aos promotores dos antígenos CT MAGE-A2, -A3 e -A4 está associada com a ativação transcricional dos mesmos nas linhagens tumorais de pulmão H1299 e A549, que expressam altos e baixos níveis de BORIS, respectivamente, mas que, conforme vimos por nossos dados de RT-PCR (**tabela 4**), não expressam níveis detectáveis de CTSP-1 endógeno. Assim, por se tratarem de células que não expressam CTSP-1, esses dados sugerem que essa proteína seja desnecessária para a indução

da expressão desses genes CT. Entretanto, podemos especular que a proteína BORIS seja capaz de induzir a expressão do próprio CTSP-1 em algumas linhagens celulares. Segundo essa especulação, uma vez expresso, CTSP-1 atuaria no sentido de potencializar a des-repressão de outros genes CT mediada por BORIS. Estando de acordo com isso, encontramos três potenciais sítios de ligação para BORIS (e consequentemente também para CTCF) localizados no promotor do gene CTSP-1. Esses sítios foram identificados utilizando-se um banco de dados disponibilizado na *internet* pela Dra. Elena Klenova, da Universidade de Essex (*http://www.essex.ac.uk/bs/molonc/binfo/ctcfbind.htm*), sendo possível a busca de alinhamentos entre a sequência de DNA submetida e uma série de motivos de sítios de ligação específicos para CTCF/BORIS e já validados experimentalmente por EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*).

Vale mencionar também que a participação da proteína BORIS no controle da expressão de antígenos CT ainda é controversa, pois, em oposição aos trabalhos que citamos anteriormente, KHOLMANSKIKH et al. (2008) e WOLOSZYNSKA-READ et al. (2010) mostraram que a expressão de BORIS é insuficiente para induzir a ativação de antígenos CT em linhagens celulares de ovário e em linhagens ou amostras de melanomas, respectivamente. Além disso, KOSAKA-SUZUKI et al. (2011) demonstraram que a expressão de BORIS é necessária, mas não suficiente para ativar o gene CT TSP50 em linhagens celulares tumorais.

Considerando nossos resultados em conjunto, concluímos que a superexpressão de CTSP-1/HA não altera os níveis de expressão de NY-ESO-1 na linhagem celular tumoral H1299, o que sugere que o mesmo ocorra para os outros genes CT nessa linhagem. Entretanto, não podemos excluir totalmente a possibilidade de que isso ocorra em um modelo celular diferente de H1299. FIORENTINO e GIORDANO (2011) relataram em uma revisão recente da literatura que CTCF pode apresentar funções biológicas diferentes e até mesmo divergentes dependendo do modelo celular e do contexto genômico analisados. Fizemos

tentativas de gerar clones superexpressando CTSP-1 em outras linhagens celulares tumorais, mas, como será mencionado a seguir, encontramos grandes dificuldades na obtenção desses clones.

5.2.2. Análise do impacto da superexpressão de CTSP-1 sobre a regulação do ciclo e sobre a capacidade clonogênica de células H1299

Como não observamos alterações nos níveis endógenos do CT NY-ESO-1 após a superexpressão de CTSP-1/HA na linhagem tumoral H1299, optamos por analisar um efeito mais global dessa superexpressão sobre algumas atividades já descritas para CTCF em células tumorais.

Nesse sentido, já está bem estabelecido na literatura que CTCF é capaz de participar do controle do ciclo celular por mecanismos ainda pouco conhecidos (revisto por RECILLAS-TARGA et al. 2006 e FIORENTINO e GIORDANO 2011). Sabendo disso, inicialmente, avaliamos o efeito da superexpressão de CTSP-1/HA 48h após as transfecções sobre o ciclo celular de H1299 e observamos que essas células apresentaram um bloqueio em G0/G1, o mesmo não sendo observado nas células controle (**figura 22**). Em seguida, analisamos o efeito da superexpressão estável de CTSP-1/HA sobre o ciclo celular utilizando clones de H1299 superexpressando CTSP-1/HA e clones com o vetor vazio. Conforme esperado para derivados celulares estabelecidos em cultura ao longo de várias passagens e, em oposição ao que havíamos observado para as células analisadas 48h após as transfecções, as células superexpressando a proteína estavelmente não foram retidas em G0/G1 (**figura 23**).

Diante desses resultados, investigamos se o bloqueio em G0/G1 observado nas células que superexpressavam CTSP-1 era transitório ou mais duradouro. Para avaliarmos essa questão, realizamos ensaios clonogênicos. Observamos que as células H1299 superexpressando CTSP-1/HA e plaqueadas para o ensaio 48h após as transfecções

apresentavam uma redução aproximada de 60% da sua capacidade clonogênica comparativamente ao controle (**figura 24**). Isso sugeria que a superexpressão de CTSP-1 48h após as transfecções poderia induzir a morte ou o bloqueio replicativo. Ao contrário, nas células dos clones H1299 supexpressando CTSP-1/HA de forma estável, não observamos diferenças significativas de sua capacidade clonogênica comparativamente aos controles (clones com vetor vazio e células parentais) (**figura 25**).

Portanto, esses dados sugeriam que após a superexpressão de CTSP-1, a decisão de células H1299 entre parar em G0/G1 ou proliferar era específica e provavelmente dose-dependente em relação à expressão de CTSP-1, de forma que as células expressando níveis elevados da proteína seriam incapazes de proliferar e, portanto, de gerar clones. Estando de acordo com essa proposta, nossos ensaios de citometria de fluxo sugeriam que células H1299 expressando altos níveis de CTSP-1/HA eram selecionados negativamente durante sua propagação *in vitro* (**figura 26**).

A especificidade dos efeitos de CTSP-1 descritos nesse trabalho, refere-se aos efeitos observados em células expressando CTSP-1/HA comparativamente às células parentais, àquelas contendo apenas o vetor vazio ou àquelas superexpressando a proteína GFP. Obviamente, a superexpressão de formas mutadas de CTSP-1 consistiriam em controles de especificidade muito mais adequados aos nossos propósitos. Por esse motivo, duas formas mutadas de CTSP-1/HA já estão sendo geradas em nosso laboratório.

De forma semelhante ao que observamos para CTSP-1, TORRANO et al. (2005) mostraram que a superexpressão da proteína CTCF em células da linhagem eritroleucêmica K562 induz uma redução da proliferação celular e permite a obtenção de células expressando apenas níveis moderados da proteína exógena (cerca de 2 a 4 vezes). Os autores também observaram a existência de uma forte heterogeneidade intraclonal nos níveis de expressão da proteína CTCF e sugeriram que as células superexpressando a proteína exógena sofrem uma

seleção negativa durante a propagação em cultura. O mecanismo molecular desse processo é desconhecido, no entanto, os autores mostraram que a retenção do crescimento das células K562 superexpressando CTCF exógena não era acompanhada por apoptose. De modo semelhante, RASKO et al. (2001) relataram uma grande dificuldade de encontrar uma linhagem celular que tolerasse a expressão de CTCF exógeno. Os autores demonstraram que a superexpressão de CTCF na linhagem celular de rim embrionário HEK-293 inibe o crescimento celular em todas as fases do ciclo, não sendo observado o acúmulo de células em nenhuma das fases preferencialmente.

