THARCÍSIO CITRÂNGULO TORTELLI JUNIOR

**Proibitina e a resposta a mecanismos de estresse em
melanoma e sua relação com a via E2F1**

**Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências**

Programa de: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Roger Chammas

São Paulo

2013

"Sempre que alguém quer esgotar um assunto,
esgota a paciência do leitor."
Oscar Wilde

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo apoio dado durante todos esses anos.

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Roger Chammas, pela oportunidade, amizade e apoio necessário para a realização deste projeto.

Ao departamento de Radiologia e Oncologia da Faculdade de Medicina da USP, e Instituto de Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) onde este projeto foi realizado.

Ao Grupo de Adesão Celular e Câncer, Adalberto Alves, Alexandre Sarmiento, Ana Carolina Ferreira Cardoso, Andréia Otake, Camila Machado, Camila M.M., Cristina da Silva, Emerson Soares, Flávia Belarmino, Glauber Brito, Guilherme Francisco, Jéssica Kipper, Karina Furuzawa, Luciana Andrade, Luciana Pescatore, Luiza Lourenço, Mariana Ikoma, Priscila Cirilo, Rafael Ikemori, Renata Saito, Rodrigo Aguiar, Ronny Mitsuoka, Silvina Bustos, Sofia Santos e Tatiane Furuya e a todos que não fazem mais parte dele.

Ao Dr. Srikumar P. Chellappan, do Moffitt Câncer Center em Tampa, EUA e aos seus pesquisadores Sandeep Singh, Sateesh Kunigal, Smitha Pilai e Jackie Johnson pela oportunidade de fazer meu doutorado sanduíche e conhecer a ciência feita nos Estados Unidos.

À Ana Lúcia Garippo pela ajuda com a microscopia confocal

Aos funcionários, Maria José, Ivanete, Elizângela, Rose, Cristina, Jair, Willame, Liliane, Adriana, Estela, Sônia, Luciana sem os quais este projeto não seria possível ser realizado.

A todo pessoal do LIM24 e CTO, que de alguma forma contribuíram para este trabalho.

À FAPESP pelo apoio financeiro e pela ajuda de bancada, sem as quais seria impossível terminar esse estudo;

À CAPES e à Comissão Fulbright pelo apoio financeiro necessário para minha ida aos Estados Unidos realizar meu doutorado sanduíche;

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 A célula Cancerosa e o Processo de evasão de morte celular	1
1.2 Melanoma	3
1.3 Mecanismos de resistência tumoral: a resposta a proteínas mal enoveladas e ao estresse oxidativo em melanomas	7
1.3.1 Cisplatina	9
1.4 Proibitina	12
1.4.1 Estrutura e modificações pós-traducionais de proibitina	12
1.4.2 Proibitina e sua relação com o câncer	14
1.4.3 Proibitina como um protetor da mitocôndria	16
1.4.4 Proibitina e sua relação com proteínas nucleares	17
1.4.5 A relação entre proibitina e vias de sinalização responsáveis pelo desenvolvimento e progressão do melanoma	20
2. OBJETIVO GERAL	23
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 Cultivo de Células	25
3.2 Análise do Ensaio de Morte Celular	26
3.3 Extração de Proteínas	26
3.4 Dosagem Proteica	27
3.5 Gel de Poliacrilamida e Western Blot	27
3.6 Microscopia Confocal	28
3.7 Depleção de soro fetal bovino	29
3.8 PCR em tempo real	29
3.9 Ensaio de siRNA	30
3.10 Ensaio de MTT	31
3.11 Tratamento com Drogas e Radiação UVB	31
3.12 Ensaio de Senescência	32
3.13 Maturação de macrófagos	33
3.14 Anticorpos Utilizados	33
3.15 Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio	34
COMITÊ DE ÉTICA	35
4. RESULTADOS	36
4.1 – O acúmulo de proibitina faz parte da resposta celular frente a diferentes agentes estressores	36
4.1.1 Tratamento com vimblastina	36
4.1.2 Privação de Soro Fetal Bovino	41

4.1.3 Tratamento com dacarbazina, temozolamida e cisplatina.....	44
4.1.4 Tratamento com tunicamicina e o estresse de reticulo endoplasmático.....	49
4.2 Localização subcelular de proibitina.....	53
4.2.1 Localização de proibitina após tratamento com cisplatina.....	53
4.2.2 Colocalização entre proibitina e proteínas da família MCM.....	56
4.3 Proibitina como um modulador da função de E2F.....	63
4.3.1 Expressão de Matriz Metaloproteinasas.....	63
4.3.2 Expressão de Vimentina e Fibronectina.....	65
4.3.3 Sensibilidade a TGF β	68
4.3.4 Proteção contra Radiação UVB.....	70
4.3.5 Relação entre proibitina e a indução de senescência.....	73
4.4 Expressão de proibitina no contexto do microambiente tumoral.....	74
5. DISCUSSÃO.....	76
5.1 Tratamento com vimblastina.....	79
5.2 Tratamento com dacarbazina e temozolamida.....	82
5.3 Privação de Soro fetal bovino.....	84
5.4 Tratamento com tunicamicina e a indução de estresse de reticulo endoplasmático.....	87
5.5 Tratamento com cisplatina.....	92
5.6 Colocalização entre proibitina e proteínas do complexo MCM.....	94
5.7 Relação entre proibitina e E2F.....	99
5.7.1 Expressão de metaloproteinasas de matriz extracelular.....	100
5.7.2 Expressão de marcadores de transição epitélio mesênquima.....	102
5.7.3 Reparo de DNA mediado por E2F.....	104
5.7.4 Indução de senescência pelo bloqueio da função de E2F.....	109
5.8 Expressão de proibitina por fatores do microambiente tumoral e a maturação de macrófagos.....	111
6. SUMÁRIO DOS RESULTADOS.....	115
7. CONCLUSÃO.....	118
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	119
FIGURAS SUPLEMENTARES	
APÊNDICE	

LISTA DE ABREVIATURAS

ATF4/6: Activating Transcription Factor 4/6

Bcl-2: B-cell lymphoma 2

CHOP: C/EBP-homologous protein

CIS: Cisplatina

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

DTIC: Dacarbazina

EGCG: Epigallocatequina

EMT: Epithelial-Mesenchymal Transition

FDA: Food and Drug Administration

HIF-1 α : Hypoxia-inducible factor 1

INCA: Instituto Nacional do Câncer

IRE1: Inositol-Requiring Gene 1

MCM: Minichromosome Maintenance Proteins

MMPs: Matriz Metaloproteinases

MTIC: Monomethyl Triazeno Imidazole Carboxamide

NCI: National Cancer Institute

NER: nucleotide excision repair

ORC: Complexo de reconhecimento da origem de replicação

PERK: PKR-like endoplasmic reticulum (ER) kinase

PHB: Proibitina

Rb: Proteína Retinoblastoma

ROS: Reactive Oxygen Species

SPFH: Stomatin, Prohibitin, Flotillin, HflK/C

TEM: Temozolamida

TUN: Tunicamicina

UPR: Unfolded Protein Response

RESUMO

Tortelli Junior T.C. *Proibitina e a resposta a mecanismos de estresse em melanoma e sua relação com a via E2F1* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Entre todos os cânceres de pele, o melanoma está entre os menos comuns, mas é responsável pela maior parte das mortes. No caso da doença metastática, não há um tratamento satisfatório capaz de prolongar a vida do paciente. Isso leva à necessidade de novas estratégias e de novos tratamentos que possam reverter a quimiorresistência do tumor. Entre as proteínas que têm seu perfil de expressão modificado no melanoma está a proibitina, cuja expressão aumenta durante a progressão tumoral. Proibitina é uma chaperona mitocondrial pertencente a uma família de proteínas que possuem um resíduo hidrofóbico SPFH, que confere a ela uma capacidade de ancoragem e de organização de espaços em membranas. Além disso, no compartimento nuclear, é um inibidor da família de fatores de transcrição E2F, juntamente com a proteína retinoblastoma (Rb). Em melanomas, proibitina localiza-se no citoplasma, associada à mitocôndria, e no núcleo. No citoplasma, proibitina faz parte da resposta a diversas drogas, como cisplatina, dacarbazina, temozolamida, vimblastina e tunicamicina pode estar relacionado com o aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS), já que essas drogas podem de alguma forma induzir ROS intracelular. O aumento de expressão de proibitina, nesse contexto, poderia fazer parte de uma

resposta protetora da mitocôndria, o que em última análise protegeria a célula contra a morte celular, já que a inibição de proibitina sensibiliza a célula ao tratamento com cisplatina ou tunicamicina. Além disso, o estresse provocado pela privação de soro fetal bovino em linhagens de melanoma leva ao aumento de expressão de proibitina e é acompanhado pela indução de ROS. No núcleo, proibitina está colocalizada com MCM5 e MCM7, mas não MCM2. A inibição de proibitina leva ao aumento de expressão de metaloproteinases de matriz extracelular, não só em melanomas, mas também em linhagens de câncer de mama e de câncer de pulmão. Ainda, proibitina parece estar relacionada com o fenômeno da transição epitélio mesênquima, já que a inibição de proibitina leva ao aumento de expressão de marcadores mesenquimais como N-caderina e vimentina e a perda de expressão de marcadores epiteliais, como a E-caderina. Outras funções controladas por E2F1 que proibitina pode estar modulando são a capacidade de E2F1 induzir reparo de DNA devido a lesões causadas por radiação UVB e a indução de senescência. A inibição de proibitina em linhagem de câncer de pulmão protegeu a célula contra o dano genotóxico causado pela radiação UVB, pelo aumento da proteína de reparo de DNA Gadd45a, que é induzida por E2F1. Ainda, a inibição de proibitina diminuiu a quantidade de células senescência induzida por adriamicina em linhagens de melanoma. Ainda, a expressão de proibitina responde a fatores do microambiente tumoral como TGF β , IL4 e LPS juntamente com INF γ e, além disso, têm sua expressão diminuída durante a maturação de macrófagos. Esses resultados mostram que proibitina pode atuar protegendo o tumor ou bloqueando vias

importantes para seu desenvolvimento, dependendo da sua compartimentalização subcelular.

Descritores: Proibitina; Fator de transcrição E2F1; Mitocôndrias; Melanoma; Cisplatina; Tunicamicina; Transição epitélial-mesênquimal; Senescência

ABSTRACT

Tortelli Junior T.C. Prohibitin and the response to stress mechanisms in melanoma and its relationship with the E2F1 pathway [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2013.

Among all skin cancers, melanoma is the least common, but is responsible for most deaths. In metastatic disease, no satisfactory treatment can prolong the patient's life. This leads to the need for new strategies and new treatments that may reverse tumor chemoresistance. Among proteins that have their expression profile altered in melanoma is prohibitin whose expression increases during tumor progression. Prohibitin is a mitochondrial chaperone belonging to a family of proteins which possess a hydrophobic residue SPFH, which gives it a capacity for anchorage and organization in membrane regions. Furthermore, in the nuclear compartment, prohibitin is an inhibitor of the E2F transcription factor family, together with the retinoblastoma protein (Rb). In melanomas, prohibitin is located in the cytoplasm, associated to the mitochondria, and inside the nucleus. In the cytoplasm, prohibitin is part of the response to various drugs such as cisplatin, dacarbazine, temozolomide, vinblastine and tunicamycin and may be associated with increased reactive oxygen species (ROS), since these drugs can somehow induce intracellular ROS. Prohibitin overexpression in this context could be part of a protective response of the mitochondria, which ultimately protect cells against death, as prohibitin inhibition sensitizes cells

to cisplatin or tunicamycin treatment. Moreover, the stress caused by deprivation of fetal bovine serum in melanoma cell lines leads to prohibitin overexpression and is accompanied by ROS induction. In the nucleus, prohibitin is colocalized to MCM5 and MCM7, but not to MCM2. Inhibition of prohibitin leads to increased expression of matrix metalloproteinases, not only on melanomas but also on breast cancer and lung cancer cell lines. Further, prohibitin appears to be related to the phenomenon of epithelial mesenchymal transition, since prohibitin inhibition leads to increased expression of mesenchymal markers such as N-cadherin and vimentin and loss of expression of epithelial markers, such as E-cadherin. Other functions controlled by E2F1 that are modulated by prohibitin include the ability of E2F1 to induce DNA repair against UVB radiation and the induction of cellular senescence. Inhibition of prohibitin in lung cancer cell line protected against genotoxic damage caused by UVB radiation, due to DNA repair protein Gadd45a overexpression, which is induced by E2F1. Also, prohibitin inhibition decreased the amount of cell senescence induced by adriamycin in melanoma cell line. Further, prohibitin expression is triggered by tumor microenvironmental factors such as TGF β , IL4, and LPS together with INF γ and, in addition, prohibitin expression decreases during macrophages maturation. These results show that prohibitin may act protecting the tumor or blocking pathways important for its development, depending on its subcellular compartment distribution.

Descriptors: Prohibitin; E2F1 transcription factor; Mitochondrias; Melanoma; Cisplatin; Tunicamycin; Epithelial-mesenchymal transition; Senescence.

1. INTRODUÇÃO

1.1 A célula cancerosa e o processo de evasão a morte celular

Cânceres são doenças complexas, caracterizadas por alterações genômicas que levam a (1) ativação de vias associadas a vários genes que controlam positivamente a proliferação e sobrevivência celular, como os oncogenes; e/ou, (2) a inativação de genes que controlam negativamente estes processos, como os genes supressores de tumor; ou ainda, (3) disfunção de genes que controlam a estabilidade genômica (genes de reparo de DNA). Sua complexidade é entendida em termos de alguns princípios onde alterações genéticas, que levam à alteração na função ou padrão de expressão do produto dos genes, ativando ou inativando vias de controle da homeostasia celular se somam a alterações epigenéticas, que levam a alterações no padrão de expressão de outros genes, levando a perturbações da fisiologia celular. Segundo Hanahan e Weinberg, que sistematizaram as principais classes destas alterações, seis são as alterações funcionais que caracterizam a transformação maligna completa, isto é, o desenvolvimento do câncer (Hanahan e Weinberg, 2000). São elas: auto-suficiência em fatores de crescimento (Skobe e Fusenig, 1998); insensibilidade a inibidores de crescimento (Weinberg, 1995); potencial infinito de replicação (Hayflick, 1997); (Bryan e Cech, 1999); angiogênese (Hanahan e Folkman, 1996);

(Varner e Cheresch, 1996); capacidade de invadir tecidos (Sporn, 1996); 2(Werb, 1997); e evasão de apoptose (Harris, 1996); (Ashkenazi and Dixit, 1999). Este trabalho foi revisitado pelos próprios autores em 2011, quando sistematizaram outras quatro características fundamentais de cânceres, que são: instabilidade genômica e mutações (Berdasco e Esteller, 2010); (Kinzler e Vogelstein, 1997), reprogramação do metabolismo energético (Warburg, 1930, 1956^a, 1956b); (DeBernardinis *et al.* 2008); (Jones e Thompson, 2009), evasão do sistema imune (Vadjic e van Leeuwen, 2009); (Teng *et al.* 2008) e a inflamação promovida pelo tumor (DeNardo *et al.* 2010); (Grivennikov *et al.* 2010).

A evasão do processo apoptótico é uma das alterações mais importantes necessárias para a sobrevivência de uma célula tumoral. Esta característica garante à célula cancerosa a capacidade de proliferação sustentada em diferentes microambientes teciduais. Células normais desalojadas de seus tecidos de origem tendem a morrer, por ativação de um processo que vem sendo chamado de *anoikis* (do grego, sem casa ou desalojado). As células cancerosas resistem à morte por desalojamento. De nada adiantaria o crescimento descontrolado de células tumorigênicas, a sua capacidade de criar novos vasos, sua auto-suficiência em crescer, se elas não sobrevivessem ao desalojamento tecidual (*anoikis*). Esta característica da célula cancerosa se deve à inativação ou atenuação funcional de vias que desencadeiam o processo de apoptose. Sua consequência clínica é a progressiva resistência à indução de morte por diferentes agentes como os agentes utilizados em quimioterapia e radioterapia.

A aquisição dessas características pelas células tumorais ou pelo microambiente tumoral torna a doença de difícil tratamento em casos avançados, principalmente após o surgimento da doença metastática. Entre os tumores onde o prognóstico é ruim para o paciente não havendo um tratamento eficiente, ou que pelo menos possa prolongar sua sobrevivência, está o melanoma.

1.2 Melanoma

Melanoma é um tipo de câncer de pele originado nos melanócitos com predominância em adultos brancos e sua incidência tem crescido mundialmente. Apesar de sua baixa incidência, representa apenas 4% de todos os tipos de câncer de pele, possui alta letalidade. Além de representar um potencial problema de saúde pública pela sua incidência crescente, melanomas ainda se apresentam como tumores de difícil tratamento, especialmente quando diagnosticados em estádios avançados, apresentando taxa de resposta a quimioterapia que não ultrapassa 30% de resposta clínica objetiva.

Os principais fatores de risco ao desenvolvimento do melanoma são: a sensibilidade ao sol (queimadura pelo sol e não bronzeamento), a pele clara, a exposição excessiva ao sol, a história prévia de câncer de pele, história familiar de melanoma, presença de nevo congênito, maturidade (após 15 anos de idade a propensão para este tipo de câncer aumenta),

Xeroderma Pigmentoso (doença congênita que se caracteriza pela intolerância total da pele ao sol, com queimaduras externas, lesões crônicas e tumores múltiplos) e presença de nevo displásico (lesões escuras da pele com alterações celulares pré-cancerosas) (INCA, 2012 – Instituto Nacional do câncer).