Em nosso trabalho, apesar da retenção específica das células H1299 superexpressando CTSP-1/HA em G0/G1 (**figura 22**) e sua associação com uma forte redução da capacidade clonogênica, não observamos uma associação entre a expressão de CTSP-1 e a indução de apoptose após 48h (**figura 27**).

Diante desses efeitos semelhantes de CTSP-1 e de CTCF sobre a progressão do ciclo celular, especulamos que essas proteínas possam participar do controle do ciclo celular e que essa função seja, de alguma maneira, modulada pela interação física entre essas proteínas durante o período em que elas co-localizam no núcleo (**figuras 16** e **17**). Obviamente, a importância da interação entre CTSP-1 e CTCF e as funções individuais das mesmas na regulação do ciclo celular ainda devem ser melhor investigadas.

Além da apoptose, a senescência celular seria outro processo que poderia explicar a retenção em G0/G1 e a limitada capacidade clonogênica das células H1299 superexpressando CTSP-1/HA 48h após as transfecções. Sabendo que a enzima beta-galactosidase é considerada um marcador de células senescentes, realizamos o ensaio clássico com X-Gal para detectarmos a atividade dessa enzima. Nos ensaios com células H1299 superexpressando CTSP-1/HA e células contendo o vetor vazio 48h após as transfecções, observamos a presença de poucas células azuis nos dois grupos. Portanto, os resultados desses experimentos

preliminares não nos permitiram chegar a uma conclusão a respeito do mecanismo associado à retenção em G0/G1 e à limitada capacidade clonogência das células H1299 superexpressando CTSP-1/HA 48h após as transfecções.

Nesse trabalho ainda, a fim de validarmos os resultados obtidos em células da linhagem H1299, tentamos gerar clones superexpressando CTSP-1/HA utilizando outras linhagens celulares tumorais. No entanto, ao contrário da relativa facilidade de obtenção de clones a partir de células H1299, encontramos dificuldades na obtenção de clones superexpressando CTSP-1 em outras linhagens. Obtivemos apenas dois clones da linhagem de adenocarcinoma de mama MDA-MB-436 superexpressando CTSP-1/HA.

Interessantemente, no processo de seleção dos clones em MDA-MB-436, após a diluição limitante da população celular superexpressando CTSP-1 em placas de 96 poços, observamos que após algumas divisões as células paravam de proliferar, mesmo quando mantidas sob condições de cultivo ideais, e que permaneciam viáveis por longos períodos em cultura. Uma possível explicação para esse efeito seria a ativação de um programa de senescência replicativa nas células MDA-MB-436 após a superexpressão de CTSP-1/HA. Nesse sentido, conforme está mostrado na figura do **ANEXO II**, a presença de células senescentes foi evidenciada mesmo nos dois clones de MDA-MB-436 superexpressando CTSP-1/HA (clones MCT-2.1 e MCT-4), o que não foi observado nos clones com o vetor vazio (clones MVV-2 e MVV-5). Além da coloração azul, as células consideradas senescentes apresentaram alterações morfológicas características do processo de senescência, quais sejam, um aumento de volume e um formato mais achatado comparativamente às células em proliferação (**figura ANEXO II**).

Com base nesses resultados preliminares obtidos com as células MDA-MB-436 superexpressando CTSP-1/HA, acreditamos que a senescência celular seja um possível

mecanismo que explique a limitada capacidade clonogênica de células superexpressando essa proteína.

Diante desse cenário, é interessante a evidência de que CTCF pode induzir a expressão da proteína supressora de tumor p16/INK4a (WITCHER e EMERSON 2009). Além de ser capaz de iniciar o programa de senescência replicativa (DAI e ENDERS 2000), a proteína p16/INK4a é essencial para assegurar a irreversibilidade desse processo, conforme foi demonstrado por BEAUSEJOUR et al. (2003). Esses autores mostraram ainda que o bloqueio da proliferação celular associada à senescência imposta por p16/INK4a não pode ser revertida pela inativação de p53, que sabidamente também pode ser importante na ativação e manutenção do programa de senescência.

Esses dados são interessantes diante do genótipo para p16/INK4a e para p53 nas linhagens celulares tumorais H1299 e MDA-MB-436 que utilizamos para gerar clones superexpressando CTSP-1/HA. As células H1299 não expressam p16/INK4a nem p53; as células MDA-MB-436 têm p53 mutado, mas expressam p16/INK4a funcional (dados amplamente relatados na literatura). Em nosso trabalho, obtivemos evidências de que as células dos clones H1299 (que são p16/INK4a negativas) superexpressando CTSP-1/HA estavelmente foram capazes de superar o bloqueio do ciclo celular em G0/G1 induzido por CTSP-1 (**figuras 22** a **25**). Entretanto, nas células MDA-MB-436 (que são p16/INK4a positivas) observamos que o processo de obtenção de clones superexpressando CTSP-1/HA foi extremamente ineficiente e observamos senescência celular, conforme está mostrado no **ANEXO II**. Assim, considerando o genótipo dessas linhagens em conjunto com os nossos dados e os da literatura, especulamos que CTSP-1 possa ser capaz de participar da regulação da senescência celular pelas vias de p16/INK4a.

Certamente essas questões consistem em hipóteses que devem ser analisadas em pesquisas futuras. Com esse trabalho, geramos as ferramentas celulares para o estudo

funcional de CTSP-1 e fornecemos evidências de que CTSP-1 interage com CTCF e que CTSP-1 pode ter um efeito relevante no controle da proliferação celular.

6. CONCLUSÕES

- A interação física entre as proteínas CTSP-1 e CTCF foi identificada e validada utilizando o sistema duplo-híbrido em leveduras e posteriormente confirmada em ensaios de *GST-pulldown* utilizando o extrato proteico total da linhagem tumoral humana A2058.

- Em células da linhagem tumoral H1299, crescendo exponencialmente em condições ideais de cultura, a proteína CTCF endógena apresenta localização estritamente nuclear e a proteína CTSP-1 exógena apresenta localização variável: estritamente citoplasmática em 80-90% das células, ou citoplasmática e nuclear em 10-20% das células. Obviamente, as proteínas CTCF endógena e CTSP-1 exógena co-localizam somente quando esta última se encontra no núcleo celular.

- Há uma translocação de CTSP-1 entre o citoplasma e o núcleo de células H1299, sendo que a baixa porcentagem de células apresentando CTSP-1 no núcleo sugere que essa translocação seja rápida e transitória em condições ideais de cultivo.

- A superexpressão de CTSP-1 em H1299 induz uma redução da atividade do promotor simplificado do gene CT NY-ESO-1 (sequência contendo o sítio de ligação para CTCF e BORIS) em relação aos controles em ensaios de gene repórter luciferase. Porém, alterações nos níveis endógenos do mRNA e da proteína NY-ESO-1 não foram observadas nas células H1299 que superexpressavam a proteína CTSP-1 de forma estável.