Melanomas podem ser classificados de acordo com sua localização anatômica e padrão de crescimento em melanomas de crescimento radial (RGP), onde não há comprometimento da lâmina basal da epiderme ou vertical (VGP), onde há o comprometimento da lâmina basal com invasão da derme. (Chudnovsky *et al.* 2005).

O tratamento do melanoma se dá, preferencialmente, por cirurgia. Em tumores muito finos, a biópsia necessária para a confirmação da doença pode ser suficiente para a remoção completa do tumor. O tecido adjacente a ser removido e o grau de profundidade da cirurgia depende da espessura do tumor primário. Caso haja comprometimento de linfonodos adjacentes, sua remoção é necessária.

Caso a cirurgia não seja suficiente pode se tentar usar uma combinação de quimioterapia, utilizando-se quimioterápicos como Dacarbazina e Cisplatina, inibidores de BRAF com mutação V600E, como o vemurafenib e imunoterapia através de inibidores de CTLA-4, como o ipilimumab ou de Interleucina-2. Todos esses tratamentos, porém, têm pouca ou nenhuma eficácia em casos de doença metastática (NCI – *National Cancer Institute*).

Biologicamente, o desenvolvimento do melanoma parece devido a modificações genéticas ou epigenéticas que levam à perda de expressão de proteínas relacionadas ao controle do ciclo celular como p16^{INK4a}, p14^{ARF}, CDK4 e CDK6, pRB (Chin, 2003); (Sharpless *et al.* 2003); a translocação de β -Catenina para o núcleo, com a ativação de genes relacionados com a transição epitélio-mesenquimal, além de diminuir a adesão mediada por caderina (Lee *et al.* 2006); o aumento na atividade da via MAPK e AKT, que são necessárias para o desenvolvimento de um melanoma de crescimento radial e vertical, respectivamente (Govindarajan *et al.* 2003); (Govindarajan *et al.* 2007), além de estarem relacionadas a vias de sobrevivência (Govindarajan *et al.* 2007).

Destas, as principais vias de sinalização alteradas são: a perda de p16^{INK4a}; mutação e/ou alteração na localização de β -catenina; ativação de AKT e MAPK (Fried and Arbiser, 2008).

A via de sinalização MAPK parece ter uma importância muito grande no desenvolvimento do melanoma. Essa via é responsável por transduzir sinais extracelulares, como a ligação de fatores de crescimento em receptores de superfície celular até o núcleo da célula, onde há ativação de diversos mecanismos de proliferação e diferenciação. A ativação da via MAPK em melanócitos imortalizados é suficiente para induzir tumorigênese nessas células, além de ativar o gatilho angiogênico, aumentando a produção de VEGF e de metaloproteinases de matriz extracelular (Govindarajan *et al.* 2003).

Há ainda outro contexto que favorece o aparecimento de um melanoma, que é o efeito de espécies reativas de oxigênio (ROS) em seu desenvolvimento. O estresse oxidativo pode levar à perda de p16^{INK4a} juntamente com a ativação de MAPK (Govindarajan *et al.* 2002). Além disso, a transformação de um melanoma de crescimento radial em vertical por AKT é acompanhado por altos níveis de espécies reativas de oxigênio. Isso é capaz de levar ao aumento de produção de NF-κB, que é importante para a produção de interleucinas como IL-8 e IL10 e o fator de crescimento vascular endotelial VEGF (Fried and Arbiser, 2008).

A insensibilidade do tumor contra drogas quimioterápicas se inicia pela seleção de populações resistentes dentro da massa tumoral. Dentro de uma população de células tumorais, o quimioterápico pode funcionar como um fator de seleção, onde algumas células, que são capazes de sobreviver ao agravo gerado pela droga, acabam sobrevivendo e proliferam. Isso torna o tumor progressivamente mais agressivo e insensível ao tratamento. Essa insensibilidade, em última análise, é responsável pelas mortes causadas por um câncer.

Um exemplo disso, que ocorre na clínica, é a insensibilidade do melanoma após tratamento com o inibidor de BRAF V600E vemurafenib (Sala *et al.* 2008). Estudos pré-clínicos, em modelos animais, mostraram que o tratamento com vemurafenib causaram regressão parcial ou total do tumor e aumentaram sua sobrevivência (Yang *et al.* 2010).

Em pacientes, estudos clínicos mostraram que, apesar de grande inibição da via MAPK em dados histológicos (mais de 80% de inibição de

ERK), não houve regressão da doença (Bollag *et al.* 2010). Após seis meses de tratamento com vemurafenib, houve um aumento na sobrevivência global e livre de doença em comparação com Dacarbazina, em pacientes que não receberam nenhum tipo de tratamento (Chapman *et al.* 2011).

Diversas explicações têm sido buscadas para a falha no tratamento. Boa parte delas mostram que há uma reativação da via MAPK, causada pela reativação da via *downstream* a BRAF. Diversos estudos mostram que o tratamento com vemurafenib leva à reativação de MEK por vias independentes de BRAF (Johannessen *et al.* 2010), aumento de expressão de NRAS (Kaplan *et al.* 2011); (Nazarian *et al.* 2010) ou à ativação de vias alternativas, como a ativação de vias dependente do receptor β do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR β) (Nazarian *et al.* 2010); (Shi *et al.* 2011).

1.3 Mecanismos de resistência tumoral: a resposta a proteínas mal enoveladas e ao estresse oxidativo em melanomas

Melanomas, assim como outros tumores, possuem áreas de baixa tensão de oxigênio, ou hipóxicas, em seu interior. Essas regiões, além de diretamente relacionadas à eficácia da radioterapia (Leith *et al.* 1994) podem levar a ativação de um sistema complexo de adaptação, mediado pelo Reticulo Endoplasmático (RE), denominado *Unfolded Protein Response* (UPR).

O Retículo Endoplasmático é uma organela especializada na maturação de proteínas destinadas à secreção ou ligadas a membranas celulares, além de regular a concentração de cálcio intracelular. Em condições de stress que afetam a maturação de proteínas, ocorre um acúmulo de proteínas mal enoveladas dentro do Retículo Endoplasmático, desencadeando o processo de UPR, que pode levar a um processo de adaptação celular ao estímulo indutor do stress ou, em casos mais extremos, pode ocorrer a ativação de um programa celular que levará a célula à morte (Ron e Walter, 2007).

A resposta conhecida como UPR pode ser induzida por tunicamicina, um antibiótico que inibe a *N-glicosilação* de proteínas no lúmen do Retículo Endoplasmático, pela inibição da enzima *N-acetilglucosamina* transferase. A ação da tunicamicina provoca a formação de proteínas mal enoveladas dentro do Retículo Endoplasmático, induzindo a expressão e liberando GRP78 de PERK, IRE1 e ATF6 (Marciniak *et al* 2004).

Outros mecanismos de adaptação podem ocorrer dentro de um tumor. Pode haver, por exemplo, seleção de células resistentes induzida por diversos tipos de quimioterápicos, como a cisplatina, droga comumente utilizada no tratamento de melanomas, mas não como primeira opção de tratamento. A ação da cisplatina pode levar à produção de ROS (Martins *et al.* 2008), que pode ser um fator importante de seleção dentro de uma massa tumoral.

1.3.1 Cisplatina

A cisplatina (cis-diaminodicloroplatina II) é um dos agentes antitumorais mais potentes conhecidos, atuando em vários tipos de tumores, como câncer de ovário, testículo e cabeça e pescoço (Siddik, 2003). A cisplatina sofre uma modificação estrutural após entrar na célula para poder exercer sua função biológica. Ao entrar em um ambiente intracelular com pouco cloreto, a cisplatina é hidratada formando um composto carregado positivamente que pode reagir com espécies nucleofílicas (Cullen *et al.* 2007).

Um dos alvos da cisplatina pode ser o DNA nuclear, o que a caracteriza como um agente indutor de dano no DNA (Cullen *et al.* 2007). Sua citotoxicidade ocorre pela interação dos sítios N7 de bases púricas, formando interações do tipo DNA-proteínas ou do tipo DNA-DNA, o que leva a formação de um aduto na mesma fita ou entre as fitas complementares do DNA (Eastman, 1987). Entretanto, o aduto formado pela ligação da cisplatina entre fitas complementares parece ser o principal responsável pela sua ação citotóxica (Pinto and Lippard, 1985).

Embora os adutos de DNA gerados pela ação da cisplatina afetem a replicação do DNA, não há uma correlação entre a inibição da síntese de DNA e citotoxicidade (Sorenson and Eastman, 1988). A citotoxicidade gerada pela cisplatina é iniciada através do reconhecimento do dano no DNA, através de moléculas responsáveis pelo seu reparo (Bellon *et al.* 1991), que podem levar a indução de morte celular ou a parada de ciclo

celular na fase G2/M (Shi *et al.* 1994); (Shapiro and Harper, 1999). Há, ainda, uma correlação direta entre a quantidade de adutos formados e a citotoxicidade causada pela cisplatina (Donahue *et al.* 1990). Entre as moléculas envolvidas no reparo de DNA, estão: hMSH2 ou hMutS α - componentes do “mismatch repair complex” (MMR) (Donahue *et al.* 1990); HMG1 e HMG2; o fator de ligação “upstream” do transcrito da RNA polimerase I humana (hUBF); a proteína de ligação do fator transcricional TATA (TBP) (Donahue *et al.* 1990); (Fink *et al.* 1998); (Chaney and Vaisman, 1999).

Outra linha de evidência sugere que a mitocôndria seja um alvo crítico da cisplatina (Cullen *et al.* 2007). O DNA mitocondrial é particularmente sensível a cisplatina por não ser capaz de reparar eficientemente seu DNA através do reparo por excisão de nucleotídeos (NER) (Preston *et al.* 2001).

A ação da cisplatina pode levar a uma disfunção da mitocôndria através da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Martins *et al.* 2008). Esse processo leva a ativação de vias de apoptose através de p53 (Li *et al.* 1999) e/ou pela liberação de citocromo c (Hoye *et al.* 2008), mas também pode levar à migração e ao crescimento celular (Ushio-Fukai, 2006), a um enovelamento errado de proteínas, que pode ser corrigido por chaperonas (Friguet *et al.* 2008) e a um aumento na produção de NF- κ B que leva à produção de VEGF (Govindarajan *et al.* 2007), SIRT1 (uma histona deacetilase que inibe a atividade de p53) (Luo *et al.* 2001); (Vaziri *et al.* 2001) e rictor (uma subunidade de mTOR relativamente insensível à rapamicina) (Sarbasov *et al.* 2004).

A resistência à cisplatina ocorre quando há falha na capacidade da célula entrar em apoptose. Esse processo pode ocorrer pela exposição crônica ao quimioterápico ou por uma capacidade intrínseca da célula tumoral. De maneira geral, os mecanismos de resistência impedem o contato da cisplatina com o seu alvo ou evitam a sinalização pró-apoptótica decorrente do efeito da cisplatina. Apesar de apenas um único mecanismo de resistência poder ocorrer em células tumorais (Kelland *et al.* 1992), o mais comum é que uma combinação de vários mecanismos aconteçam ao mesmo tempo em prol da sobrevivência celular (Richon *et al.* 1987).

Entre os mecanismos mais importantes estão:

1. Redução do acúmulo intracelular de cisplatina, por diminuição de sua captação (Kelland, 2000), pelo aumento da extrusão da droga, via receptor MRP2 (Kool *et al.* 1997) ou por uma combinação desses dois mecanismos;
2. Inativação de cisplatina por moléculas nucleofílicas como as glutatonas (GSH), que tem sua expressão aumentada após exposição crônica ao quimioterápico (Kelland, 1993);
3. Aumento da capacidade de reparo de DNA, principalmente pelo reparo de excisão de nucleotídeos (Furuta *et al.* 2002);
4. Aumento da expressão de Bcl-2 (Isonishi *et al.* 2001);
5. Regulação da via MAPK levando ao aumento de expressão de proteínas relacionadas com reparo de DNA (Li e Melton, 2012).

Uma vantagem em se tentar sensibilizar o tumor à cisplatina reside no baixo custo deste quimioterápico, em relação a outras drogas usadas no tratamento do melanoma, como a dacarbazina e as várias abordagens alvo-dirigidas que têm sido propostas no momento. Isso diminui o custo do tratamento para o paciente e para o sistema de saúde pública. Em estudo colaborativo envolvendo nosso grupo, identificaram-se algumas proteínas acumuladas ao longo do processo de aquisição de resistência de uma linhagem de melanoma (LB373Mel) ao tratamento com cisplatina. Entre as proteínas acumuladas, encontra-se a molécula de proibitina.

1.4 Proibitina

1.4.1 Estrutura e modificações pós-traducionais de proibitina.

A proibitina (PHB, ou proibitina 1) é uma proteína ubiquamente expressa, encontrada principalmente na mitocôndria, no núcleo e na membrana plasmática. Possui massa molecular de 30-32 kDa, apresentando similaridade com uma proteína chamada proibitona (PHB2), de massa molecular de 37 kDa. PHB e PHB2 podem formar um complexo de alto peso molecular, identificado na mitocôndria e na membrana plasmática (Nijtmans *et al.* 2000); (Sharma and Qadri, 2004). Sua estrutura é altamente conservada, sendo a proibitina de rato idêntica à de camundongo, diferindo em apenas um único aminoácido da proibitina humana. O gene humano da

proibitina 1 localiza-se no cromossomo 17 (17q21) (Sato *et al.* 1992) enquanto que o gene humano da proibitina 2 localiza-se no cromossomo 12 (12p13) (Terashima *et al.* 1994). O *knock-out* do gene de PHB leva à perda de expressão sustentada da proteína PHB2 e vice-versa (Berger and Yaffe, 1998).

A proibitina possui um domínio do tipo SPFH (Stomatin, Prohibitin, Flotillin, HflK/C), na sua porção amino-terminal, possuindo um domínio transmembrânico. Em bactérias, o domínio SPFH foi dividido em 12 subfamílias sendo a proibitina parte da subfamília SPFH4 (Hinderhofer *et al.* 2009). Esse domínio permite que a proibitina associe-se a lipídios, além de ancorar-se à membrana plasmática (Sharma *et al.* 2004) para formar arcabouços, onde pode atuar através de vias de sinalização com o citoesqueleto (Liu *et al.* 2005). Arcabouços estruturais formados por proteínas com domínio SPFH podem, por um lado, formar plataformas estáveis para diversas funções biológicas e por outro lado, podem funcionar como unidades regulatórias dinâmicas, com implicação até na regulação da expressão gênica.

Na sua porção carboxi-terminal, há uma repetição de EA (Glutamato e Alanina), importante para a formação de oligômeros (Langhorst *et al.* 2005).

A proibitina pode sofrer pelo menos quatro modificações pós-traducionais já descritas: pode sofrer fosforilação por AKT, provavelmente no aminoácido treonina-258, em linhagem de células pancreáticas MiaPaCa-2 (Han *et al.* 2008); pode ser alquilada no aminoácido aspartato-40 (Bouchon *et al.* 2007); pode ser fosforilada pela insulina no aminoácido tirosina-114 e

259 (Ande *et al.* 2009); pode ser modificada pela O-ligada β -N-Acetilglucosamina (O-GlcNAc transferase, OGT) nos aminoácidos serina-121 e treonina-258 (Ande e Moulik, 2009). A fosforilação por AKT em treonina-258 é particularmente importante, pois a progressão de melanomas de crescimento radial em crescimento vertical, como mostrado na linhagem de melanoma com crescimento radial WM35, depende da superexpressão de AKT (Govindarajan *et al.* 2007) e seu bloqueio diminui a expressão de várias moléculas essenciais para a progressão do melanoma (Fried and Arbiser, 2008). A alquilação em aspartato-40 por cicloexilfenil-cloretil urea (CCEU) está associada com a parada de ciclo celular em G1, em linhagem de melanoma murino B16F10 (Bouchon *et al.* 2007). A fosforilação por insulina em tirosina-259 e a modificação pela OGT em treonina-259 possivelmente funcionam como um *switch binário* devido à proximidade desses aminoácidos (Ande e Moulik, 2009).

1.4.2 Proibitina e sua relação com o câncer.

Proibitina está associada a diversos tipos de câncer. Estudos proteômicos mostraram que proibitina está diferencialmente expresso em modelo de câncer de mama (Aka e Lin, 2012) (Chen YW *et al.* 2011), neuroblastoma (Yu *et al.* 2011), câncer de bexiga (Chen NG *et al.* 2011), carcinoma hepatocelular (Chen XL *et al.* 2010), câncer de ovário (Lim *et al.* 2011), câncer de próstata (Alaiya *et al.* 2011), câncer de cólon (Kimura *et al.*

2010), câncer colorectal (Chen D *et al.* 2010), câncer gástrico (Jing *et al.* 2010), câncer bronco-epitelial (Zhao *et al.* 2010), câncer de pulmão (Keenan *et al.* 2009), câncer de esôfago (Qi *et al.* 2005), leucemia (Qin *et al.* 2006), câncer de tireoide (Srisomsap *et al.* 2002), mostrando que a indução de proibitina pode estar relacionada à proteção contra morte celular em diversos tipos de tumor e a sua perda de expressão pode estar relacionada com a liberação da via E2F em outros tantos tipos de tumor.