- A superexpressão de CTSP-1 48h após a transfecção induziu uma retenção das células H1299 em G0/G1 no ciclo e uma redução aproximada de 60% na sua capacidade clonogênica por um mecanismo ainda desconhecido e possivelmente dependente dos

níveis de expressão de CTSP-1. O efeito cooperativo da interação entre CTSP-1 e CTCF nesses processos ainda precisa ser investigada.

- Resultados preliminares indicam que a redução da capacidade clonogênica de células H1299 que superexpressam CTSP-1 analisadas 48h após as transfecções não está associada à ocorrência de morte celular por apoptose.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, LG, Sakabe, NJ, deOliveira, AR, Silva, MC, Mundstein, AS, Cohen, T, Chen, YT, Chua, R, Gurung, S, Gnjatic, S, Jungbluth, AA, Caballero, OL, Bairoch, A, Kiesler, E, White, SL, Simpson, AJ, Old, LJ, Camargo, AA e Vasconcelos, AT. CTdatabase: a knowledge-base of high-throughput and curated data on cancer-testis antigens. Nucleic Acids Res, 37 D816-9. 2009.

Barrow, C, Browning, J, MacGregor, D, Davis, ID, Sturrock, S, Jungbluth, AA e Cebon, J. Tumor antigen expression in melanoma varies according to antigen and stage. Clin Cancer Res, 12 764-71. 2006.

Barski, A, Cuddapah, S, Cui, K, Roh, TY, Schones, DE, Wang, Z, Wei, G, Chepelev, I e Zhao, K. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. Cell, 129 823-37. 2007.

Beausejour, CM, Krtolica, A, Galimi, F, Narita, M, Lowe, SW, Yaswen, P e Campisi, J. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. Embo J, 22 4212-22. 2003.

Bhan, S, Negi, SS, Shao, C, Glazer, CA, Chuang, A, Gaykalova, DA, Sun, W, Sidransky, D, Ha, PK e Califano, JA. BORIS binding to the promoters of cancer testis antigens, MAGEA2, MAGEA3, and MAGEA4, is associated with their transcriptional activation in lung cancer. Clin Cancer Res, 17 4267-76. 2011.

Caballero, OL e Chen, YT. Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy. Cancer Sci, 100 2014-21. 2009.

Chambard, JC, Lefloch, R, Pouyssegur, J e Lenormand, P. ERK implication in cell cycle regulation. Biochim Biophys Acta, 1773 1299-310. 2007.

Chang, HH, Hemberg, M, Barahona, M, Ingber, DE e Huang, S. Transcriptome-wide noise controls lineage choice in mammalian progenitor cells. Nature, 453 544-7. 2008.

Cooper, G. M. **In: The Cell – A Molecular Approach**. 2nd ed. Sinauer Associates, Inc, Sunderland (MA), 2000.

Costa, FF, Le Blanc, K e Brodin, B. Concise review: cancer/testis antigens, stem cells, and cancer. Stem Cells, 25 707-11. 2007.

Cronwright, G, Le Blanc, K, Gotherstrom, C, Darcy, P, Ehnman, M e Brodin, B. Cancer/testis antigen expression in human mesenchymal stem cells: down-regulation of SSX impairs cell migration and matrix metalloproteinase 2 expression. Cancer Res, 65 2207-15. 2005.

Cuddapah, S, Jothi, R, Schones, DE, Roh, TY, Cui, K e Zhao, K. Global analysis of the insulator binding protein CTCF in chromatin barrier regions reveals demarcation of active and repressive domains. Genome Res, 19 24-32. 2009.

Dai, CY e Enders, GH. p16 INK4a can initiate an autonomous senescence program. Oncogene, 19 1613-22. 2000.

Docquier, F, Farrar, D, D'Arcy, V, Chernukhin, I, Robinson, AF, Loukinov, D, Vatolin, S, Pack, S, Mackay, A, Harris, RA, Dorricott, H, O'Hare, MJ, Lobanenkov, V e Klenova, E. Heightened expression of CTCF in breast cancer cells is associated with resistance to apoptosis. Cancer Res, 65 5112-22. 2005.

Docquier, F, Kita, GX, Farrar, D, Jat, P, O'Hare, M, Chernukhin, I, Gretton, S, Mandal, A, Alldridge, L e Klenova, E. Decreased poly(ADP-ribosyl)ation of CTCF, a transcription factor, is associated with breast cancer phenotype and cell proliferation. Clin Cancer Res, 15 5762-71. 2009.

Dunn, GP, Old, LJ e Schreiber, RD. The three Es of cancer immunoediting. Annu Rev Immunol, 22 329-60. 2004.

Farrar, D, Rai, S, Chernukhin, I, Jagodic, M, Ito, Y, Yammine, S, Ohlsson, R, Murrell, A e Klenova, E. Mutational analysis of the poly(ADP-ribosyl)ation sites of the transcription factor CTCF provides an insight into the mechanism of its regulation by poly(ADP-ribosyl)ation. Mol Cell Biol, 30 1199-216. 2011.

Fields, S e Sternglanz, R. The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. Trends Genet, 10 286-92. 1994.

Filippova, GN, Fagerlie, S, Klenova, EM, Myers, C, Dehner, Y, Goodwin, G, Neiman, PE, Collins, SJ e Lobanenkov, VV. An exceptionally conserved transcriptional repressor, CTCF, employs different combinations of zinc fingers to bind diverged promoter sequences of avian and mammalian c-myc oncogenes. Mol Cell Biol, 16 2802-13. 1996.

Filippova, GN, Lindblom, A, Meincke, LJ, Klenova, EM, Neiman, PE, Collins, SJ, Doggett, NA e Lobanenkov, VV. A widely expressed transcription factor with multiple DNA sequence specificity, CTCF, is localized at chromosome segment 16q22.1 within one of the smallest regions of overlap for common deletions in breast and prostate cancers. Genes Chromosomes Cancer, 22 26-36. 1998.

Filippova, GN, Qi, CF, Ulmer, JE, Moore, JM, Ward, MD, Hu, YJ, Loukinov, DI, Pugacheva, EM, Klenova, EM, Grundy, PE, Feinberg, AP, Cleton-Jansen, AM, Moerland, EW, Cornelisse, CJ, Suzuki, H, Komiya, A, Lindblom, A, Dorion-Bonnet, F, Neiman, PE, Morse, HC, 3rd, Collins, SJ e Lobanenkov, VV. Tumor-associated zinc finger mutations in the CTCF transcription factor selectively alter tts DNA-binding specificity. Cancer Res, 62 48-52. 2002.

Fiorentino, FP e Giordano, A. The tumor suppressor role of CTCF. J Cell Physiol. 2011.