Ainda, diversos modelos mostram que proibitina protege contra morte celular induzida por ROS. Em células epiteliais intestinais, a superexpressão de PHB induz a expressão de Glutathione-S-Transferase e protege contra a depleção de glutathionas induzida por agentes oxidantes, diminuindo o acúmulo de metabólitos de oxigênio (Theiss *et al.* 2007). Em cardiomiócitos, o aumento de expressão de proibitina protege contra tratamento por peróxido de hidrogênio, por diminuir a indução de apoptose (Liu *et al.* 2009).

Em regiões de hipóxia, a superexpressão de proibitina protege cardiomiócitos contra morte celular por inibir a queda do potencial de membrana mitocondrial, a diminuição da expressão de BCL-2 e a liberação de citocromo c para o citoplasma (Muraguchi *et al.* 2010). Proibitina, também participa de outros processos fisiológicos como a manutenção da capacidade angiogênica de células endoteliais por proteger a mitocôndria contra a ação de ROS, impedindo que a célula endotelial entre em senescência e perca a capacidade de formar vasos (Schleicher *et al.* 2008).

1.4.3 Proibitina como um protetor da mitocôndria.

Na mitocôndria, o complexo PHB-PHB2 localiza-se na membrana interna dessa organela. Esse complexo possui um papel na estabilização de proteínas mitocondriais associadas com a cadeia respiratória (Nijtmans *et al.* 2000), funcionando como uma chaperona mitocondrial. PHB2 liga-se a esfingosina-1-fosfatase (S1Pase) regulando o complexo 4 da cadeia respiratória. A depleção de PHB2, ou do principal produtor de S1P, esfingosina quinase 2 (SphK2), leva a uma disfunção da respiração mitocondrial através da citocromo-c oxidase (Strub *et al.* 2011).

Sua falta está associada à deficiência da biogênese mitocondrial (Artal-Sanz *et al.* 2003). Mutantes de PHB, PHB2 e ambos têm a vida média mitocondrial diminuída, o que está associado a uma diminuição do potencial de membrana transmitocondrial. Além disso, o complexo PHB-PHB2 parece ser importante na formação das cristas mitocondriais, pois a deleção de PHB2 resulta na perda de isoformas longas de OPA-1 comprometendo a formação das cristas mitocondriais (Merkwirth *et al.* 2008).

Mutações em genes envolvidos na manutenção da morfologia mitocondrial (Mmm1p) ou em genes envolvidos na manutenção do DNA mitocondrial (Mdm10p e Mdm12p) são letais, quando há falta de PHB ou PHB2 (Berger and Yaffe, 1998). Esse complexo, assim, é importante para a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), podendo funcionar como um mecanismo de resistência contra drogas que atuam dessa forma, como a cisplatina.

A comunicação entre a mitocôndria e o núcleo é um processo crítico para que seja mantida a atividade mitocondrial em condições de stress. A perda dessa comunicação pode levar ao envelhecimento precoce juntamente com doenças associadas ao envelhecimento. Em condições de stress, proibirina pode translocar da mitocôndria para o núcleo em células epiteliais pigmentares de retina humana (Sripathi *et al.* 2011). Ainda, o tratamento com etanol, em células betas do pâncreas, promove uma translocação de proibirina do núcleo para a mitocôndria protegendo essas células contra apoptose induzida pelo etanol (Lee *et al.* 2010), evidenciando que proibirina pode ser translocada tanto para o núcleo, quanto para a mitocôndria.

Proibirina está relacionada também com o processo autofágico. O silenciamento de PHB em células epiteliais intestinais induz autofagia mitocondrial através de um aumento de ROS e expressão exógena de PHB protege a célula contra autofagia induzida por TNF α . A perda da autofagia provocada pela depleção de PHB em células epiteliais intestinais leva a um dano mitocondrial e aumento de citotoxicidade, podendo estar relacionada com doença de Crohn (Kathiria *et al.* 2012).

1.4.4 Proibirina e sua relação com proteínas nucleares.

No núcleo, a proibirina possui um papel como supressor de tumor. Ela pode inibir a proliferação celular através da repressão direta ou indireta da atividade transcricional de E2F e modular positivamente a atividade

transcricional de p53 (Fusaro *et al.* 2003). Sua ação repressora direta da transcrição mediada por E2F se dá através de sua ligação de um sítio conservado, diferente de pRb. É necessário, também, o recrutamento de Brg-1/Brm (Wang *et al.* 2002). Apesar desse recrutamento se dar independentemente de pRb, sua presença é necessária para a repressão de E2F (Wang *et al.* 2002). Sua ação repressora indireta se dá pela estabilização de *RING Finger protein 2* (RNF2) (Choi *et al.* 2008).

Ainda no núcleo, proibitina parece regular diversos processos além de seu envolvimento com a via E2F. Em células de câncer de mama MCF-7 proibitina pode regular a replicação do DNA pela sua interação com proteínas do complexo de manutenção do minicromossomo (MCM2-7). Proibitina interage fisicamente, com diferença de afinidade, com MCM2, MCM5 e MCM7 nessa linhagem inibindo a replicação do DNA (Rizwani *et al.* 2009). Em células HeLa, a depleção de proibitina 2 provoca a separação prematura de cromátides irmãs levando a uma parada da mitose, mostrando sua importância para a proteção do centrômero contra a fosforilação por Plk1 no início da mitose (Takata *et al.* 2007).

Proibitina é alvo de Vitamina D em células MCF-7. A região promotora de proibitina possui duas regiões responsivas a receptores de Vitamina D. O tratamento com Vitamina D induz a expressão de proibitina, tanto em nível de RNA como em nível proteico. Esse aumento de expressão inibe a proliferação celular e promove a ação antiproliferativa da Vitamina D (Peng *et al.* 2006). Em condições de stress, observa-se uma diminuição da expressão de proibitina acompanhada pela manutenção da proliferação

celular induzida por Vitamina D em células epiteliais de mama (Peng e Mehta 2007), mostrando a importância do contexto em que a célula se encontra para se determinar a ação de proibirina como um fator pró ou anti-proliferativo.

Proibirina foi identificada também como alvo de c-MYC em células HUVEC através ensaios de imunoprecipitação de cromatina (CHIP) (Menssen e Hermeking, 2002) (Haggerty *et al.* 2003). Ainda, o tratamento com N-nitrosaminas promove a diminuição da expressão de proibirina e c-Myc, em modelo de câncer de esôfago (Xie *et al.* 2010).

Em alguns modelos, a proibirina colocaliza-se com p53 induzindo sua atividade transcricional. No citoplasma, essa colocalização é mínima. Tratamento de linhagens de carcinoma de mama humano com camptotecina, um inibidor de topoisomerase (Rastogi *et al.* 2006), induz a saída de proibirina e p53 do núcleo e a migração de p53 para a mitocôndria. Sua colocalização após o tratamento se dá na região perinuclear, sugerindo uma atividade modulatória da apoptose por afetar a função de p53. Neste modelo especificamente, após algumas horas, a maior parte da proibirina se localiza no citoplasma sugerindo que sua saída do núcleo ocorre quando a célula progride em direção ao processo apoptótico (Fusaro *et al.* 2003). A saída de proibirina do núcleo depende de CRM-1 (Rastogi *et al.* 2006). Inibição da exportação nuclear de proibirina foi seguida de inibição de apoptose (Rastogi *et al.* 2006).

1.4.5 A relação entre proibitina e vias de sinalização responsáveis pelo desenvolvimento e progressão do melanoma.

Proibitina parece estar envolvida em quatro das principais vias de desenvolvimento e progressão do melanoma. São elas: o gene supressor de tumor p16^{ink4a}; MAPK; AKT e a translocação de β -catenina da membrana plasmática para o núcleo.

O gene supressor de tumor p16^{INK4a} é perdido na maioria dos tumores (Arbiser, 2004). proibitina interfere no funcionamento de p16^{INK4a} por sua ação indireta de repressão de E2F por ser capaz de estabilizar RNF2, que inibe a expressão de p16^{INK4a} em células HEK293 (Choi *et al.* 2008). Isso impede que p16^{INK4a} possa inibir o complexo CDK4/6:ciclina D permitindo que as células entrem na fase G1 do ciclo celular (Kaye, 2002). Além disso, camundongos deficientes em uma única cópia do gene responsável pela transcrição de p16^{INK4a} desenvolvem melanócitos imortalizados muito rapidamente e acabam perdendo a outra cópia do gene de p16^{INK4a} (Fried and Arbiser, 2008).

A via citoplasmática de sinalização Ras-Raf-MAPK-Erk depende de proibitina (Rajalingam *et al.* 2005). Essa via é muito conservada e importante em várias funções celulares, como proliferação, morte celular, migração, diferenciação e ativação de linfócitos T e está mutada em um grande número de melanomas (Pollock and Meltzer, 2002). proibitina parece interferir levando à liberação de 14-3-3 por Raf, após a ativação deste por Ras (Rajalingam *et al.* 2005). A ativação da via MAPK está associada à

transformação de melanócitos, mas essa transformação é incapaz de gerar neoplasias agressivas (Govindarajan *et al.* 2003).

Ainda, o bloqueio da expressão de proibitina por siRNA pode realocar β -catenina para a membrana plasmática, diminuindo sua localização citoplasmática e nuclear, e intensificando sua colocalização com caderina na linhagem HeLa. Com isso, essa linhagem perde a capacidade migratória, sugerindo que proibitina é necessária para a motilidade celular induzida por EGF (Rajalingam *et al.* 2005).

A região 3' não traduzida do RNA mensageiro da proibitina (3'UTR) está associada à proliferação celular (Jupe *et al.* 1996). A microinjeção do RNA dessa região bloqueia a passagem do ciclo celular de G1 para a fase S (Manjeshwar *et al.* 2003). Essa região possui um polimorfismo, onde há uma troca de uma citosina por uma timina no nucleotídeo 729. A troca de C por T na região 3'UTR produz um alelo nulo onde há perda da capacidade antiproliferativa dessa região (Manjeshwar *et al.* 2003). Em câncer de mama, o polimorfismo C→T na região 3'UTR do RNA mensageiro de proibitina está associado ao aumento do risco de desenvolvimento do tumor em pacientes que possuem mutação em BRCA1 (Jakubowska *et al.* 2007). Dados obtidos por nosso laboratório mostram que há uma relação entre a incidência de melanoma e a mutação C→T na região 3'UTR do RNA mensageiro de proibitina. Ainda não se sabe qual o impacto desse polimorfismo na progressão da doença nos pacientes.

Ainda são necessários mais estudos para se saber a relação entre proibitina e mecanismos de estresse em melanomas e se esses

mecanismos levam à proteção ou não do tumor. É preciso também levar em consideração a relação entre proibitina e a via E2F1, já que essa associação, ao contrário da proteção mitocondrial causada por proibitina, bloquearia o desenvolvimento de diversos fenômenos importantes para a manutenção e progressão tumoral em melanomas

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar o envolvimento de proibitina nas respostas celulares de linhagens de melanoma humano a agentes indutores de estresse; e, estabelecer a sua relação como modulador de vias dependentes de E2F1, comparando a resposta de células de melanomas à de carcinomas.

Objetivos Específicos:

1. Avaliar a expressão de proibitina frente ao estresse celular gerado por quimioterápicos como cisplatina, vimblastina, dacarbazina e temozolamida;
2. Avaliar se a depleção de soro fetal bovino induz acúmulo de proibitina e se há correlação com aumento nos níveis de ROS intracelular;
3. Avaliar se o tratamento com o estressor de retículo endoplasmático tunicamicina induz proibitina e se a inibição de proibitina sensibiliza linhagens de melanoma ao tratamento com tunicamicina;
4. Verificar a localização subcelular de proibitina em linhagens de melanoma após tratamento com cisplatina e tunicamicina;
5. Verificar se há colocalização entre proibitina e proteínas do complexo MCM;
6. Avaliar se a inibição de proibitina induz expressão de metaloproteinases de matriz extracelular, vimentina e fibronectina;
7. Avaliar se proibitina responde ao tratamento com o indutor de transição epitélio mesênquima TGF β ;

8. Verificar se a presença de proibitina protege a célula contra tratamento com UVB e se há modificação na expressão de GADD45a;
9. Verificar se a presença de proibitina diminui a senescência induzida por adriamicina em linhagens de melanoma humano;
10. Verificar se fatores do microambiente tumoral modificam a expressão de proibitina em macrófagos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 *Cultivo de Células*

As seguintes linhagens celulares foram utilizadas: LB373, SKMel 02, SKMel 37, Mel 85, 624 e WM 164 (melanoma metastático humano); B16F10 (melanoma metastático murino); A549 (adenocarcinoma epitelial de pulmão humano); MDA-MB-231 (adenocarcinoma epitelial de mama humano). As linhagens de melanoma LB373, Mel 85, 624, WM 164, B16F10 e a linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 da Sigma-Aldrich®, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab®), 25 mM de HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfônico) e Bicarbonato de Sódio 24 mM. As linhagens de melanoma SKMel 02 e SKMel 37 foram cultivadas em meio de cultura MEM (Minimum Essential Medium) da Sigma-Aldrich®, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab®), 25 mM de HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfônico) e Bicarbonato de Sódio 24 mM. A linhagem de câncer de pulmão A549 foi cultivada em meio HAMF10, suplementado 10% de soro fetal bovino. As culturas celulares foram mantidas em estufa de 5% de CO₂. O descolamento das células para posterior contagem e subcultivo foi feito por curta exposição à tripsina-EDTA (Instituto Adolfo Lutz – São Paulo, Brasil).

3.2 Análise por Citometria de Fluxo

As células foram cultivadas de acordo com a necessidade do experimento. Após realizados os ensaios, as células foram fixadas em etanol 70%, mantidas congeladas até o momento da análise por citometria de fluxo (FACScalibur Becton Dickson®), por no máximo 20 dias a -20°C. O processo de morte ou ciclo celular foi avaliado pela incorporação de solução de iodeto de propídio (PI) (200µg/ml de RNase A, 20µg/ml de PI, 0,1% de Triton X-100 em PBS), que se incorpora estequiometricamente ao DNA, permitindo uma quantificação relativa do conteúdo de DNA de uma população de células. Células apresentando quantidade de DNA inferior a 2n (hipodiplóides =H₀) foram consideradas em morte celular. A análise dos dados foi feita pelo programa Cell Quest® da Becton Dickson®.

3.3 Extração de Proteínas

Aproximadamente 1x10⁷ células foram tripsinizadas, centrifugadas e ressuspendidas em tampão hipotônico (1mM HEPES; 1mM KCl; 0,1mM EDTA, pH 7,5,) no qual inibidores de protease foram adicionados (1mM DTT; 0,1 mM PMSF, 5µg/ml de aprotinina; 2.5mM pepstatina, 20µg/ml antipaína; e 1 mM leupeptina). As células foram homogeneizadas e colocadas a 4°C por 15 minutos. O homogenato foi centrifugado a 4°C por 15 minutos a 16000 g. O sobrenadante obtido desta centrifugação (extrato citoplasmático) foi

aliquotado. O precipitado originado foi ressuspenso com tampão de lise nuclear (HEPES 10mM, EDTA 5mM, KCl 150 mM, SDS 0,05%, Triton X-100 1%, NaF 20mM, Pirofosfato de Sódio 20mM e Molibdato de Sódio 20mM) no qual inibidores de protease foram adicionados (1mM DTT; 0,1 mM PMSF, 5 µg/ml de aprotinina; 2,5 mM pepstatina, 20 µg/ml antipaína; e 1 mM leupeptina) e colocado a 4°C por 15 minutos. Após os 15 minutos, o material foi centrifugado a 4°C por 15 minutos a 16000 g. O sobrenadante obtido (extrato nuclear) foi misturado ao extrato citoplasmático e conservado a – 20°C até o momento do uso.

3.4 Dosagem Proteica

A dosagem de proteínas foi realizada utilizando-se o kit Reagente BCA para Ensaio de Proteínas (Lowry modificado), da BioAgency®, de acordo com o manual do fabricante. Para leitura das amostras, foi utilizado um leitor de microplacas (Bio-RAD®, www.bio-rad.com) utilizando-se filtros de 592nm.

3.5 Gel de Poliacrilamida e Western Blot

Foram realizadas análises de proteínas separadas de acordo com sua massa molecular aparente (SDS-PAGE). As amostras de extratos proteicos foram separadas em gel de poliacrilamida, O gel de corrida contém Tris

0,375M pH 8,8, SDS 0,1%, acrilamida 10%, Persulfato de Amônio (APS) 0,03% em, N,N,N tetra metilenodiamina (TEMED, Sigma®); e o gel de empilhamento, Tris 0,125 M pH 6,8, SDS 0,1%, acrilamida 4%, APS 0,045%, e TEMED. Em seguida, os extratos proteicos foram separados transferidos para a membrana PVDF (Hydrophobic polyvinylidene difluoride, Amershan®) para a realização do *blotting*, sendo feita em tampão Tris 25 mM, metanol 20% por uma hora a 100 V e a 4°C.

A membrana teve seus sítios inespecíficos bloqueado com leite Molico 5% em PBS–Tween 0,5% e incubada com o anticorpo primário O.N. ou contra β -Actina por 1 hora e meia à temperatura ambiente. Posteriormente, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase por uma hora. A revelação da membrana foi feita utilizando-se o ECL™ Western *blotting* system da GE®. Como controle da reação, foi utilizado um padrão conhecido de peso molecular.