Gedye, C, Quirk, J, Browning, J, Svobodova, S, John, T, Sluka, P, Dunbar, PR, Corbeil, D, Cebon, J e Davis, ID. Cancer/testis antigens can be immunological targets in clonogenic CD133+ melanoma cells. Cancer Immunol Immunother, 58 1635-46. 2009.

Hofmann, O, Caballero, OL, Stevenson, BJ, Chen, YT, Cohen, T, Chua, R, Maher, CA, Panji, S, Schaefer, U, Kruger, A, Lehvaslaiho, M, Carninci, P, Hayashizaki, Y, Jongeneel, CV, Simpson, AJ, Old, LJ e Hide, W. Genome-wide analysis of cancer/testis gene expression. Proc Natl Acad Sci U S A, 105 20422-7. 2008.

Hong, JA, Kang, Y, Abdullaev, Z, Flanagan, PT, Pack, SD, Fischette, MR, Adnani, MT, Loukinov, DI, Vatolin, S, Risinger, JI, Custer, M, Chen, GA, Zhao, M, Nguyen, DM, Barrett, JC, Lobanenkov, VV e Schrump, DS. Reciprocal binding of CTCF and BORIS to the NY-ESO-1 promoter coincides with derepression of this cancer-testis gene in lung cancer cells. Cancer Res, 65 7763-74. 2005.

Jager, D, Stockert, E, Gure, AO, Scanlan, MJ, Karbach, J, Jager, E, Knuth, A, Old, LJ e Chen, YT. Identification of a tissue-specific putative transcription factor in breast tissue by serological screening of a breast cancer library. Cancer Res, 61 2055-61. 2001.

Jager, E, Ringhoffer, M, Altmannsberger, M, Arand, M, Karbach, J, Jager, D, Oesch, F e Knuth, A. Immunoselection in vivo: independent loss of MHC class I and melanocyte differentiation antigen expression in metastatic melanoma. Int J Cancer, 71 142-7. 1997.

Jones, TA, Ogunkolade, BW, Szary, J, Aarum, J, Mumin, MA, Patel, S, Pieri, CA e Sheer, D. Widespread Expression of BORIS/CTCFL in Normal and Cancer Cells. PLoS One, 6 e22399. 2011.

Kang, Y, Hong, JA, Chen, GA, Nguyen, DM e Schrump, DS. Dynamic transcriptional regulatory complexes including BORIS, CTCF and Sp1 modulate NY-ESO-1 expression in lung cancer cells. Oncogene, 26 4394-403. 2007.

Keeney, S, Giroux, CN e Kleckner, N. Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. Cell, 88 375-84. 1997.

Kholmanskikh, O, Loriot, A, Brasseur, F, De Plaen, E e De Smet, C. Expression of BORIS in melanoma: lack of association with MAGE-A1 activation. Int J Cancer, 122 777-84. 2008.

Kim, TH, Abdullaev, ZK, Smith, AD, Ching, KA, Loukinov, DI, Green, RD, Zhang, MQ, Lobanenkov, VV e Ren, B. Analysis of the vertebrate insulator protein CTCF-binding sites in the human genome. Cell, 128 1231-45. 2007.

Klenova, EM, Morse, HC, 3rd, Ohlsson, R e Lobanenkov, VV. The novel BORIS + CTCF gene family is uniquely involved in the epigenetics of normal biology and cancer. Semin Cancer Biol, 12 399-414. 2002.

Kosaka-Suzuki, N, Suzuki, T, Pugacheva, EM, Vostrov, AA, Morse, HC, 3rd, Loukinov, D e Lobanenkov, V. Transcription Factor BORIS (Brother of the Regulator of Imprinted Sites) Directly Induces Expression of a Cancer-Testis Antigen, TSP50, through Regulated Binding of BORIS to the Promoter. J Biol Chem, 286 27378-88. 2011.

Kouprina, N, Noskov, VN, Pavlicek, A, Collins, NK, Schoppee Bortz, PD, Ottolenghi, C, Loukinov, D, Goldsmith, P, Risinger, JI, Kim, JH, Westbrook, VA, Solomon, G, Sounders, H, Herr, JC, Jurka, J, Lobanenkov, V, Schlessinger, D e Larionov, V. Evolutionary diversification of SPANX-N sperm protein gene structure and expression. PLoS One, 2 e359. 2007.

Kozak, M. An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. J Cell Biol, 115 887-903. 1991.

Kurashige, T, Noguchi, Y, Saika, T, Ono, T, Nagata, Y, Jungbluth, A, Ritter, G, Chen, YT, Stockert, E, Tsushima, T, Kumon, H, Old, LJ e Nakayama, E. Ny-ESO-1 expression and immunogenicity associated with transitional cell carcinoma: correlation with tumor grade. Cancer Res, 61 4671-4. 2001.

Kurz, DJ, Decary, S, Hong, Y, Erusalimsky, JD. Senescence-assocaited beta-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. J Cell Sci., 113 3613-22. 2000.

Laduron, S, Deplus, R, Zhou, S, Kholmanskikh, O, Godelaine, D, De Smet, C, Hayward, SD, Fuks, F, Boon, T e De Plaen, E. MAGE-A1 interacts with adaptor SKIP and the deacetylase HDAC1 to repress transcription. Nucleic Acids Res, 32 4340-50. 2004.

Li, T e Lu, L. Functional role of CCCTC binding factor (CTCF) in stress-induced apoptosis. Exp Cell Res, 313 3057-65. 2007.

Lim, JH, Kim, SP, Gabrielson, E, Park, YB, Park, JW e Kwon, TK. Activation of human cancer/testis antigen gene, XAGE-1, in tumor cells is correlated with CpG island hypomethylation. Int J Cancer, 116 200-6. 2005.

Loukinov, DI, Pugacheva, E, Vatolin, S, Pack, SD, Moon, H, Chernukhin, I, Mannan, P, Larsson, E, Kanduri, C, Vostrov, AA, Cui, H, Niemitz, EL, Rasko, JE, Docquier, FM, Kistler, M, Breen, JJ, Zhuang, Z, Quitschke, WW, Renkawitz, R, Klenova, EM, Feinberg, AP, Ohlsson, R, Morse, HC, 3rd e Lobanenkov, VV. BORIS, a novel male germ-line-specific protein associated with epigenetic reprogramming events, shares the same 11-zinc-finger domain with CTCF, the insulator protein involved in reading imprinting marks in the soma. Proc Natl Acad Sci U S A, 99 6806-11. 2002.

Marcar, L, Maclaine, NJ, Hupp, TR e Meek, DW. Mage-A cancer/testis antigens inhibit p53 function by blocking its interaction with chromatin. Cancer Res, 70 10362-70. 2011.

Meuwissen, RL, Offenberg, HH, Dietrich, AJ, Riesewijk, A, van Iersel, M e Heyting, C. A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. Embo J, 11 5091-100. 1992.

Monte, M, Simonatto, M, Peche, LY, Bublik, DR, Gobessi, S, Pierotti, MA, Rodolfo, M e Schneider, C. MAGE-A tumor antigens target p53 transactivation function through histone deacetylase recruitment and confer resistance to chemotherapeutic agents. Proc Natl Acad Sci U S A, 103 11160-5. 2006.