3.6 Microscopia Confocal

Cerca de $5,0 \cdot 10^4$ células foram plaqueadas em placa de 24 poços contendo lamínulas redondas de 13mm. As células foram fixadas em 4% de paraformaldeído em PBS. Em seguida, após serem lavadas 3x com PBS, foi adicionado Triton X-100/PBS 0.2% por 5 minutos. O Bloqueio de sítios inespecíficos foi feito com PBS/BSA 5% por 1 hora. Após isso, foi adicionado o anticorpo primário, diluídos em PBS/BSA 5% O.N. a 4°C. Depois de lavadas três vezes com PBS/BSA 1%%, foi adicionado o anticorpo

secundário conjugado com Alexa Flúor 488 (verde) ou 633 (vermelho), de coelho ou camundongo, da Invitrogen®. Após serem lavadas novamente com PBS/BSA 1%, foi adicionado o marcador de núcleo DAPI por 15 minutos, diluído em PBS/BSA 5%. Por último, foram montadas as lâminas. A análise foi realizada em microscópio confocal ZEISS LSM 510 Meta / UV.

A calibração do equipamento foi feita de modo a não haver excesso de intensidade de fluorescência captada pelo microscópio nos ensaios onde há tratamento com cisplatina, pois é onde se espera que haja maior intensidade de fluorescência em todas as marcações realizadas.

3.7 Depleção de soro fetal bovino

As células foram plaqueadas e cultivadas com 5% 1% ou 0% de soro fetal bovino (SFB) por 24. Como controle, cultivaram-se as células de maneira padrão, ou seja, com 10% de soro fetal bovino.

3.8 PCR em tempo real

Os seguintes primers (5'-3') foram usados nos ensaios de PCR em tempo real:

Primer	Forward	Reverse
E-Caderina	GACGCCGAGAGCTACACGTT	AGGCTGTCCTTTGTCGACCG
N-Caderina	TGAGGGCCTTAAAGCGGCTG	CAAGGACCCAGCAGTGGAGC
Proibitina	GTGTGGTTGGGGAATTCATGTGG	CAGGCCAAACTTGCCAATGGAC

ZBRK1	GTAACGTTGAGGCCCTTCTTGTG	TGGTGAACCCCAAATCCACTTCC
Gadd45a	GCTCAACGTGACCCCGATAAC	GCAAAACGCCTGGATCAGGGTG
GAPDH	GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA	GGTGCTGTAGCCAAATTCGTTGT
MMP9	TACGGTGCTTGACACAGTAAATC	CTGACTGCAGCTGCTGTTGTGG'
MMP15	GCTACTTTCCTTCACTGAACAGG	CGAGTGAAGTGCGACAGTGCGGCC

A partir de triplicatas amplificadas no termociclador BioRad MyiQ™, calculou-se a média dos resultados obtidos pelo equipamento. Calculou-se o dCT (diferença entre a média do resultado obtido e seu respectivo controle de carregamento) para depois calcular-se o ddCT (diferença do dCT na condição tratada e o dCT da condição controle). Para se determinar se houve variação na amplificação (*Fold Change*), utilizou-se o seguinte calculo: $FC=2^{\Delta\Delta CT}$ (Singh *et al.* 2013).

3.9 Ensaio de siRNA

Para ensaios de silenciamento de transcritos específicos, $6,0 \cdot 10^4$ células foram plaqueadas em placa de 60mm de diâmetro. Transfectaram-se 200 pmol de siRNA durante 6h em opti-mem na ausência de soro fetal bovino. O veículo utilizado foi a oligofectamina, da Invitrogen® (8µL por poço em volume total de 2 ml de meio apropriado). Após 6 horas, retirou-se o opti-mem e adicionou-se o meio de cultura normal de cada linhagem suplementado com 10% de soro fetal bovino. Aguardou-se 48h e depois foi

iniciado o ensaio planejado. Como controle, utilizou-se uma sequência *scramble*, sem correspondência em RNA humano.

Os siRNAs contra proitina utilizados foram:

Santa Cruz: sc-37629

IDT: 5' – CACAUUAUAUAAGGCAGAGUUTT – 3'

3' – TTGUGUAAUAUAUCCGUCUCAA – 5'

3.10 Ensaio de MTT

Após o plaqueamento das células em placa de 96 poços uma solução de 10mg/ml de MTT (1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan) foi adicionada ao meio de cultura (C.F. 1mg/ml). Incubou-se o MTT por 1h a 37°C. Após o período de incubação, removeu-se a solução de MTT e as células foram ressuspendidas em DMSO até que a solução ficasse homogênea. Utilizou-se um leitor de microplaca com filtro em 540nm para a leitura dos poços.

3.11 Tratamento com Drogas e Radiação UVB

Cerca de $3,0 \cdot 10^4$ foram plaqueadas em placa de 12 poços, ou proporcionalmente em outras placas, por volta de 24h antes do início do tratamento. Trataram-se as células com as seguintes substâncias de acordo com os experimentos feitos: 1µg/ml de tunicamicina (TUN) por 24h; com

25 μ M, 50 μ M ou 100 μ M de cisplatina (Cis) por 24h; com 10nM, 20nM ou 50nM de Vimblastina por 24h; 50 μ M, 100 μ M ou 200 μ M de Dacarbazina (DTIC) por 48h e 800 μ M de Temozolamida (TEM) por 48h. Utilizou-se a mesma quantidade de DMSO nos pontos controles de drogas ressuspendidas com essa substância.

Para o tratamento com UVB, utilizou-se uma fonte de luz emissora de UVB dentro do fluxo laminar. A fonte emissora foi testada com um sensor de UVB para se medir a eficiência do equipamento. A partir do resultado obtido pelo sensor (s), calculou-se a quantidade de energia necessária para o ensaio, em Joule (J), através da equação $J=s.t$, onde foi determinado o tempo de exposição das células (t) necessário para a exposição a UVB de energia necessária.

Após tratamento, as células foram fixadas em 70% de etanol ou em 4% de paraformaldeído, de acordo com o ensaio realizado.

3.12 Ensaio de Senescência

As células foram plaqueadas e tratadas com 2 μ M de Adriamicina (ADR) por 2 horas. Após o tratamento, aguardou-se por 72 horas e marcaram-se as células com solução de X-Gal (0.2 mL de tampão ácido cítrico (pH 6.0), 5mM de ferricianeto de sódio, 5mM de ferrocianeto de sódio, MgCl₂ 2 mM, NaCl 150 mM e X-Gal 1 mg/mL). As células foram incubadas em incubadora sem CO₂ até que se visse a marcação citoplasmática.

3.13 *Maturação de macrófagos*

Camundongos C57BL/6 foram sacrificados em câmara de CO₂ e tiveram o fêmur removido. Depois de limpo, injetou-se meio de cultura RPMI dentro do osso e plaqueou-se o conteúdo celular extraído em meio RPMI suplementado com 20% de soro fetal bovino.

Após 96h, adicionou-se mais meio de cultura RPMI suplementado com 20% de soro fetal bovino. Aguardou-se mais 72h para que o meio de cultura com as células sobrenadantes fosse aspirado. Soltaram-se os macrófagos, que estavam aderidos na placa, e após contagem, plaquearam-se novamente essas células.

Os macrófagos foram ativados na subpopulação M1 pelo tratamento com 50 ng/ml de IFN γ + 1 μ g/ml de LPS por 24h. Para a ativação na subpopulação M2, trataram-se os macrófagos com 50 ng/ml de IL4 por 24h.

3.14 *Anticorpos utilizados*

Os seguintes anticorpos foram utilizados:

Anti-proibitina (Thermo Scientific): MS-261-P0

Anti-proibitina (Santa Cruz): SC-37629

Anti-MCM2 (Santa Cruz): SC-10771

Anti-MCM5 (AbCam): ab75975

Anti-MCM7 (AbCam): ab52489

Anti- β -Actina (Sigma): A2228

Anti-Vimentina (Dako): m7020

Anti-GRP78 (Santa Cruz): SC-1051

3.15 Detecção de espécies reativas de oxigênio

O sensor de ROS CM-H2DCFDA, da Life Technologies®, foi utilizado como um indicador geral de espécies reativas de oxigênio. O indicador CM-H2DCFDA (5 μ M) foi adicionado nas células por 30 minutos em tampão hank's balanced salt solution (HBSS). Após o tempo de incubação, as células foram lavadas com tampão salina fosfato (PBS) e colocadas novamente na estufa a 37°C em seu meio de cultura normal por 30 minutos. As células, foram então tripsinizadas e utilizou-se o citômetro de fluxo FACScalibur da Becton Dickson® para se medir a fluorescência emitida pelo composto.

COMITÊ DE ÉTICA

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 15/04/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0110/09**, intitulado: **"AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE PROIBITINA NAS QUATRO PRINCIPAIS VIAS DE DESENVOLVIMENTO DE UM MELANOMA"** apresentado pelo Departamento de **RADIOLOGIA E RADIOTERAPIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Prof. Dr. Roger Chammas**

Pesquisador (a) Executante: **Tharcísio Citrângulo Tortelli Junior**

CAPPesq, 16 de Abril de 2009

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

4. RESULTADOS

4.1 O acúmulo de proibitina faz parte da resposta celular frente a diferentes agentes estressores

4.1.1 Tratamento com vimblastina

Vimblastina é alcaloide inibidor da formação de proteínas do fuso mitótico, capaz de parar a divisão celular na metáfase. Proibitina tem sua expressão aumentada após tratamento com vimblastina em três linhagens de melanoma.

Figura 1. Padrão de expressão proteica de proibitina (PHB) após tratamento com três concentrações de vimblastina na linhagem LB373. β -Actina usado como controle de carregamento. Controle (Ctl), cisplatina (CIS), R – relação PHB/ β -Actina.

A figura 1 mostra que proibitina teve sua expressão aumentada de maneira discreta na linhagem LB373 após tratamento com baixa concentração de vimblastina. Em concentrações maiores, sua expressão diminuiu.

Figura 2. Análise de população hipodiplóide, por citometria de fluxo, após tratamento com três concentrações de vimblastina na linhagem LB373.

A figura 2 mostra que a linhagem LB373 é sensível ao tratamento com vimblastina apenas nas concentrações de 20nM e 50nM e a indução de morte celular, avaliada através da medida da quantidade de células hipodiplóides, é menor que a indução de morte pelo tratamento com cisplatina. Não há diferença estatística significativa entre os tratamentos com 20nM e 50nM de vimblastina.

A linhagem Mel 85 teve um comportamento semelhante à linhagem LB373 após tratamento com vimblastina.

Figura 3. Padrão de expressão proteica de proibitina (PHB) após tratamento com três concentrações de vimblastina na linhagem Mel 85. β -Actina usado como controle de carregamento. Controle (Ctl), cisplatina (CIS), R – relação PHB/ β -Actina.

A linhagem Mel 85 também se mostrou pouco responsiva ao tratamento com vimblastina. Houve uma recuperação da expressão de proibitina após tratamento com 20nM de vimblastina, mas não se observou um aumento de expressão em relação ao controle.

Figura 4. Análise de população hipodiplóide, por citometria de fluxo, após tratamento com três concentrações de vinblastina na linhagem Mel85.

A linhagem Mel 85 parece ser mais sensível ao tratamento com vinblastina do que a linhagem LB373. Houve níveis de morte celular maiores que a linhagem LB373, principalmente após tratamento com 50nM de vinblastina, sendo que nessa condição houve uma indução de morte celular maior que a ocorrida pelo tratamento com cisplatina.

Diferentemente das linhagens LB373 e Mel 85, a linhagem SKMel 37 não mostrou uma indução da expressão de proibitina nas três concentrações de vinblastina testada. Nessa linhagem, o aumento de concentração de vinblastina levou a uma diminuição da expressão de proibitina e não houve indução de proibitina por cisplatina (Figura 5).

Figura 5. Padrão de expressão proteica de proibitina (PHB) após tratamento com três concentrações de vimblastina na linhagem SKMel 37. β -Actina usado como controle de carregamento. Controle (Ctl), cisplatina (CIS), R – relação PHB/ β -Actina.

A figura 6 mostra que a linhagem SKMel 37, diferentemente das linhagens Mel 85 e LB373, se mostrou muito sensível à todos os tratamentos testados. Houve cerca de 50% ou mais de células hipodiplóides após tratamento com cisplatina ou com as três concentrações de vimblastina.

Figura 6. Análise de população hipodiplóide, por citometria de fluxo, após tratamento com três concentrações de vimblastina na linhagem Mel85.

4.1.2 Privação de Soro Fetal Bovino

A linhagem SKMel 37 foi privada de soro fetal bovino por 24h para se verificar a relação com o acúmulo de proibitina.

Figura 7. (a) Acúmulo de proibitina (PHB) após cultivo da linhagem SKMel 37 com 1% de Soro Fetal Bovino (SFB) ou em sua ausência, durante 24h. β -Actina usado como controle de carregamento. R – relação PHB/ β -Actina. **(b)** Formação de ROS medida por citometria de fluxo na linhagem SKMel 37 ao se diminuir a quantidade de soro fetal bovino (SFB) por 24 horas. 10% SFB: condição normal de cultivo

A figura 7a mostra que proibitina é induzida pelo cultivo sem Soro Fetal Bovino na linhagem SKMel 37. O cultivo na concentração de 5% de SFB, metade da concentração controle, não foi suficiente para a indução de proibitina. Tratamento com cisplatina, na concentração de 25 μ M por 24h, foi usada como controle endógeno da expressão de proibitina. A figura 7b mostra que há acúmulo de ROS ao se cultivar a linhagem SKMel 37 em concentrações menores de soro fetal bovino, especialmente na ausência completa de SFB.

Verificou-se também se a falta de soro fetal bovino induz alguma modificação na forma mitocondrial dessa linhagem. Para tanto, utilizou-se ensaio de microscopia confocal com marcação das mitocôndrias, usando-se Mitotracker Red CMXRos (invitrogen).

Figura 8 Análise da forma de mitocôndrias da linhagem SKMel 37 após privação parcial ou total de Soro Fetal Bovino (SFB). Mitocôndria (vermelho) Núcleo (Azul).

A análise por microscopia confocal, representada pelas micrografias da figura 8, mostra que a linhagem SKMel 37 sofre modificação na

morfologia de suas mitocôndrias após cultivo sem soro fetal bovino (0% SFB) por 24h. Observa-se perda da forma filamentosa das mitocôndrias, como observado na situação controle para uma forma mais arredondada. Essas modificações coincidem com a maior expressão de proibitina, observada no western blot da figura 7.

Ainda, é possível observar que após tratamento com 5% de SFB por 24h, as modificações citadas ocorrem de maneira menos evidente, mas já há alguma condensação das mitocôndrias e uma perda da forma filamentosa, mas nessa condição, não se evidencia aumento de expressão de proibitina (figura 7).

Figura 9. (a) Acúmulo de proibitina (PHB) após cultivo da linhagem LB373 com 1% de Soro Fetal Bovino (SFB) ou em sua ausência, durante 24h. β -Actina usado como controle de carregamento. R – relação PHB/ β -Actina. **(b)** formação de ROS medida por citometria de fluxo na linhagem LB373 ao se diminuir a quantidade de soro fetal bovino (SFB) por 24 horas. 10% SFB: condição normal de cultivo

A linhagem LB373 também teve os níveis de proibitina aumentados após depleção de soro fetal bovino. A diminuição da quantidade de soro para 1% levou a um aumento de 36% na expressão de proibitina, e a

ausência total de soro levou a um aumento de 142% na expressão de proibitina, em relação à condição de cultivo controle, onde a linhagem é mantida com meio de cultura suplementado com 10% de soro fetal bovino (figura 9a). Há um aumento na produção de ROS ao se diminuir as quantidades de soro fetal bovino nessa linhagem. Observou-se um aumento significativo ao se cultivar a linhagem LB373 com 1% de SFB, que acabou sendo acentuado ao se cultivar a linhagem na ausência de soro fetal bovino (figura 9b). O aumento de ROS nessa linhagem coincide com um acúmulo de proibitina nessas condições.

4.1.3 Tratamento com dacarbazina, temozolamida e cisplatina

Outras drogas usadas no tratamento de melanomas como dacarbazina e temozolamida foram testadas em duas linhagens de melanoma metastático humano. Verificou-se que essas drogas também são capazes de induzir o acúmulo de proibitina.

Figura 10. Expressão de proibitina (PHB) após cultivo da linhagem WM 164 após tratamento com cisplatina (CIS), dacarbazina (DTIC) e temozolamida (TEM). β -Actina usado como controle de carregamento. Controle (Ctl), R – relação PHB/ β -Actina.

A figura 10 mostra que os tratamentos com cisplatina, dacarbazina e temozolamida induzem expressão de proibitina na linhagem WM 164, apesar de não haver uma grande indução nessa linhagem.

Figura 11. Acúmulo de proibitina (PHB) após cultivo da linhagem 624 após tratamento com cisplatina (CIS), dacarbazina (DTIC) e temozolamida (TEM). β -Actina usado como controle de carregamento. Controle (Ctl), R – relação PHB/ β -Actina.

A figura 11 mostra que, assim como a linhagem WM 164, a linhagem 624 também tem os níveis de expressão proteica aumentados pelo tratamento com cisplatina, dacarbazina e temozolamida. Esses resultados mostram que proibitina é responsiva a diversos tratamentos utilizados no combate ao melanoma.

Figura 12. Ensaio de viabilidade celular por MTT nas linhagens WM164 e 624 após 48h de tratamento com dacarbazina (DTIC), nas concentrações de 50 μ M, 100 μ M e 200 μ M.

Após 48 horas de tratamento com dacarbazina (DTIC), houve uma discreta diminuição da viabilidade celular nas linhagens WM 164 e 624. A linhagem WM 164 teve uma menor diminuição de viabilidade após tratamento com 50 μ M de DTIC, apesar dos demais tratamentos mostrarem um comportamento semelhante. A linhagem 624 se mostrou um pouco mais responsiva em termos de viabilidade em relação à linhagem WM 164 tendo

uma perda de viabilidade semelhante em todos os tratamentos com dacarbazina (figura 12).

Figura 13. Ensaio de viabilidade celular por MTT nas linhagens WM164 e 624 após 72h de tratamento com dacarbazina (DTIC), nas concentrações de 50 μ M, 100 μ M e 200 μ M.

A figura 13 mostra que após 72 horas de tratamento com dacarbazina não houve uma diminuição da perda de viabilidade nas duas linhagens estudadas.

Verificou-se também se o tratamento com cisplatina diminui a viabilidade celular dessas linhagens.

Figura 14. Ensaio de viabilidade celular por MTT nas linhagens WM164 e 624 após 24h de tratamento cisplatina (CIS), nas concentrações de 25µM, 50µM e 100µM.

Figura 15 Ensaio de viabilidade celular por MTT nas linhagens WM164 e 624 após 48h de tratamento cisplatina (CIS), nas concentrações de 25µM, 50µM e 100µM.

As figuras 14 e 15 mostram que a linhagem de melanoma humano 624 é sensível ao tratamento com cisplatina de uma maneira dose e tempo dependente. Após 48h de tratamento com uma dose de 100 μ M de cisplatina há uma redução de cerca de 50% na viabilidade celular dessa linhagem.

A linhagem WM 164, por outro lado se mostrou resistente ao tratamento com cisplatina em todos os tempos e concentrações utilizados.

4.1.4 Tratamento com tunicamicina e o estresse de retículo endoplasmático

Tunicamicina é um indutor de estresse de retículo endoplasmático por impedir que proteínas sejam corretamente enoveladas no interior da organela. A má conformação proteica no interior do retículo endoplasmático leva a uma resposta de estresse que pode, além de outros efeitos, levar a célula à morte. Como há uma relação entre retículo endoplasmático e mitocôndria, verificou-se a participação de proibitina nesse processo.

Figura 16. Acúmulo de proibitina (PHB) após cultivo da linhagem LB373 após 24 horas de tratamento com tunicamicina (TUN). β -Actina usado como controle de carregamento. Controle (Ctl), R – relação PHB/ β -Actina ou GRP78/ β -Actina. Expressão de GRP78 usada como controle positivo do tratamento com tunicamicina.

Figura 17. Expressão de proibitina (PHB) após cultivo da linhagem Mel 85 após 24 horas de tratamento com tunicamicina (TUN). β -Actina usado como controle de carregamento. Controle (Ctl), R – relação PHB/ β -Actina ou GRP78/ β -Actina. Expressão de GRP78 usada como controle positivo do tratamento com tunicamicina.

As figuras 16 e 17 mostram que as células (linhagens LB373 e Mel 85) respondem ao tratamento com tunicamicina acumulando proibitina. A linhagem LB373 (figura 16) tem um aumento mais evidenciado após tratamento com 2,5 μ g/ml de tunicamicina por 24 horas. A linhagem Mel 85 (figura 17) mostrou-se bem mais sensível do que a linhagem LB373, tendo a expressão de proibitina mais do que dobrada após tratamento com 1,0 μ g/ml de tunicamicina. Em ambos os casos, houve um aumento de expressão de GRP 78, mostrando que o tratamento com tunicamicina induziu estresse de retículo endoplasmático nessas linhagens.

Para se verificar se a indução de proibitina por tunicamicina protege a célula, realizou-se ensaio de siRNA contra proibitina, na linhagem LB373, nesse contexto. Para tanto, utilizou-se tratamento com 1,0µg/ml de tunicamicina devido à sensibilidade dessa linhagem.

Figura 18 Tratamento com 1,0µg/ml de tunicamicina (TUN) por 24 horas após *knock-down* de proibitina (PHB) na linhagem LB373. **(a)** Western Blot do *Knock-down* de proibitina. **(b)** Quantificação por citometria de fluxo da população hipodiplóide após tratamento com TUN, na presença de siRNA contra PHB (PHBsi) ou na presença do siRNA controle (CTLsi). β -Actina usado como controle de carregamento. Controle (Ctl), R – relação PHB/ β -Actina.

A figura 18 mostra que há uma sensibilização da linhagem LB373 ao tratamento com 1µg/ml por 24h de tunicamicina. A figura 18a mostra que o *knock-down* de proibitina funcionou na linhagem LB373 e houve um aumento de células hipodiplóides, medido por FACS (fig 18b), após *knock-down* de proibitina por siRNA. Não se observou aumento de hipodiploidia na ausência de tratamento.

Como proibitina funciona como uma chaperona mitocondrial verificou-se se alteração da compartimentalização subcelular de proibitina após tratamento com tunicamicina.

Figura 19 Localização subcelular de proibitina após tratamento com 1µg/ml de tunicamicina (TUN) por 24h na linhagem LB373. Proibitina (verde), Mitotracker RED como marcador de mitocôndria (vermelho) e Núcleo marcado com DAPI (azul). Sobreposição: junção das imagens proibitina e Mitocôndria

A figura 19 mostra que o tratamento com tunicamicina é capaz de induzir expressão de proibitina na linhagem LB373 e a sobreposição das imagens (cor alaranjada) mostra que sua localização continua mitocondrial.

4.2 Localização subcelular de proibitina

4.2.1 Localização de proibitina após tratamento com cisplatina

Como cisplatina pode induzir a expressão de proibitina resolvemos avaliar sua localização subcelular após tratamento com o quimioterápico. As linhagens de melanoma LB373, Mel 85 e SKMel 37 foram tratadas com 25 μ M de cisplatina por 24 horas.

Figura 20 Localização subcelular de proibitina após tratamento com 25 μ M de cisplatina (CIS) por 24h na linhagem LB373. Proibitina (verde), Mitotracker RED como marcador de mitocôndria (vermelho) e Núcleo marcado com DAPI (azul). Sobreposição: junção das imagens proibitina e Mitocôndria.

Figura 21 Localização subcelular de proibitina após tratamento com 25µM de cisplatina (CIS) por 24h na linhagem Mel 85. Proibitina (verde), Mitotracker RED como marcador de mitocôndria (vermelho) e Núcleo marcado com DAPI (azul). Sobreposição: junção das imagens proibitina e Mitocôndria.

As figuras 20 e 21 mostram que proibitina aparece no citoplasma e no núcleo nas linhagens LB373 e Mel 85, respectivamente; o tratamento com cisplatina é capaz de induzir a expressão de proibitina nessas duas linhagens. A sobreposição das imagens mostra que proibitina colocaliza-se com a mitocôndria (cor alaranjada) nas duas linhagens, mas há uma porção da proteína dispersa no citoplasma. Apesar de proibitina fazer parte de uma família de proteínas de membrana, devido ao seu domínio SPFH, não há evidência de localização de proibitina na membrana plasmática nessas linhagens.

Figura 22 Localização subcelular de proibitina após tratamento com 25 μ M de cisplatina (CIS) por 24h na linhagem SKMel 37. Proibitina (verde), Mitotracker RED como marcador de mitocôndria (vermelho) e Núcleo marcado com DAPI (azul). Sobreposição: junção das imagens proibitina e Mitocôndria.

A figura 22 mostra que a linhagem SKMel 37, diferentemente das linhagens LB373 e Mel 85, não apresenta colocalização entre proibitina e mitocôndria. Proibitina parece ter uma localização mais evidenciada no núcleo nessa linhagem em relação às outras duas. Também não há evidência de localização na membrana plasmática nessa linhagem.

4.2.2 Colocalização entre proibitina e proteínas da família MCM

Como proibitina colocaliza-se com proteínas da família MCM em linhagem de câncer de mama (Rizwani *et al.*2009) resolvemos verificar se essa relação existe em melanomas.

Figura 23 Colocalização entre proibitina e MCM2 após tratamento com 25µM de cisplatina (CIS) por 24h na linhagem LB373. Proibitina (verde), MCM2 (vermelho) e Núcleo marcado com DAPI (azul). Sobreposição: junção das imagens proibitina e MCM2.

Figura 24 Colocalização entre proibitina e MCM2 após tratamento com 25µM de cisplatina (CIS) por 24h na linhagem Mel 85. Proibitina (verde), MCM2 (vermelho) e Núcleo marcado com DAPI (azul). Sobreposição: junção das imagens proibitina e MCM2.

As figuras 23 e 24 mostram que, ao contrário do que foi mostrado em linhagem de câncer de mama, não há colocalização entre proibitina e MCM 2 nas linhagens LB373 e Mel 85 respectivamente. O aumento de expressão de proibitina pelo tratamento com cisplatina, mais evidente na linhagem LB373, não interfere na colocalização das duas proteínas.

Figura 25 Colocalização entre proibitina e MCM5 após tratamento com 25µM de cisplatina (CIS) por 24h na linhagem LB373. Proibitina (verde), MCM5 (vermelho) e Núcleo marcado com DAPI (azul). Sobreposição: junção das imagens proibitina e MCM5.

Figura 26 Colocalização entre proibitina e MCM5 após tratamento com 25µM de cisplatina (CIS) por 24h na linhagem Mel 85. Proibitina (verde), MCM5 (vermelho) e Núcleo marcado com DAPI (azul). Sobreposição: junção das imagens proibitina e MCM5.

MCM 5, nas linhagens LB373 (figura 25) e Mel 85 (figura 26), localiza-se no nucléolo, diferentemente do que foi observado em linhagem de câncer de mama, onde estava dispersa pelo núcleo, colocalizando-se com proibitina.

Figura 27 Colocalização entre proibitina e MCM7 após tratamento com 25µM de cisplatina (CIS) por 24h na linhagem LB373. Proibitina (verde), MCM7 (vermelho) e Núcleo marcado com DAPI (azul). Sobreposição: junção das imagens proibitina e MCM7.

Figura 28 Colocalização entre proibitina e MCM7 após tratamento com 25µM de cisplatina (CIS) por 24h na linhagem Mel 85. Proibitina (verde), MCM7 (vermelho) e Núcleo marcado com DAPI (azul). Sobreposição: junção das imagens proibitina e MCM7.

As figuras 27 e 28 mostram que proibitina colocaliza-se com MCM7 nas linhagens LB373 e Mel 85 respectivamente. A sobreposição das imagens, nessas duas linhagens, mostra que houve colocalização entre essas proteínas através da mudança de cor para alaranjado. Em linhagem de câncer de mama, essa colocalização não é observada.

Para se confirmar essa colocalização, realizou-se um ensaio de coimunoprecipitação entre proibitina e MCM7 na linhagem LB373.

Figura 29 Coimunoprecipitação entre proibitina e MCM7 na linhagem LB373 após tratamento com cisplatina. Ctl Neg: ausência de anticorpo contra MCM7

A figura 29 mostra que proibitina estava colocalizada fisicamente com MCM 7 na linhagem LB373. Proibitina foi revelada pelo western blot após imunoprecipitação de MCM 7 nessa linhagem, e o controle negativo do experimento não mostra expressão de proibitina. Há ainda um aumento dos níveis de coimunoprecipitação de proibitina após tratamento com cisplatina.

4.3 Proibitina como um modulador da função de E2F

4.3.1 Expressão de Matriz Metaloproteinases

A capacidade de proibitina controlar a função de E2F1 faz com que proibitina possa estar envolvida de alguma maneira em diversas funções celulares controladas por E2F1. Uma dessas funções é a expressão de matriz metaloproteinases.

Foram utilizadas 3 linhagens celulares diferentes, de tipos tumorais diferentes. As linhagens de melanoma metastático humano SKMel 02, de câncer de mama MDA-MB-231 e de câncer de pulmão A549 tiveram a expressão de proibitina inibida por siRNA e verificada a expressão de alguns tipos de matriz metaloproteinases.

Figura 30 Expressão de Matriz Metaloproteinases (MMP), por Real Time PCR, na linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 após *knock-down* de proibitina (PHB).

A figura 30 mostra que a linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 teve os níveis das metaloproteinases 2 e 9 aumentadas após inibição de proibitina por siRNA. Houve um aumento menor de expressão de MMP14 e MMP15 nessa linhagem.

Figura 31 Expressão de Matriz Metaloproteinases (MMP), por Real Time PCR, na linhagem de câncer de pulmão A549 após *knock-down* de proibitina (PHB).

A figura 31 mostra que a linhagem de câncer de pulmão A549, assim como a linhagem MDA-MB-231, teve os níveis de mRNA de MMP2 e MMP9 aumentados após inibição de proibitina.

Diferentemente da linhagem MDA-MB-231, houve uma diminuição dos níveis de expressão de MMP14 e MMP15 nessa linhagem, mostrando que pode haver diferentes mecanismos de regulação da expressão de MMPs em função da presença ou não de proibitina.

Figura 32 Expressão de Matriz Metaloproteinases (MMP), por Real Time PCR, na linhagem de melanoma humano SKMel 02 após *knock-down* de proibitina (PHB).

A figura 32 mostra que a expressão de todas as matriz metaloproteinases aumentaram após a inibição de proibitina na linhagem SKMel 02. Esse aumento não foi muito importante nas MMPs 2, 9 e 14, sendo mais evidenciado apenas na MMP15.

4.3.2 Expressão de Vimentina e Fibronectina

A expressão de Vimentina e Fibronectina também foram modificadas pela inibição de proibitina, ainda que de maneira linhagem-dependente.

Figura 33 Expressão de Fibronectina, por Real Time PCR, nas linhagens MDA-MB-231, A549 e SKMel 02 após *knock-down* de proibitina (PHB).

A figura 33 mostra que a expressão de Fibronectina é mais afetada pela inibição de proibitina na linhagem de câncer de mama MDA-MB-231, onde seu nível de expressão mais do que dobrou. A linhagem A549 se mostrou insensível, em relação à expressão de Fibronectina, à inibição de proibitina e a linhagem SKMel 02 teve um discreto aumento, de cerca de 40%.

Figura 34 Expressão de Vimentina, por Real Time PCR, nas linhagens MDA-MB-231, A549 e SKMel 02 após *knock-down* de proibitina (PHB).

Figura 35 Expressão de Vimentina, por Western Blot, na linhagem A549 após *knock-down* de proibitina (PHB). PHBsi: siRNA contra proibitina, R: relação proteína/ β -actina

Figura 36 Expressão de Vimentina, por Microscopia Confocal, na linhagem A549 após *knock-down* de proibitina (PHB). Vimentina (verde), Núcleo (Azul).

A figura 34 mostra que não há variação nos níveis de RNA de vimentina nas linhagens MDA-MB-231 e SKMel 02 após inibição de

proibitina. A linhagem A549 obteve um discreto aumento nos níveis de RNA nessa condição.

Apesar disso, há um claro aumento, em termos de proteína, na expressão de vimentina após inibição de proibitina por siRNA na linhagem A549 (fig 35). O western blot mostra que o *knockout* de proibitina levou a um aumento de 88% na expressão de vimentina nessa linhagem. Esse aumento foi confirmado por microscopia confocal na figura 36, onde há um claro aumento na marcação de vimentina (em verde), após inibição de proibitina.

4.3.3 Sensibilidade a TGF β

Como parece haver uma relação entre a expressão de proibitina e a expressão de marcadores relacionados com transição epitélio mesênquima, resolvemos avaliar se há modificação da expressão de proibitina após tratamento com TGF β , que é um indutor desse fenômeno.

Figura 37 Acúmulo de proibitina, por Western Blot, na linhagem A549, após tratamento com doses crescentes de TGF β por 48h. Controle (Ctl), R: relação proibitina/ β -actina

A figura 37 mostra que ao contrário do esperado, houve um aumento na expressão de proibitina de maneira dose dependente, após tratamento com TGF β , na linhagem A549.

Como cisplatina induz expressão de proibitina resolvemos verificar se há relação entre a combinação do tratamento com cisplatina e o tratamento com TGF β . Para isso, utilizamos a linhagem de melanoma murinho B16F10.

Figura 38 Expressão de proibitina, por Western Blot, na linhagem B16F10, após tratamento com 15 μ g/ml de TGF β . R: relação proibitina/ β -actina.

A figura 38 mostra que a linhagem de B16F10 teve um comportamento diferente da linhagem A549 (fig.37) em relação ao tratamento com TGF β . Nessa linhagem, o tratamento com TGF β diminuiu a expressão de proibitina.

4.3.4 Proteção contra Radiação UVB

A linhagem de câncer de pulmão A549 foi tratada com duas doses de radiação ultra-violeta B (UVB) para se verificar se a ausência de proibitina interfere nos níveis de morte celular após tratamento.

Figura 39 Sensibilidade da linhagem de câncer de pulmão A549 ao tratamento com doses de 100J e 200J de UVB e cisplatina, após inibição de proibitina por siRNA

A figura 39 mostra que a inibição de proibitina leva a uma diminuição nos níveis de hipodiploidia na linhagem A549 após tratamento com 200J de UVB. Apesar dessa diminuição ser discreta, ela está de acordo com a ideia indução de reparo de DNA por E2F.