Moore, N e Lyle, S. Quiescent, slow-cycling stem cell populations in cancer: a review of the evidence and discussion of significance. J Oncol, 2011. 2011.

Mosavi, LK, Cammett, TJ, Desrosiers, DC e Peng, ZY. The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. Protein Sci, 13 1435-48. 2004.

Musil, LS, Cunningham, BA, Edelman, GM e Goodenough, DA. Differential phosphorylation of the gap junction protein connexin43 in junctional communication-competent and -deficient cell lines. J Cell Biol, 111 2077-88. 1990.

Nagao, T, Higashitsuji, H, Nonoguchi, K, Sakurai, T, Dawson, S, Mayer, RJ, Itoh, K e Fujita, J. MAGE-A4 interacts with the liver oncoprotein gankyrin and suppresses its tumorigenic activity. J Biol Chem, 278 10668-74. 2003.

Nikolaev, LG, Akopov, SB, Didych, DA e Sverdlov, ED. Vertebrate Protein CTCF and its Multiple Roles in a Large-Scale Regulation of Genome Activity. Curr Genomics, 10 294-302. 2009.

Ohlsson, R, Renkawitz, R e Lobanenkov, V. CTCF is a uniquely versatile transcription regulator linked to epigenetics and disease. Trends Genet, 17 520-7. 2001.

Ohlsson, R, Lobanenkov, V e Klenova, E. Does CTCF mediate between nuclear organization and gene expression? Bioessays, 32 37-50. 2010.

Old, LJ. Cancer/testis (CT) antigens - a new link between gametogenesis and cancer. Cancer Immun, 1 1. 2001.

Old, LJ. Cancer vaccines 2003: opening address. Cancer Immun, 3 Suppl 2 1. 2003.

Old, LJ. Cancer vaccines: an overview. Cancer Immun, 8 Suppl 1 1. 2008.

Pandya, NM, Dhalla, NS e Santani, DD. Angiogenesis--a new target for future therapy. Vascul Pharmacol, 44 265-74. 2006.

Parmigiani, RB, Bettoni, F, Vibranovski, MD, Lopes, MH, Martins, WK, Cunha, IW, Soares, FA, Simpson, AJ, de Souza, SJ e Camargo, AA. Characterization of a cancer/testis (CT) antigen gene family capable of eliciting humoral response in cancer patients. Proc Natl Acad Sci U S A, 103 18066-71. 2006.

Parmigiani, RB, Bettoni, F, Grosso, DM, Lopes, A, Cunha, IW, Soares, FA, Carvalho, AL, Fonseca, F e Camargo, AA. Antibodies against the cancer-testis antigen CTSP-1 are frequently found in prostate cancer patients and are an independent prognostic factor for biochemical-recurrence. Int J Cancer, 122 2385-90. 2008.

Pfaffl, MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res, 29 e45. 2001.

Phillips, JE e Corces, VG. CTCF: master weaver of the genome. Cell, 137 1194-211. 2009.

Pilbrough, W, Munro, TP e Gray, P. Intraclonal protein expression heterogeneity in recombinant CHO cells. PLoS One, 4 e8432. 2009.

Pinyol, M, Cobo, F, Bea, S, Jares, P, Nayach, I, Fernandez, PL, Montserrat E, Cardesa A e Campo E. p16(INK4a) gene inactivation by deletions, mutations, and hypermethylation is associated with transformed and aggressive variants of non-Hodgkin's lymphomas. Blood. 91 2977-84. 1998.

Postovit, LM, Costa, FF, Bischof, JM, Seftor, EA, Wen, B, Seftor, RE, Feinberg, AP, Soares, MB e Hendrix, MJ. The commonality of plasticity underlying multipotent tumor cells and embryonic stem cells. J Cell Biochem, 101 908-17. 2007.

Pradeep, CR, Sunila, ES e Kuttan, G. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in tumor angiogenesis and malignancies. Integr Cancer Ther, 4 315-21. 2005.

Qi, CF, Martensson, A, Mattioli, M, Dalla-Favera, R, Lobanenkov, VV e Morse, HC, 3rd. CTCF functions as a critical regulator of cell-cycle arrest and death after ligation of the B cell receptor on immature B cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 100 633-8. 2003.

Rasko, JE, Klenova, EM, Leon, J, Filippova, GN, Loukinov, DI, Vatolin, S, Robinson, AF, Hu, YJ, Ulmer, J, Ward, MD, Pugacheva, EM, Neiman, PE, Morse, HC, 3rd, Collins, SJ e Lobanenkov, VV. Cell growth inhibition by the multifunctional multivalent zinc-finger factor CTCF. Cancer Res, 61 6002-7. 2001.

Recillas-Targa, F, De La Rosa-Velazquez, IA, Soto-Reyes, E e Benitez-Bribiesca, L. Epigenetic boundaries of tumour suppressor gene promoters: the CTCF connection and its role in carcinogenesis. J Cell Mol Med, 10 554-68. 2006.

Reymond, A, Camargo, AA, Deutsch, S, Stevenson, BJ, Parmigiani, RB, Ucla, C, Bettoni, F, Rossier, C, Lyle, R, Guipponi, M, de Souza, S, Iseli, C, Jongeneel, CV, Bucher, P, Simpson, AJ e Antonarakis, SE. Nineteen additional unpredicted transcripts from human chromosome 21. Genomics, 79 824-32. 2002.

Roberson, RS, Kussick, SJ, Vallieres, E, Chen, SY e Wu, DY. Escape from therapy-induced accelerated cellular senescence in p53-null lung cancer cells and in human lung cancers. Cancer Res, 65 2795-803. 2005.

Rodriguez, C, Borgel, J, Court, F, Cathala, G, Forne, T e Piette, J. CTCF is a DNA methylation-sensitive positive regulator of the INK/ARF locus. Biochem Biophys Res Commun, 392 129-34. 2011.

Rosenberg, SA. Development of cancer immunotherapies based on identification of the genes encoding cancer regression antigens. J Natl Cancer Inst, 88 1635-44. 1996.

Ross, MT, Grafham, DV, Coffey, AJ, Scherer, S, McLay, K, Muzny, D, Platzer, M, Howell, GR, Burrows, C, Bird, CP, Frankish, A, Lovell, FL, Howe, KL, Ashurst, JL, Fulton, RS, Sudbrak, R, Wen, G, Jones, MC, Hurles, ME, Andrews, TD, Scott, CE, Searle, S, Ramser, J, Whittaker, A, Deadman, R, Carter, NP, Hunt, SE, Chen, R, Cree, A, Gunaratne, P, Havlak, P, Hodgson, A, Metzker, ML, Richards, S, Scott, G, Steffen, D, Sodergren, E, Wheeler, DA, Worley, KC, Ainscough, R, Ambrose, KD, Ansari-Lari, MA, Aradhya, S, Ashwell, RI, Babbage, AK, Bagguley, CL, Ballabio, A, Banerjee, R, Barker, GE, Barlow, KF, Barrett, IP, Bates, KN, Beare, DM, Beasley, H, Beasley, O, Beck, A, Bethel, G, Blechschmidt, K, Brady, N, Bray-Allen, S, Bridgeman, AM, Brown, AJ, Brown, MJ, Bonnin, D, Bruford, EA, Buhay, C, Burch, P, Burford, D, Burgess, J, Burrill, W, Burton, J, Bye, JM, Carder, C, Carrel, L, Chako, J, Chapman, JC, Chavez, D, Chen, E, Chen, G, Chen, Y, Chen, Z, Chinault, C, Ciccodicola, A, Clark, SY, Clarke, G, Clee, CM, Clegg, S, Clerc-Blankenburg, K, Clifford, K, Cobley, V, Cole, CG, Conquer, JS, Corby, N, Connor, RE, David, R, Davies, J, Davis, C, Davis, J, Delgado, O, Deshazo, D, Dhami, P, Ding, Y, Dinh, H, Dodsworth, S, Draper, H, Dugan-Rocha, S, Dunham, A, Dunn, M, Durbin, KJ, Dutta, I, Eades, T, Ellwood, M, Emery-Cohen, A, Errington, H, Evans, KL, Faulkner, L, Francis, F, Frankland, J, Fraser, AE, Galgoczy, P, Gilbert, J, Gill, R, Glockner, G, Gregory, SG, Gribble, S, Griffiths, C, Grocock, R, Gu, Y, Gwilliam, R, Hamilton, C, Hart, EA, Hawes, A, Heath, PD, Heitmann, K, Hennig, S, Hernandez, J, Hinzmann, B, Ho, S, Hoffs, M, Howden, PJ, Huckle, EJ, Hume, J, Hunt, PJ, Hunt, AR, Isherwood, J, Jacob, L, Johnson, D, Jones, S, de Jong, PJ, Joseph, SS, Keenan, S, Kelly, S, Kershaw, JK, Khan, Z, Kioschis, P, Klages, S, Knights, AJ, Kosiura, A, Kovar-Smith, C, Laird, GK, Langford, C, Lawlor, S, Leversha, M, Lewis, L, Liu, W, Lloyd, C, Lloyd, DM, Loulseged, H, Loveland, JE, Lovell, JD, Lozado, R, Lu, J, Lyne, R, Ma, J, Maheshwari, M, Matthews, LH, McDowall, J, McLaren, S, McMurray, A, Meidl, P, Meitinger, T, Milne, S, Miner, G, Mistry, SL, Morgan, M, Morris, S, Muller, I, Mullikin, JC, Nguyen, N, Nordsiek, G, Nyakatura, G, O'Dell, CN, Okwuonu, G, Palmer, S, Pandian, R, Parker, D, Parrish, J, Pasternak, S, Patel, D, Pearce, AV, Pearson, DM, Pelan, SE, Perez, L, Porter, KM, Ramsey, Y, Reichwald, K, Rhodes, S, Ridler, KA, Schlessinger, D, Schueler, MG, Sehra, HK, Shaw-Smith, C, Shen, H, Sheridan, EM, Shownkeen, R, Skuce, CD, Smith, ML, Sotheran, EC, Steingruber, HE, Steward, CA, Storey, R, Swann, RM, Swarbreck, D, Tabor, PE, Taudien, S, Taylor, T, Teague, B, Thomas, K, Thorpe, A, Timms, K, Tracey, A, Trevanion, S, Tromans, AC, d'Urso, M, Verduzco, D, Villasana, D, Waldron, L, Wall, M, Wang, Q, Warren, J, Warry, GL, Wei, X, West, A, Whitehead, SL, Whiteley, MN, Wilkinson, JE, Willey, DL, Williams, G, Williams, L, Williamson, A, Williamson, H, Wilming, L, Woodmansey, RL, Wray, PW, Yen, J, Zhang, J, Zhou, J, Zoghbi, H, Zorilla, S, Buck, D, Reinhardt, R, Poustka, A, Rosenthal, A, Lehrach, H, Meindl, A, Minx, PJ, Hillier, LW, Willard, HF, Wilson, RK, Waterston, RH, Rice, CM, Vaudin, M, Coulson, A, Nelson, DL, Weinstock, G, Sulston, JE, Durbin, R, Hubbard, T, Gibbs, RA, Beck, S, Rogers, J e Bentley, DR. The DNA sequence of the human X chromosome. Nature, 434 325-37. 2005.

Sakurai, T, Itoh, K, Higashitsuji, H, Nagao, T, Nonoguchi, K, Chiba, T e Fujita, J. A cleaved form of MAGE-A4 binds to Miz-1 and induces apoptosis in human cells. J Biol Chem, 279 15505-14. 2004.

Scanlan, MJ, Gure, AO, Jungbluth, AA, Old, LJ e Chen, YT. Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. Immunol Rev, 188 22-32. 2002.

Scanlan, MJ, Simpson, AJ e Old, LJ. The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. Cancer Immun, 4 1. 2004.

Sedgwick, SG e Smerdon, SJ. The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. Trends Biochem Sci, 24 311-6. 1999.

Serebriiskii, I, Estojak, J, Berman, M e Golemis, EA. Approaches to detecting false positives in yeast two-hybrid systems. Biotechniques, 28 328-30, 332-6. 2000.

Sigalotti, L, Fratta, E, Coral, S, Tanzarella, S, Danielli, R, Colizzi, F, Fonsatti, E, Traversari, C, Altomonte, M e Maio, M. Intratumor heterogeneity of cancer/testis antigens expression in human cutaneous melanoma is methylation-regulated and functionally reverted by 5-aza-2'-deoxycytidine. Cancer Res, 64 9167-71. 2004.

Simpson, AJ, Caballero, OL, Jungbluth, A, Chen, YT e Old, LJ. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. Nat Rev Cancer, 5 615-25. 2005.

Smith, IM, Glazer, CA, Mithani, SK, Ochs, MF, Sun, W, Bhan, S, Vostrov, A, Abdullaev, Z, Lobanenkov, V, Gray, A, Liu, C, Chang, SS, Ostrow, KL, Westra, WH, Begum, S, Dhara, M e Califano, J. Coordinated activation of candidate proto-oncogenes and cancer testes antigens via promoter demethylation in head and neck cancer and lung cancer. PLoS One, 4 e4961. 2009.

Suyama, T, Shiraishi, T, Zeng, Y, Yu, W, Parekh, N, Vessella, RL, Luo, J, Getzenberg, RH e Kulkarni, P. Expression of cancer/testis antigens in prostate cancer is associated with disease progression. Prostate, 70 1778-87. 2011.

Tajima, K, Obata, Y, Tamaki, H, Yoshida, M, Chen, YT, Scanlan, MJ, Old, LJ, Kuwano, H, Takahashi, T, Takahashi, T e Mitsudomi, T. Expression of cancer/testis (CT) antigens in lung cancer. Lung Cancer, 42 23-33. 2003.