Como E2F repara DNA via aumento de expressão de Gadd45a, verificou-se se a inibição de proibitina na linhagem A549 leva a um aumento de expressão de Gadd45a.

Figura 40 Indução da expressão de Gadd45a, por Real Time PCR após inibição de proibitina na linhagem de câncer de pulmão A549.

A figura 40 mostra que a inibição de proibitina na linhagem A549 provocou o aumento dos níveis de RNAm de Gadd45a nessa linhagem. Esse resultado é condizente à proteção contra radiação UVB induzida pela inibição de proibitina nessa linhagem, como observado na fig. 39.

Como E2F controla a expressão de Gadd45a via seu repressor ZBRK1 decidimos verificar se a inibição de proibitina modifica os níveis de expressão de ZBRK1.

Figura 41 Indução da expressão de ZBRK1, por Real Time PCR após inibição de proibitina na linhagem de câncer de pulmão A549.

A figura 41 mostra que os níveis do RNAm de ZBRK1, diferentemente do esperado, aumentam após inibição de proibitina na linhagem A549. Apesar desse aumento, ainda assim é possível observar aumento dos níveis de Gadd45a (fig. 40) e proteção dessa linhagem após tratamento com uma dose de 200J de UVB (fig. 39).

Figura 42 Indução da expressão de ZBRK1 e Gadd45a, por Real Time PCR após inibição de proibitina na linhagem de melanoma SKMel 02.

A figura 42 mostra que a linhagem SKMel 02 tem um comportamento semelhante à linhagem A549, em relação à expressão de ZBRK1 e Gadd45a. A inibição de proibitina leva a um aumento da expressão do RNAm de Gadd45a e, da mesma forma que na linhagem A549, a um aumento de seu repressor, ZBRK1.

4.3.5 Relação entre proibitina e a indução de senescência.

Outra função controlada por E2F é a capacidade de permitir que a célula saia de um estado de senescência. Após tratamento com adriamicina, aguardou-se 72h e verificou-se por microscopia a indução de senescência após inibição de proibitina.

Figura 43 Indução de senescência por adriamicina na linhagem 624, após inibição de proibitina. Adriamicina (ADR) e X-gal usado como revelador.

Figura 44 Indução de senescência por adriamicina na linhagem WM 164, após inibição de proibitina. Adriamicina (ADR) e X-gal usado como revelador.

As figuras 43 e 44 mostram que após inibição de proibitina as linhagens de melanoma humano 624 e WM 164, respectivamente, tem a porcentagem de células senescentes diminuída. Não se observou variação nos níveis de senescência, nas duas linhagens, com a transfecção dos RNA de interferência controle.

4.4 Expressão de proibitina no contexto do microambiente tumoral

Como há uma possível relação entre a expressão de proibitina e a expressão de marcadores de transição epitélio mesênquima, além da resposta ao tratamento com TGF β , resolvemos verificar se há variação da expressão de proibitina em outras células do microambiente tumoral.

Resolvemos verificar se a expressão de proibitina varia na maturação de macrófagos em M1 (pela ação de IFN γ e LPS) ou M2 (pela ação de IL4).

Figura 45. Acúmulo de proibitina após maturação de macrófagos em M1, pelo tratamento com LPS + IFN γ e M2, pelo tratamento com IL4. R: relação proibitina/ β -actina.

A figura 45 mostra que a expressão de proibitina diminuiu com a maturação de macrófagos em M1 (tratamento com LPS + IFN γ), M2 (tratamento com IL4) ou após tratamento com TGF β .

5. DISCUSSÃO

Proibitina faz parte de uma família de proteínas que possuem um domínio hidrofóbico SPFH em sua porção amino terminal o que confere um domínio transmembrânico a essa proteína (Langhorst *et al.* 2005). Esse domínio é altamente conservado desde organismos procariotos até eucariotos. A maioria dos membros dessa família está implicada em organização de domínios de membrana, levando à organização de plataformas supramoleculares envolvidas em transdução de sinais.

Não se sabe como se dá o trânsito intracelular de proibitina. Em determinadas condições, pode haver um trânsito do núcleo para a mitocôndria ou vice-versa. Em células pigmentares de retina humana, há uma clara translocação de proibitina para o núcleo e diminuição de sua expressão em condição de estresse oxidativo, o que não é visto em melanomas (fig. 20, 21 e 22). Acredita-se que nessas condições, a translocação de proibitina para o núcleo pode estar associado a algum mecanismo de fosforilação, pois foi encontrado proibitina fosforilada no núcleo, em sua porção solúvel (Sripathi *et al.* 2011). Como proibitina pode ser fosforilada por AKT (Han *et al.* 2008), esse mecanismo poderia levar a uma translocação de proibitina para o núcleo. O tratamento com H₂O₂ pode levar a uma rápida e transitória fosforilação de AKT, seguido por uma perda de fosforilação em células HeLa (Shim *et al.* 2007). Talvez essa rápida

ativação de AKT seja suficiente para que proibitina consiga sair da mitocôndria e ser transportada para o núcleo.

Em melanomas, AKT está constitutivamente ativado e, além disso, melanomas habitualmente deixam de expressar PTEN, um inibidor de PIP3, responsável pela ativação de AKT. Essa característica do melanoma faria com que não houvesse a rápida perda de fosforilação de AKT permitindo a fosforilação sustentada de proibitina e sua subsequente translocação para o núcleo.

Proibitina parece estar envolvida na resposta celular a diversos mecanismos de estresse celular. Nas linhagens observadas, proibitina acumula-se no tratamento com vimblastina, na linhagem LB373 (fig. 1), pelo cultivo em ausência de soro fetal bovino na linhagem SKMel 37 (fig. 7), e LB373 (fig. 9), por dacarbazina (DTIC), cisplatina (CIS) e temozolamida (TEM), nas linhagens WM164 e 624 (fig.10 e 11), e por tunicamicina nas linhagens LB373 e Mel 85 (fig. 16 e 17).

Todos esses mecanismos que levam à indução de proibitina, de alguma forma passam pelo acúmulo intracelular de ROS. A principal fonte de ROS na célula é a mitocôndria e sua geração ocorre principalmente no complexo 1 e 3 da cadeia respiratória (Inoue *et al*, 2003). O acúmulo de ROS na mitocôndria pode levar à lesão nas membranas, proteínas e DNA mitocondrial, bloqueando a capacidade da mitocôndria sintetizar ATP, e pode também aumentar a permeabilidade da membrana externa mitocondrial (Maryanovich e Gross, 2013). Além disso, o DNA mitocondrial é

mais sensível a ROS do que o DNA genômico (Croteau e Bohr, 1997) o que leva ao acúmulo de mutações e conseqüentemente a modificações em proteínas mitocondriais que culmina na perda da homeostase mitocondrial. Devido à capacidade de chaperona da proibitina, seu acúmulo na mitocôndria é importante para estabilização de proteínas mal enoveladas, o que permitiria o funcionamento correto da mitocôndria (Nijtmans *et al.* 2000). Diversos modelos mostram a importância da relação aumento de proibitina com proteção contra ROS. Essa associação já foi mostrada em fibrose intersticial em ratos (Zhou *et al.* 2012), em células epiteliais humanas (Kathiria *et al.* 2012) e em adipogênese (Liu *et al.* 2012), entre outros modelos.

Em condições de estresse oxidativo, proibitina associa-se com cardiolipina, o principal fosfolípide da membrana mitocondrial (Sripathi *et al.* 2011). Esta associação dificultaria o tráfego de proteínas devido à estabilidade da cardiolipina na membrana mitocondrial. Se esta associação de proibitina com cardiolipina em condição de estresse oxidativo ocorrer em melanomas, o que é bem provável, a estabilidade de proibitina na membrana mitocondrial permitiria proibitina funcionar como um fator importante de sobrevivência, pois ela estaria impedida de ser translocada para o núcleo, mantendo a homeostasia mitocondrial. Logo, como em melanomas há produção de proibitina em condição de estresse oxidativo, como pela ação da cisplatina (fig. 20, 21 e 22), o excesso de proibitina produzida ficaria aprisionado na mitocôndria pela cardiolipina, protegendo a célula.

Ainda, essa associação cardiolipina-proibitina poderia evitar que o excesso de proibitina inibisse a ativação de vias controladas por E2F. Mesmo assim, é possível observar-se proibitina localizada no núcleo, mostrando que de certa forma há um balanço no fracionamento subcelular de proibitina. Talvez o balanço proibitina-cardiolipina / proibitina-AKT, um mantendo a proibitina na mitocôndria e o outro translocando-a para o núcleo da célula determine o destino final da célula em condição de estresse oxidativo. A perda de proibitina da mitocôndria para o núcleo levaria a sua desproteção juntamente com o bloqueio de vias importantes de sobrevivência controlados por E2F.

5.1 Tratamento com vimblastina

Vimblastina é um alcaloide da vinca capaz de desorganizar a formação de microtúbulos, bloqueando a divisão celular. Em altas concentrações, vimblastina pode diminuir a massa total de microtúbulos intracelular, mas em baixa concentração, pode bloquear sua dinâmica e levar a célula a apoptose sem diminuir a massa de microtúbulos celular. Os derivados de alcaloides da vinca são usados no tratamento de diversos tipos de tumores, como leucemias, linfomas e câncer de pulmão (Jordan e Wilson, 2004).

Em células HeLa o limiar de alta concentração se dá a partir de 10nM de vimblastina. Nessa concentração há a despolarização de microtúbulos e a destruição do fuso mitótico. Entretanto, nessa concentração, as células tumorais ficam bloqueadas em mitose com a cromatina condensada. Em concentrações menores, cerca de 0,8nM, não há despolarização de microtúbulos, mas há um bloqueio da mitose, levando a um processo apoptótico (Jordan *et al.*1991).

Vimblastina parece ter algum efeito na expressão de proibitina na concentração de 10nM na linhagem LB373, onde há um aumento em sua expressão (fig. 1). Em concentrações maiores, há uma perda de expressão de proibitina, provavelmente por um processo citotóxico causado pela droga. Existe uma relação de concordância entre o aumento de expressão de proibitina e uma incapacidade de indução de morte celular nessa concentração na linhagem LB373 (fig. 2). Observou-se um aumento dos níveis de morte celular em doses mais altas, 20nM e 50nM, justamente onde há perda de expressão de proibitina.

Apesar de haver uma coincidência do ponto onde há aumento de expressão de proibitina e um bloqueio da morte celular induzida por vimblastina e do ponto onde há perda da expressão de proibitina e um aumento nos níveis de morte celular, não é possível afirmar-se uma relação de causa e consequência entre os fenômenos observados, mas é possível sugerir que há um mecanismo de proteção por proibitina contra o tratamento com baixa dose de vimblastina na linhagem LB373.

Mesmo que haja esse mecanismo, ele parece ser específico da linhagem LB373, pois nas linhagens Mel85 e SKMel 37, não se observou um aumento nos níveis de expressão de proibirina após tratamento com vimblastina (fig. 3 e 5), mas observou-se um fenômeno parecido em relação à morte celular, pois não se observou aumento nos níveis de hipodiploidia após tratamento com 10nM de vimblastina nas duas linhagens e, ao se tratar com doses maiores de vimblastina, pôde-se observar uma indução nos níveis de morte celular. (fig. 4 e 6).

Outros alcalóides da vinca, como vinorelbina, levam a um acúmulo de ROS, pela diminuição de glutathionas (GSH), em células de câncer de pulmão. O bloqueio da produção de ROS nessas linhagens diminui a morte celular induzida por vimblastina (Chiu *et al*, 2012). Nesse contexto, o acúmulo de proibirina poderia funcionar como um fator de proteção a um suposto acúmulo de ROS induzido por vimblastina. Isso protegeria a célula contra morte celular. O acúmulo de proibirina na linhagem de melanoma LB373 pode não ser um fator induzido diretamente por vimblastina, mas sim uma via alternativa de proteção ativada em um tipo de tumor, o melanoma, que é bem adaptado à sobrevivência frente ao acúmulo de ROS.

5.2 Tratamento com dacarbazina e temozolamida

Dacarbazina e temozolamida são agentes alquilantes capazes de lesar o DNA levando células em divisão a um processo de morte celular. Sua ação ocorre através de uma metilação no DNA o que leva a uma parada de ciclo celular e apoptose. Outras moléculas também são alvos de agentes alquilantes, como RNA, proteínas e DNA mitocondrial, levando a diversos tipos de resposta celular.

Dacarbazina e temozolamida necessitam ser metabolizados no organismo para que seus princípios ativos possam atuar como agente alquilante no DNA. Suas estruturas primárias são convertidas em MTIC, que é o princípio ativo dessas drogas. Dacarbazina é convertida em MTIC no fígado pelo citocromo p450 (Reid *et al.* 1999) enquanto que a temozolamida pode ser convertida em MTIC em todos os tecidos (NCI: <http://www.cancer.gov/drugdictionary?CdrID=41671>).

Dacarbazina foi a primeira droga aprovada pelo FDA para o tratamento do melanoma. Sua taxa de resposta, quando utilizada como monoterapia, é de cerca de 20% sendo a duração média da resposta de cerca de seis meses. Menos de 2% dos pacientes sobrevivem após seis anos do início do tratamento (Mouawad *et al.* 2010).

Temozolamida tem uma penetração maior em tumores do sistema nervoso central. Em relação à dacarbazina, em melanomas, temozolamida

tem um comportamento semelhante em termos de resposta objetiva e sobrevivência global, mas há um aumento significativo da progressão livre de doença, ainda que pequeno, de 1.5 mês para 1.9 mês, além de levar a uma melhora na qualidade de vida em relação à dacarbazina (Mouawad *et al.* 2010).

As figuras 10 e 11 mostram que após tratamento com dacarbazina e temozolamida, as linhagens WM164 e 624 têm os níveis de proíbitina aumentados. Melanomas podem expressar membros da família citocromo p450, como CYP24 (Reichrath *et al.* 2007), o que sugere a possibilidade de dacarbazina ser metabolizado *in vitro* em MTIC.

Ainda, o tratamento com dacarbazina leva a uma pequena perda de viabilidade, mais evidente na linhagem de melanoma 624 após 48 horas de tratamento (fig. 12), apesar de haver uma aparente recuperação na viabilidade celular das duas linhagens após 72 horas de tratamento (fig.13). Isso mostra, que em linhas gerais, o tratamento com dacarbazina, e provavelmente com seu análogo temozolamida, tende a falhar em melanomas, fato já bem reportado e de conhecimento no meio acadêmico e clínico.

Recentemente foi mostrado em uma linhagem de glioma resistente ao tratamento com temozolamida que a resistência ao tratamento está relacionada à diminuição na produção de ROS mitocondrial (Oliva *et al.* 2011). Alguns marcadores de dano por estresse oxidativo, como a peroxidação de lipídios estão diminuídos nas linhagens resistentes ao

tratamento com temozolamida. Além disso, o tratamento conjunto, das células resistentes, com temozolamida e BSO, um inibidor da síntese de glutathionas elevam os índices de apoptose nessa linhagem (Oliva *et al.* 2011). Mais uma vez, o aumento de expressão de proibirina induzido por temozolamida ou dacarbazina pode funcionar para manter os níveis de ROS em um nível tolerável para as linhagens WM164 e 624, contribuindo para a sobrevivência dessas linhagens.

5.3 Privação de Soro fetal bovino

A privação de soro fetal bovino elevou os níveis de proibirina nas linhagens SKMel 37 e LB373 (fig. 7a e 9a). Houve um grande aumento na expressão de proibirina na linhagem LB373, que parece ocorrer de maneira inversamente proporcional à quantidade de soro fetal bovino presente no meio de cultura.

O aumento de expressão de proibirina após a privação de soro fetal bovino pode ocorrer devido a uma baixa na síntese proteica nessa condição, sendo assim, o que se observa é na verdade um aumento relativo de proibirina.

Outras evidências mostram que em condição de privação de soro, há um aumento de ROS mitocondrial. Células HeLa tem os níveis de ROS aumentados após privação de soro fetal bovino. Para se confirmar a origem

mitocondrial da produção de ROS, a linhagem HeLa foi tratada com brometo de etídio, levando a uma deficiência na cadeia respiratória das mitocôndrias dessa linhagem, diminuindo a produção de ROS em condição de privação de soro. Além disso, a deficiência na produção de ROS leva a uma diminuição da autofagia nessas linhagens (Lin *et al.* 2013).

Nas duas linhagens analisadas, houve aumento de ROS, medido por CM-H2DCFDA, de maneira inversamente proporcional à presença de soro fetal bovino (fig. 7b e 9b) Esse aumento é acompanhado pelo acúmulo de proibitina. A linhagem SKMel 37 teve os níveis de ROS mais aumentados em relação à linhagem LB373. Isso pode ter ocorrido pela ausência mitocondrial de proibitina nessa linhagem (fig. 22)

Proibitina, nessas linhagens, serviria como uma proteção mitocondrial dos danos causados pelo aumento de ROS induzido pela privação de soro fetal bovino. Nesse contexto, além de proteger a mitocôndria da produção de ROS, o aumento de expressão de proibitina diminuiria também a indução de autofagia nessa linhagem, já que o aumento da expressão de proibitina leva a uma diminuição da autofagia (Kathiria *et al.* 2012).