Taylor, BJ, Reiman, T, Pittman, JA, Keats, JJ, de Bruijn, DR, Mant, MJ, Belch, AR e Pilarski, LM. SSX cancer testis antigens are expressed in most multiple myeloma patients: co-expression of SSX1, 2, 4, and 5 correlates with adverse prognosis and high frequencies of SSX-positive PCs. J Immunother, 28 564-75. 2005.

Torrano, V, Chernukhin, I, Docquier, F, D'Arcy, V, Leon, J, Klenova, E e Delgado, MD. CTCF regulates growth and erythroid differentiation of human myeloid leukemia cells. J Biol Chem, 280 28152-61. 2005.

van der Bruggen, P, Traversari, C, Chomez, P, Lurquin, C, De Plaen, E, Van den Eynde, B, Knuth, A e Boon, T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. Science, 254 1643-7. 1991.

van Rhee, F, Szmania, SM, Zhan, F, Gupta, SK, Pomtree, M, Lin, P, Batchu, RB, Moreno, A, Spagnoli, G, Shaughnessy, J e Tricot, G. NY-ESO-1 is highly expressed in poor-prognosis multiple myeloma and induces spontaneous humoral and cellular immune responses. Blood, 105 3939-44. 2005.

Vandesompele, J, De Preter, K, Pattyn, F, Poppe, B, Van Roy, N, De Paepe, A e Speleman, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol, 3 RESEARCH0034. 2002.

Vatolin, S, Abdullaev, Z, Pack, SD, Flanagan, PT, Custer, M, Loukinov, DI, Pugacheva, E, Hong, JA, Morse, H, 3rd, Schrump, DS, Risinger, JI, Barrett, JC e Lobanenkov, VV. Conditional expression of the CTCF-paralogous transcriptional factor BORIS in normal cells results in demethylation and derepression of MAGE-A1 and reactivation of other cancer-testis genes. Cancer Res, 65 7751-62. 2005.

Vidal, M e Legrain, P. Yeast forward and reverse 'n'-hybrid systems. Nucleic Acids Res, 27 919-29. 1999.

Watanabe, I, Zhu, J, Recio-Pinto, E e Thornhill, WB. Glycosylation affects the protein stability and cell surface expression of Kv1.4 but Not Kv1.1 potassium channels. A pore region determinant dictates the effect of glycosylation on trafficking. J Biol Chem, 279 8879-85. 2004.

Weiser, TS, Guo, ZS, Ohnmacht, GA, Parkhurst, ML, Tong-On, P, Marincola, FM, Fischette, MR, Yu, X, Chen, GA, Hong, JA, Stewart, JH, Nguyen, DM, Rosenberg, SA e Schrump, DS. Sequential 5-Aza-2 deoxycytidine-depsipeptide FR901228 treatment induces apoptosis preferentially in cancer cells and facilitates their recognition by cytolytic T lymphocytes specific for NY-ESO-1. J Immunother, 24 151-61. 2001.

Wischnewski, F, Pantel, K e Schwarzenbach, H. Promoter demethylation and histone acetylation mediate gene expression of MAGE-A1, -A2, -A3, and -A12 in human cancer cells. Mol Cancer Res, 4 339-49. 2006.

Witcher, M e Emerson, BM. Epigenetic silencing of the p16(INK4a) tumor suppressor is associated with loss of CTCF binding and a chromatin boundary. Mol Cell, 34 271-84. 2009.

Woloszynska-Read, A, Mhawech-Fauceglia, P, Yu, J, Odunsi, K e Karpf, AR. Intertumor and intratumor NY-ESO-1 expression heterogeneity is associated with promoter-specific and global DNA methylation status in ovarian cancer. Clin Cancer Res, 14 3283-90. 2008.

Woloszynska-Read, A, James, SR, Song, C, Jin, B, Odunsi, K e Karpf, AR. BORIS/CTCFL expression is insufficient for cancer-germline antigen gene expression and DNA hypomethylation in ovarian cell lines. Cancer Immun, 10 6. 2011.

Zendman, AJ, Ruiter, DJ e Van Muijen, GN. Cancer/testis-associated genes: identification, expression profile, and putative function. J Cell Physiol, 194 272-88. 2003.

Zhang, R, Burke, LJ, Rasko, JE, Lobanenkov, V e Renkawitz, R. Dynamic association of the mammalian insulator protein CTCF with centrosomes and the midbody. Exp Cell Res, 294 86-93. 2004.

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I - Proteínas candidatas a interagir com CTSP-1 segundo os ensaios de duplo-híbrido em leveduras (seguidas dos respectivos números de clones sequenciados).

ANEXO II - Ensaio de senescência utilizando a linhagem celular tumoral MDA-MB-436.

ANEXO III - Súmula curricular.

ANEXO I

Proteínas candidatas a interagir com CTSP-1 segundo duplo-híbrido em leveduras (seguidas dos respectivos números de clones sequenciados).

ALDOA (aldolase A, fructose-bisphosphate)	1
BACH1 (BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 1)	2
BAG5 (BCL2-associated athanogene 5)	1
BAT2D1 (BAT2 domain containing 1)	5
C6orf51 (chromosome 6 open reading frame 51)	2
CENTG2 (centaurin, gamma 2)	1
CEP78 (centrosomal protein 78kDa)	1
CMPK (cytidylate kinase)	1
CTCF (CCCTC-binding factor (zinc finger protein))	4
DNAJA2 (DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 2)	1
FAM98B (family with sequence similarity 98, member B)	1
FLNA (A, alpha (actin binding protein 280))	2
FLNB (filamin B, beta (actin binding protein 278)	7
FLNC (filamin C, gamma (actin binding protein 280))	2
FNDC3B (fibronectin type III domain containing 3B)	1
GSDML (gasdermin-like)	2
HSMPP8 (M-phase phosphoprotein, mpp8)	1
HSP90B1 (heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member)	4
HSPD1 (heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin))	1
hypothetical protein **FLJ20184**	1
KRT18 (keratin 18)	1
MDFI (MyoD family inhibitor)	4
MORG1 (mitogen-activated protein kinase organizer 1)	1
MUC20 (mucin 20, cell surface associated)	2
MYBPC1 (myosin binding protein C, slow type)	1
N4BP1 (Nedd4 binding protein 1)	1