A diminuição de autofagia poderia ser interessante para tumores em desenvolvimento. Como há regiões intratumorais onde a perfusão de oxigênio e nutrientes é menor, simulando um ambiente de privação, o excesso de ROS produzido nessas regiões poderia levar a mutações no DNA, o que geraria uma maior diversidade entre as células de um tumor. Em algum momento do desenvolvimento tumoral deve haver uma compensação

na produção de ROS nessas regiões de baixa de nutrientes, pois o excesso de ROS poderia levar a uma lesão importante no DNA. Essa compensação deve envolver mecanismos de proteção ou reparo de DNA pois proibirina tende a se acumular durante a progressão do melanoma (Raphael Salles, dados não publicados).

A privação de soro na linhagem SKMel 37 parece modificar a morfologia mitocondrial dessa linhagem (fig. 8). Na situação controle, as mitocôndrias possuem uma forma filamentosa, parecendo formar uma espécie de conduíte. Ao se cultivar a linhagem com 5% de soro fetal bovino, há uma clara diminuição na dispersão mitocondrial dessa linhagem sugerindo que há uma diminuição do conteúdo citoplasmático. Além disso, é possível observar alguns conjuntos de mitocôndrias em forma arredondada, diferentemente da forma alongada na situação controle.

Após cultivo da linhagem SKMel 37 na ausência de soro fetal bovino, as mitocôndrias parecem agrupar-se próximas do núcleo celular e é possível observar ainda mais mitocôndrias formando conjuntos arredondados, situação parecida ao se tratar essa linhagem com cisplatina.

A conformação mitocondrial pode evidenciar uma perda de função dessa organela. A forma mitocondrial está relacionada com a proteção contra a autofagia. Mitocôndrias alongadas ou tubuladas tem uma proteção maior contra a autofagia e suas mitocôndrias mais arredondadas, sendo descrita na literatura como fragmentada, são mais passíveis de sofrer

autofagia. Ainda, a forma tubular das mitocôndrias, induzida por privação de soro, depende de OPA-1 (Rambold *et al* 2011).

Como o complexo PHB-PHB2 influencia na formação das cristas mitocondriais, sendo PHB2 importante na manutenção de isoformas longas de OPA-1, o aumento de expressão de levaria a proteção contra autofagia através da manutenção de OPA-1. Em condições extremas, como no cultivo da linhagem SKMel 37 na ausência de soro fetal bovino, o aumento da expressão de proibitina poderia funcionar como um mecanismo de proteção das mitocôndrias dessa linhagem.

5.4 Tratamento com tunicamicina e a indução de estresse de retículo endoplasmático

A indução da expressão de proibitina faz parte da resposta de estresse de retículo endoplasmático, ou *Unfolded Protein Response* (UPR). Esse mecanismo envolve uma série de respostas adaptativas e citoprotetoras que podem culminar em indução de apoptose caso não haja solução para a lesão no retículo endoplasmático

Em linhas gerais, quando há o acúmulo de proteínas mal enoveladas no interior do retículo endoplasmático, ocorre uma agregação dessas proteínas alterando o funcionamento normal do retículo endoplasmático.

Num primeiro passo, a ativação de UPR leva à proteção do retículo endoplasmático, que acaba levando à proteção de outras organelas. Células com estresse prolongado acabam sendo direcionados para um processo de eliminação, através de apoptose (Ma e Hendershot, 2004).

Molecularmente, quando há acúmulo de proteínas mal enoveladas, a proteína GRP78 (ou Bip) que está no interior do retículo se dissocia dos receptores de membranas IRE1, PERK e ATF6. Com isso, esses receptores formam um dímero, permitindo a transdução de seus respectivos sinais (Bartolotti *et al.* 2000) (Shen *et al.* 2002). A superexpressão de GRP78, além de ser um marcador da ativação da resposta por UPR, parece ser um evento importante para a progressão tumoral (Jamora *et al.* 1996). GRP78, em modelo de câncer de mama é importante para a proliferação da célula tumoral, protege contra apoptose e promove angiogênese tumoral (Dong *et al.* 2008).

A ativação de PERK está relacionada com a sobrevivência celular em condições de hipóxia. O *knock-down* de PERK promove uma diminuição no crescimento tumoral, havendo uma maior quantidade de células apoptótica em regiões de hipóxia (Bi *et al.* 2005). PERK induz também um bloqueio temporário na síntese proteica através do bloqueio da tradução de RNAs mensageiros pela fosforilação de eIF-2 α (Harding *et al.* 1999). Paradoxalmente, o bloqueio da síntese proteica por PERK leva à ativação de ATF4, que por sua vez ativa o processo autofágico (Milani *et al.* 2009). PERK também é necessário para a ativação de NF- κ B, que por sua vez leva a ativação de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2. Ainda, PERK pode

levar a uma parada na fase G1 do ciclo celular pela inibição de ciclina D1 (Brewer e Diehl, 2000).

IRE1 também está relacionado com sobrevivência em condições de hipóxia, pois seu *knock-down* aumenta os níveis de apoptose e diminui a capacidade dessas células gerarem clones (Romero *et al.* 2004), além de ativar Hac1, que induz o aumento de expressão de proteínas da resposta por UPR (Cox e Walter, 1996).

ATF6 leva a transcrição de Gadd153 (CHOP), que por sua vez diminui os níveis de expressão de membros anti-apoptóticos da família BCL2, além de aumentar os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), levando a um processo apoptótico (McCullough *et al.* 2001).

As figuras 16 e 17 mostram que há indução na expressão de proibirina após tratamento com tunicamicina, nas linhagens LB373 e Mel 85, respectivamente. A indução da expressão de proibirina é maior na linhagem Mel 85. Em ambas as linhagens há grande acúmulo de GRP78, indicando que há indução de estresse de retículo endoplasmático.

Como o início da resposta por UPR depende de um mau enovelamento de proteínas dentro do retículo endoplasmático, verificou-se se há translocação de proibirina para o retículo endoplasmático, pois proibirina poderia ajudar na conformação terciária de proteínas devido à sua ação como chaperona. A figura 19 mostra que na linhagem LB373, há aumento de expressão de proibirina após tratamento com tunicamicina, através de microscopia confocal, mas que ainda há grande quantidade de proibirina associada à mitocôndria ou dispersa pelo núcleo e citoplasma,

sugerindo que o aumento de expressão de proibirina deve estar relacionado com a proteção mitocondrial.

A expressão aumentada de proibirina poderia estar relacionada com o bloqueio de síntese proteica por PERK, já que o ensaio de Western Blot das figuras 16 e 17 mostram que há um aumento relativo de proibirina. Como há diminuição global de proteínas, a relação PHB/Proteínas Total poderia indicar um falso aumento em sua expressão, devido a uma possível vida média maior de proibirina. A microscopia confocal da figura 19 mostra que, pelo menos na linhagem LB373, há um aumento real na expressão de proibirina, já que nesse ensaio, é observada a marcação direta da proteína.

Esse aumento de expressão de proibirina parece ter uma função protetora na linhagem LB373. A inibição de proibirina por siRNA mostrou que há uma sensibilização dessa linhagem frente ao tratamento com tunicamicina (fig. 18). Houve um aumento de morte celular nessa linhagem em torno de 10%. Esse nível indica que proibirina é parte da resposta de UPR, mas que seu efeito protetor parece não ser algo de extrema importância. Talvez a inibição de proibirina possa funcionar como um agente sensibilizador em combinações de tratamentos onde há indução de UPR, seja por tunicamicina ou por outras drogas que levam a um quadro de estresse de retículo endoplasmático, como Bortezomib, juntamente com uma droga que leve a um aumento de ROS intracelular, como a cisplatina, já que uma parte da resposta de UPR é a indução de espécies reativas de oxigênio por Gadd153 (CHOP) (McCullough *et al.* 2001). Dessa forma, um possível ramo de proteção da ativação de UPR via ROS estaria bloqueado, assim

como haveria um acúmulo maior de ROS intracelular através de sua indução independente de UPR. A produção de ROS pela resposta de UPR através de Gadd153 poderia ser o principal indutor da expressão de proibirina nesse sistema.

Outra consequência da indução de proibirina em resposta ao estresse de retículo endoplasmático seria a colaboração no bloqueio de ciclo celular por PERK. A resposta por UPR leva à ativação de PERK que por sua vez bloquearia o ciclo celular. A indução de proibirina levaria, então, ao bloqueio de E2F1, o que contribuiria na parada de ciclo celular. Ao contrário do esperado, não se observou esse efeito na linhagem LB373 (fig. Suplementar 2). Talvez a relação proibirina-E2F1 nessa linhagem não seja tão importante quanto à localização mitocondrial de PHB.

In vivo, a relação entre hipóxia e estresse de retículo endoplasmático pode ocorrer através da ativação de PERK, apesar dessa ativação não depender de HIF-1 α (Koumenis *et al.* 2002). Isso leva a dois possíveis mecanismos de sobrevivência através do aumento de expressão de proibirina já que PHB pode ter seus níveis de expressão aumentados através do eixo PERK-Gadd153, que levaria ao aumento de ROS intracelular e pelo aumento da expressão de proibirina em condições de hipóxia (Muraguchi *et al.* 2010). Provavelmente, nesse modelo, uma parte do aumento de ROS deve acontecer devido ao estresse de retículo endoplasmático, mas outra parte do aumento de ROS deve acontecer pela condição de hipóxia. Ambas condições levariam ao aumento de expressão de proibirina.

5.5 Tratamento com cisplatina

As figuras 10 e 11 mostram que as linhagens WM164 e 624 tem a expressão de proibitina aumentada após tratamento com cisplatina por 24 horas. A linhagem WM164 não perde a viabilidade celular após 24 ou 48 horas de tratamento com cisplatina, nas doses de 25 μ M, 50 μ M e 100 μ M enquanto que a linhagem 624 tem sua viabilidade diminuída de uma maneira dose e tempo dependente (figuras 14 e 15, respectivamente).

Cisplatina leva à produção de ROS intracelular e a inibição de glutatona aumenta sua citotoxicidade (Miyajima *et al.* 1997). Proibitina agiria numa função de proteção contra ao aumento de ROS causado pela cisplatina. Essa proteção contra cisplatina seria causada não pela ação da proibitina que já está na mitocôndria, mas sim pela produção *de novo* de proibitina, produzida no momento da ação da cisplatina, já que o *knock-down* parcial de proibitina, insuficiente para a inibição da proteína, mas suficiente para impedir que haja sua superexpressão, é suficiente para a sensibilização das linhagens LB373 e Mel 85 ao tratamento com cisplatina (Tortelli Jr *et al.*, dados não publicados). Tanto o *knock-down* parcial (figura suplementar S3), como um *knock-down* mais eficiente de proibitina (figura suplementar S4) sensibiliza a linhagem LB373 ao tratamento com cisplatina.

A ação da cisplatina no interior da célula parece ocorrer primeiramente na mitocôndria, pois, entre parâmetros como respiração

celular, acidificação e mudanças na interação célula-célula, a primeira modificação observada é a queda na taxa de respiração celular. Algumas linhagens celulares, como HT-29 e HCT-116, tem uma redução na taxa de respiração celular imediatamente após tratamento com cisplatina. Após 24 horas de tratamento, todos esses parâmetros tem alguma modificação. Apesar de haver uma baixa na respiração celular, não há efeito imediato na atividade da mitocôndria. A baixa na atividade respiratória da mitocôndria causada pela cisplatina pode ser devido a um mecanismo que envolva uma sinalização extra-mitochondrial. Ativação de AKT e MAPK parecem não ser responsáveis pela queda nos níveis de respiração celular, pois estas vias são ativadas tardiamente (Alborzinia *et al.* 2011).

Proibitina poderia ser um desses mecanismos, mas essa hipótese precisa ser mais bem trabalhada. Em cardiomiócitos, a condição de hipóxia rapidamente diminui os níveis de proibitina. Esse processo leva cerca de 15 minutos mostrando que há uma relação rápida entre a expressão de proibitina e a condição de respiração celular (Muraguchi *et al.* 2010). Em melanomas, dependendo da regulação desse mecanismo, pode ser que a diminuição da respiração celular causada pela cisplatina leve a um aumento nos níveis de proibitina, e não a uma diminuição como em cardiomiócitos, o que protegeria a mitocôndria, mantendo sua função.

O efeito da cisplatina é rápido e a expressão de aumentada de proibitina após 24 horas coincide com o período de ação da cisplatina e pode funcionar como um mecanismo de adaptação ao tratamento com

cisplatina. Interessantemente, não se observou mudanças significativas nos níveis de ROS após 24 horas de tratamento com cisplatina nas linhagens MCF-7 e HT-29 (Alborzinia *et al.* 2011). Não se sabe se cisplatina induz expressão de proibitina nessas linhagens.

5.6 Colocalização entre proibitina e proteínas do complexo MCM

Ao contrário do observado por Rizwani *et al.* 2009 a co-localização de proibitina com proteínas do complexo MCM (*minichromosome maintenance proteins*) é diferente em linhagens de melanoma. No artigo de 2009, Rizwani e Chellappan mostraram que, em linhagem de câncer de mama MCF-7, proibitina tem uma forte co-localização com MCM2 e MCM5 (principalmente com está última), e que não há co-localização entre proibitina e MCM7.

Proteínas do complexo MCM formam um complexo pré-replicativo, na origem de replicação, que garante a estabilidade necessária do DNA para que haja o início de sua replicação. Esse processo ocorre no final da mitose e no período G1 do ciclo celular.

Anteriormente à chegada de proteínas do complexo MCM, a origem de replicação é marcada pelo complexo de reconhecimento da origem (ORC1-6), que funciona como um ponto de apoio para o início da formação do complexo de replicação do DNA. Quando formados, proteínas do

complexo MCM são recrutadas e funcionam como helicases, abrindo o DNA à frente da origem de replicação (Rizwani *et al.* 2009).

Acredita-se que as proteínas do complexo MCM se encaixem em duas categorias: MCM4, MCM6 e MCM7 estariam envolvidas na atividade de helicase do DNA enquanto que MCM2, MCM3 e MCM5 teriam um papel mais regulatório do processo. Recentemente foi mostrado que MCM8 e MCM9 são necessárias para a formação de um complexo que levaria ao reparo de DNA através de recombinação homóloga (Nishimura *et al.* 2012).

A co-localização de proibitina com MCM2 e MCM5, na linhagem MCF-7, ocorre durante a fase G1 ciclo celular e há uma dissociação de proibitina com MCM2 e MCM5 na fase S do ciclo celular. Segundo o artigo, essa observação, juntamente com o fato de que proibitina pode inibir a replicação do DNA *in vitro* sugere que a associação de proibitina com MCM2 e MCM5 previne uma replicação prematura do DNA durante o ciclo celular (Rizwani *et al.* 2009), como se proibitina exercesse um controle de quando seria o momento certo para que o DNA pudesse replicar.

As figuras 23 e 24 mostram que não há co-localização entre proibitina e MCM2 nas linhagens LB373 e Mel 85, respectivamente. Nas figuras, a sobreposição das imagens mostra que não há somatório das cores (verde, representando proibitina) e vermelho (representando MCM2), caracterizando uma ausência de co-localização entre as duas proteínas.

A mesma ausência de co-localização se repete entre proibitina e MCM5 nas linhagens LB373 e Mel85 (figuras 25 e 26, respectivamente).

Curiosamente, a localização de MCM5 parece ser nucleolar nessas linhagens. A compartimentalização de MCM5 ocorre em regiões onde há ausência de DNA, que está marcado em azul pelo DAPI. Em células S2 de *drosophilas* a inibição de MCM5 não leva à perda de expressão de outras proteínas MCM, ao contrário de MCM 3, 6 e 7 (Crevel *et al.* 2007), mostrando que a ausência de MCM5 do complexo de pré-replicativo não leva a um aumento de sua desorganização além do causado pela falta de MCM5. Não se sabe se o mesmo ocorre em células de mamíferos, mas pode ser que a falta de MCM5 do complexo de pré-replicativo nas linhagens LB373 e Mel85, mesmo levando a algum grau de perda funcional do complexo formado pelas diversas MCMs, não seja algo tão impeditivo para essas linhagens, a ponto dos tumores não serem viáveis.

Ao contrário do esperado, em relação à linhagem MCF-7, proibitina colocalizou-se com MCM7 nas linhagens LB373 e Mel85 (figuras 27 e 28, respectivamente). Nessas linhagens, há uma clara mudança de cor para alaranjado na imagem onde há sobreposição dos anticorpos secundário verde e vermelho, evidenciando a co-localização entre as proteínas. A co-imunoprecipitação da figura 29 na linhagem LB373 mostra que há um enriquecimento de proibitina no imunoprecipitado com anticorpos anti-MCM7 e fortalece a noção de que ambas proteínas interagem, daí a co-localização de MCM7 com proibitina. Existe ainda um aumento de células em fase G1 do ciclo celular após inibição de proibitina ao se tratar a linhagem LB373 com cisplatina (fig. Suplementar S1). Entretanto, não se percebe modificação no ciclo celular na ausência de tratamento com cisplatina, o que

pode ser explicado pela baixa expressão de proibitina nessa condição. Isso seria uma evidência importante da relação entre proibitina e MCM7 pois a inibição de proibitina permitiria a atividade de helicases de MCM7 ainda na fase G1 do ciclo celular.

Como proibitina colocaliza-se com diferentes proteínas da família MCM, em relação à linhagem MCF-7, pode haver diferente regulação desse complexo em função de proibitina nas linhagens de melanoma estudadas. A ausência de co-localização de proibitina com MCM2 e MCM5 pode levar a uma perda do controle da replicação do DNA levando a uma replicação do DNA antes do momento correto, apesar de que essa perda de controle poderia ocorrer também devido à falta de MCM5 no complexo, já que esta proteína está co-localizada no nucléolo.