NFKB1 (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p105))	2
NME3 (non-metastatic cells 3)	1
NOL8 (nucleolar protein 8)	1
PPM1A (protein phosphatase 1A (formerly 2C), magnesium-dependent, alpha isoform)	4
PSMA7 (proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 7)	2
PSMC3 (proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 3)	2
PSMD4 (proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 4	2
RSF1 (remodeling and spacing factor 1)	1
RYBP (RING1 and YY1 binding protein)	1
SFRS7 (splicing factor, arginine/serine-rich 7, 35kDa)	1
SSR1 (signal sequence receptor, alpha (translocon-associated protein alpha))	6
SSU72 (SSU72 RNA polymerase II CTD phosphatase homolog (*S. cerevisiae*))	2
SUCLG2 (succinate-CoA ligase, GDP-forming, beta subunit)	1
TMEM4 (transmembrane protein 4)	1
TNRC5 (trinucleotide repeat containing 5)	3
TPI1 (triosephosphate isomerase 1)	17
TPT1 (tumor protein, translationally-controlled 1)	3
TTC1 (tetratricopeptide repeat domain 1)	4
UBE2G2 (ubiquitin-conjugating enzyme E2G 2 (UBC7 homolog, yeast))	1
USP1 (ubiquitin specific peptidase 1)	2
YWHAB (tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation ptn, beta)	1
YWHAZ (tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation ptn, zeta)	2
ZBTB16 (zinc finger and BTB domain containing 16)	2
ZCRB1 (zinc finger CCHC-type and RNA binding motif 1)	1
ZHX1 (zinc fingers and homeoboxes 1)	1

ANEXO II

Ensaio de senescência utilizando a linhagem celular tumoral MDA-MB-436

Células da linhagem celular tumoral MDA-MB-436 (adenocarcinoma de mama) dos clones superexpressando CTSP-1/HA (clones MCT-2.1 e MCT-4) e dos clones contendo vetor vazio (clones MVV-2 e MVV-5) foram plaqueadas em *Lab-Teks chamber slides*, em duplicatas. As células foram lavadas com PBS pH 6,0 e depois incubadas com solução de fixação (2% formaldeído e 0,2% glutaraldeído em PBS pH 6,0) por 5min à temperatura ambiente. As células foram novamente lavadas com PBS pH6,0 e depois incubadas em solução de coloração recém-preparada [1mg de X-Gal/ml (solução estoque de 40mg X-Gal/ml dimetil-formamida); 5mM ferrocianida de potássio; 5mM ferricianida de potássio; 2mM $MgCl_2$ em PBS pH 6,0] por aproximadamente 6h em banho-maria a 37°C. Por fim, as células foram fotografadas no microscópio *Olympus BX61*. Células que apresentaram coloração azul foram consideradas senescentes.

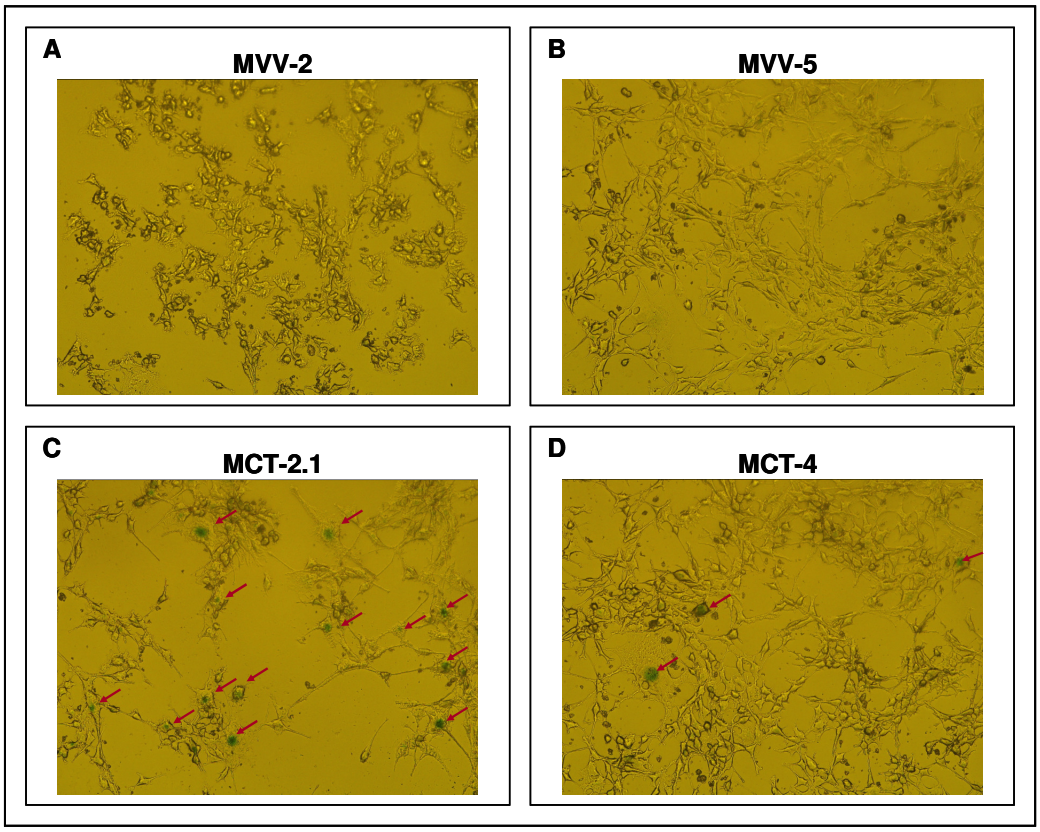

Figura do ANEXO II – *Ensaio de senescência com os clones de MDA-MB-436.* Foram analisados os clones de MDA-MB-436 vetor vazio (A) MVV-2 e (B) MVV-5 e os clones superexpressando CTSP-1/HA (C) MCT-2.1 e (D) MCT-4. Os clones superexpressando CTSP-1/HA apresentaram células senescentes (células azuis indicadas por setas) ao contrário das células dos clones controle. Como controle negativo, foram analisadas células MDA-MB-436 parentais e como controle positivo, queratinócitos (não mostrado). Microscopia de luz visível. Aumento de 200X.

ANEXO III

SÚMULA CURRICULAR

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Lilian Tiemi Inoue
Local e data de nascimento: Nova Friburgo - Rio de Janeiro (RJ), 26 de junho de 1982.

2. EDUCAÇÃO

2006-atual:
Doutorado em Ciências Biológicas (Bioquímica)
Orientadora: Dra. Anamaria Aranha Camargo
Co-orientadora: Dra. Bettina Malnic
Projeto: Caracterização funcional da interação entre as proteínas CTSP-1 e CTCF
Instituição: Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ / USP)

Fevereiro de 2005 - dezembro 2005:
Iniciação Científica
Orientadora: Dra. Anamaria Aranha Camargo
Projeto: Caracterização de C21orf100 como um novo antígeno tumoral
Instituição: Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer (ILPC), São Paulo

2002 - 2005:
Bacharelado em Ciências Biológicas – Modalidade Médica
Instituição: Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

3. BOLSAS RECEBIDAS

Doutorado Direto
Bolsa concedida pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - de 2006 a 2010.

Iniciação Científica
Bolsa concedida pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - 2005.

4. PUBLICAÇÃO

Inoue LT, Bettoni F, Pires LC, Parmigiani RB, Camargo AA. Characterization of C21orf100 as a novel prostate differentiation antigen. Applied Cancer Research. 25 (3): 116-121, 2006.