Recentemente, foi mostrada uma relação entre MCM2 e apoptose. A superexpressão de MCM2 em células HeLa, HL60 e HEK293T levou a um aumento nos níveis de apoptose e o tratamento com o inibidor de pancaspase Z-VAD reverteu a indução de apoptose pela transfecção de MCM2 na linhagem HL60 (*Suzuke et al* 2012). A ligação entre proibitina e MCM2 poderia funcionar como um novo mecanismo de resistência tumoral caso proibitina impeça a ação pro-apoptótica de MCM2, em linhagens onde há co-localização entre proibitina e MCM2.

Em melanomas há acúmulo de MCM2 (*Boyd et al.* 2008) e de proibitina durante a progressão tumoral. Esse acúmulo de MCM2 poderia significar não só um aumento na capacidade replicativa da célula tumoral,

mas também um aumento nos níveis de apoptose do tumor. Como nas linhagens de melanoma analisadas, a relação entre proibitina e MCM2 não se mostrou presente, diferentemente do observado por *Rizwani et al. 2009*, pode ser que haja uma relação entre proibitina e a indução de apoptose por MCM2. A ligação proibitina-MCM2 poderia ser necessária para a indução de apoptose por MCM2 ou, por outro lado, proibitina poderia agir como um inibidor desse processo, já que não se sabe se proibitina possui um papel regulador de MCM2 ou se proibitina é necessário para o correto funcionamento de MCM2.

MCM7 parece interagir com o fator induzido por hipóxia 1 (HIF-1 α). MCM7 se liga diretamente a HIF-1 α e inibe sua atividade, além de diminuir sua expressão (*Maimon et al. 2011*). Em melanomas, o nível de expressão de HIF-1 α está aumentado e esse aumento se relaciona com a diminuição da expectativa de vida do paciente. HIF-1 α (*Semenza et al, 2010*). HIF-1 α , em melanomas assim como em outros tumores, induz a expressão de genes relacionados com diversos mecanismos de adaptação à condição de hipóxia tumoral. Entre os genes induzidos por HIF-1 α estão genes relacionados com angiogênese (*Liao e Johnson, 2007*), sobrevivência celular a quimioterapia e radioterapia (*Moeller et al. 2007*), instabilidade genética (*Bindra et al. 2007*), imortalização e evasão do sistema imunológico (*Lukashev et al. 2007*), invasão e metástase (*Chan e Giaccia, 2007*), proliferação, metabolismo e regulação do pH (*Swietach et al. 2007*). Nesse contexto, proibitina poderia funcionar como um regulador de MCM7, permitindo que HIF-1 α exerça sua função.

5.7 Relação entre proibitina e E2F

Entre as funções nucleares de proibitina, a mais bem descrita é sua relação com o fator de transcrição E2F. proibitina pode exercer um papel regulatório em E2F1 pela repressão, juntamente com Rb, de sua atividade transcricional (Fusaro *et al.* 2003). Sua ação repressora direta da transcrição mediada por E2F se dá através de sua ligação de um sítio conservado, diferente de pRb sendo necessário também o recrutamento de Brg-1/Brm (Wang *et al.* 2002). Apesar de proibitina exercer uma função repressora de E2F sua ação pode não ser tão eficiente como Rb, funcionando provavelmente como um regulador desse processo.

Classicamente, E2F é uma família de fatores de transcrição, que possui membros ativadores de genes (E2F1, E2F2, E2F3a e E2F3b) e membros repressores (E2F4, E2F5, E2F6, E2F7 e E2F8). Sua função clássica está relacionada com a ativação do ciclo celular e seu controle se dá pela sua inibição via proteína retinoblastoma (Rb) (Chen *et al.* 2009).

Entretanto, a função de E2F1 parece ser muito mais abrangente do que sua clássica descrição como um controlador de ciclo celular. Cerca de 25% a 35% de todos os genes humanos parecem conter regiões promotoras que podem ser responsivas a E2F1, evidenciando a complexidade e amplitude de sua função (Bieda *et al.* 2006).

5.7.1 Expressão de metaloproteinases de matriz extracelular

Uma das funções controladas por E2F1 é a expressão de metaloproteinases de matriz extracelular (MMPs). E2F1 controla a expressão de MMP 9, MMP 14 e MMP15, sendo que a co-transfecção de E2F1 com Rb reverte a indução de expressão dessas MMPs nas linhagens de câncer de pulmão A549 e H1650 (Johnson *et al.* 2012).

As figuras 30, 31 e 32 mostram que a inibição de proibitina leva ao aumento de expressão, em nível de RNA mensageiro, de diversas metaloproteinases de matriz extracelular nas linhagens MDA-MB-231, A549 e SKMel 02, respectivamente. A indução de MMPs pela inibição de proibitina não foi homogênea dentro de uma mesma linhagem mostrando que, se a indução de expressão depender de E2F1, há participação de outros reguladores nesse processo.

A figura 30 mostra que a linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 teve uma grande expressão de MMP2 e MMP9 após inibição de proibitina. Já as MMPs 14 e 15 não tiveram um aumento tão evidente. Curiosamente, a administração por via oral de epigallocatequina (EGCG) leva a uma diminuição dos níveis séricos de MMP 2 e MMP 9, em pacientes com câncer de mama (Zhang *et al.* 2012). Em linhagem celular, o tratamento com epigallocatequina pode levar à formação de ROS (Min *et al.* 2012). O aumento de ROS induzido por EGCG poderia levar a um aumento na expressão de proibitina o que inibiria a expressão de MMP 2 e MMP 9,

através do bloqueio de E2F1. Isso seria uma evidência da participação de proibitina na expressão de MMPs via E2F1.

A figura 31 mostra que a linhagem de câncer de pulmão A549 teve um comportamento semelhante à linhagem MDA-MB-231. A inibição de proibitina levou a um aumento da expressão de MMP 2 e MMP 9, apesar desse aumento ser menos eficiente em relação à linhagem de câncer de mama. As MMPs 14 e 15 tiveram uma pequena diminuição em sua expressão, que pode ser pouco significativo em relação às variações observadas.

Ao contrário das linhagens de câncer de mama e de câncer de pulmão, a linhagem de melanoma SKMel 02 não parece ser tão responsiva à expressão de MMPs após a inibição de proibitina. A linhagem SKMel 02 teve apenas a MMP 15 aumentando de maneira mais significativa na ausência de proibitina. As MMPs 2, 9 e 14 tiveram pouca modificação em sua expressão. O aumento de expressão de MMP15 após inibição de proibitina nas linhagens de melanoma SkMel 02 e 624 não levaram a uma degradação na matriz de colágeno (fig. suplementar S7).

Há uma certa contradição na expressão de MMPs na linhagem SKMel 02 pois linhagens de melanoma com alta expressão nuclear de β -Catenina tem menor capacidade de invasão (ao contrário do esperado) e a inibição de β -Catenina restaura o fenótipo invasivo dessas linhagens (Arozarena *et al.* 2011). Como a inibição de proibitina pode realocar β -Catenina para a membrana plasmática, pelo menos na linhagem HeLa (Rajalingam *et al.*

2005), era de se esperar que houvesse uma maior expressão de MMPs, favorecendo o fenótipo invasivo. Aparentemente, em melanomas, a inibição de proibitina não modifica a localização de β -Catenina, pelo menos nas linhagens LB373, Mel 85 e SKMel 37 (Figura Suplementar S5), o que explicaria a baixa expressão de MMPs na linhagem SKMel 02.

5.7.2 Expressão de marcadores de transição epitélio mesênquima

A inibição de proibitina parece induzir algumas características celulares relacionadas com o fenômeno de transição epitélio mesênquima (EMT). A figura 33 mostra que a inibição de proibitina levou a um aumento de expressão de fibronectina na linhagem de câncer de mama MDA-MB-231. Houve um menor aumento na linhagem de melanoma SKMel 02 e não se observou aumento na linhagem de câncer de pulmão A549. A figura 34 mostra que há um discreto aumento nos níveis de vimentina na linhagem A549.

A transição epitélio mesênquima ocorre em fases críticas do desenvolvimento embriológico. Durante a transição, células epiteliais perdem as características que as definem como tal e passam a expressar marcadores de células mesenquimais. Tudo isso para que as células de origem possam migrar, se adaptar e sobreviver em um ambiente diferente de onde elas estão acostumadas.

Entre as mudanças moleculares que ocorrem durante a transição, há perda de expressão de E-caderina, citoqueratina, laminina; e ganho de expressão de N-caderina, vimentina, fibronectina, β -catenina (Kalluri e Weinberg, 2009).

A linhagem A549 parece ser bem responsiva em relação à expressão de vimentina após inibição de proibitina. A fig. suplementar S8a e S8c mostram que a inibição de proibitina leva a um aumento de expressão proteica de vimentina por western blot e imunofluorescência, respectivamente. Esse aumento de expressão de vimentina parece estar relacionado com a via E2F1, pois o ensaio de luciferase mostra que o promotor de vimentina é responsivo a E2F1 e a adição de proibitina reverte o aumento de expressão de vimentina induzida por E2F1.

Geneticamente, EMT está associada ao ganho de expressão de alguns genes, como Snail, Slug, Twist, ZEB1, Goosecoid e FOXC2 e perda de expressão de fatores relacionados com o estado epitelial da célula como sindecan, MUC1, desmoplaquina (Kalluri e Weinberg, 2009). Não há evidências até o presente momento que E2F regule a expressão desses ativadores ou repressores de EMT.

Outra evidencia do processo é a perda de E-Caderina por parte de células epiteliais e o ganho de N-caderina, que está presente em células mesenquimais. Há uma clara relação entre a perda de E-caderina e a entrada de células tumorais em EMT (Edelman *et al.* 1983). Ainda, o complexo de adesão celular, organizado por E-caderina, sequestra β -

catenina no citoplasma mantendo as características epiteliais de células tumorais. A aquisição de um fenótipo mesenquimal depende da translocação de β -catenina para o núcleo (Cara *et al.* 2001).

A figura suplementar S9 mostra que a inibição da expressão de proibitina, na linhagem A549, leva à perda de E-caderina e o ganho de expressão de N-caderina. Isso mostra que proibitina pode estar relacionado com um processo importante para a transição epitélio mesênquima, provavelmente através de E2F1. Talvez a falta de proibitina leve à expressão de marcadores relacionados com o processo de EMT, que são necessários para a sobrevivência das células epiteliais no tecido mesenquimal, mas a falta de proibitina talvez não induza EMT em todos os modelos de câncer. Isso por que a falta de proibitina leva à translocação de β -catenina para o citoplasma em células HeLa (Rajalingam *et al.* 2005).

5.7.3 Reparo de DNA mediado por E2F

A figura 39 mostra que proibitina faz parte da resposta de reparo de DNA após tratamento com radiação UVB. Sua participação na resposta à lesão do DNA parece ser não muito eficiente, mas é condizente com a ideia de que a proibitina parece ser mais um regulador de respostas controladas por E2F do que um participante efetivo.

Uma hipótese alternativa seria a de que a lesão UVB levasse à perda da homeostase das mitocôndrias e produção de ROS, o que levaria ao dano celular na ausência de proibitina. O somatório dos dois efeitos, o da liberação da função de reparo de DNA de E2F1, protegendo a célula, e o da indução de ROS por UVB, levando a célula à morte, poderia explicar a baixa proteção geral causada pela inibição de proibitina.

De qualquer forma, a figura 39 mostra que a inibição de proibitina por siRNA protege a linhagem de câncer de pulmão A549 contra o tratamento com radiação UVB, apenas na dose de 200J. Não se observou diferença estatística significativa na dose de 100J. cisplatina foi usada como um controle positivo e houve uma aparente sensibilização dessa linhagem, ainda que em valores absolutos muito pequenos, após inibição de proibitina na ausência de qualquer tratamento, provavelmente por uma desestabilização das mitocôndrias.

A radiação ultravioleta está no espectro da luz abaixo da luz visível e acima dos Raios-X, em relação ao comprimento de onda (Maveraks *et al.* 2010). Em sua faixa de comprimento de ondas, a luz ultravioleta pode ser classificada de três formas: Uva, que corresponde a mais de 90% da luz UV incidente e possui um comprimento de onda de 320nm a 400nm; UVB, que corresponde a praticamente os 10% restantes da luz UV incidente, com comprimento de onda de 280nm a 320nm, sendo que apenas 10% dessa luz atravessa a atmosfera; e a UVC, que é a luz mais carcinogênica, mas é

praticamente absorvida por completo na atmosfera, com comprimento de onda de 200nm a 280nm (Hazar-Rethinam *et al.* 2011).

Os estudos de lesão no DNA acabam focando em UVB pois essa faixa do espectro dentro da luz ultravioleta é a que carrega mais energia sendo a mais mutagênica em relação à UVA. A luz ultravioleta que chega na superfície do planeta Terra é uma mistura de 90% de UVA e 10% de UVB. Mesmo havendo pouca radiação UVC que chega na superfície do planeta, há estudos com essa radiação na carcinogênese.

Como a capacidade energética da luz UVA é menor essa radiação não é capaz de lesar diretamente o DNA. Acredita-se que sua capacidade de lesar o DNA ocorra de maneira indireta, através da formação de ROS (Lippens *et al.* 2009).

UVB pode lesar diretamente o DNA pela sua alta capacidade energética. Sua ação direta no DNA leva à formação de fotolesões, como dímeros de pirimidinas ou dímeros de 6-4 pirimidina/pirimidona. Se esses dímeros de pirimidina não forem adequadamente reparados por mecanismos de reparo de DNA, poderá haver transição de bases nitrogenadas, como de C para T ou de duplas CC para TT levando a mutações no DNA (Nishigori, 2006).

Após a lesão no DNA, inicia-se um processo de reparo, ativado por NER. Esse processo permite que, em casos de lesão que não torne a célula inviável, haja o reparo dos dímeros de pirimidina. Caso a lesão seja persistente, sendo incapaz sua recuperação, inicia-se um processo de morte

celular por apoptose. A apoptose induzida por UV ocorre através de vias intrínsecas, devido a uma modificação do balanço entre a produção e localização de proteínas pró-apoptóticas, como Bad, Bax e Bak; e de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 e Bcl-XI (Roos e Kaina, 2006); ou de vias extrínsecas, através da ligação de receptores de morte celular como CD95, TNF e Trail (Aragane *et al.* 1998).

A resposta pró ou anti-tumoral da família E2F parece ser contexto-dependente. Há estudos que mostram que a superexpressão de E2F1 em camundongos pode ter um efeito pró apoptótico em queratinócitos da camada basal e um aumento na formação de tumores que também tem aumento de expressão de ciclina D1 e que a superexpressão de E2F4 não tem os níveis de apoptose aumentados (Wang *et al.* 2000).

O aumento de expressão de E2F1 em resposta à radiação ultravioleta ocorrer via ATM/ATR e leva a um acúmulo de eventos que terminam na ativação da apoptose. Isso sugere que a indução de E2F1 por UV tem efeito de supressão de tumor (Carcagno *et al.* 2009).

Entretanto, após irradiação com luz UVB, E2F1 possui um efeito anti-apoptótico em queratinócitos, de maneira p53 independente. O efeito favorável à sobrevivência após irradiação por luz UVB parece ocorrer pela capacidade de E2F1 perceber lesões no DNA e iniciar uma resposta de reparo dessas lesões (Nevins, 1998). E2F1 pode atuar diretamente no local da lesão de DNA (Maser *et al.* 2001) ou transcrever genes relacionados ao reparo de DNA (Polager *et al.* 2002).

Uma das vias ativadas por E2F1 para o reparo de DNA parece ser através de Gadd45a. O complexo Rb-E2F1 regula negativamente ZBRK1, um repressor de Gadd45a, permitindo que Gadd45a exerça sua função de reparo de DNA. A inibição de Rb ou de E2F1 levam a um aumento na expressão de ZBRK1 e uma consequente sensibilização ao tratamento com UV. Ainda, a inibição de ZBRK1 diminui os níveis de apoptose após tratamento com UV (Liao *et al.* 2010).

A figura 40 mostra que a inibição de proibitina aumenta o nível de expressão do mRNA de Gadd45a na linhagem A549. Esperava-se que como há um aumento de Gadd45a, a expressão de ZBRK1 estivesse diminuída, o que não ocorreu. A figura 41 mostra que apesar da inibição de proibitina, há também um aumento de ZBRK1, sugerindo que o complexo Rb-E2F1-PHB é necessário para a inibição da expressão de ZBRK1, e que proibitina é necessário para ZBRK1 inibir a expressão de Gadd45a. Isso condiz com o resultado da figura 39, onde há uma diminuição dos níveis de morte celular na linhagem A549 após tratamento com UV, na ausência de proibitina. Apesar do aumento de ZBRK1, a ausência de proibitina não permite a inibição de Gadd45a, elevando os níveis de reparo de DNA, protegendo a célula do agravo genotóxico causado por UVB.

A relação entre o eixo Rb-E2F1-PHB e a inibição de Gadd45a por ZBRK1 parece se confirmar na linhagem de melanoma SKMel 02, já que na figura 42, a inibição de proibitina também leva ao aumento da expressão de

ZBRK1 e não há diminuição do nível de expressão de Gadd45a, como esperado, mas sim há um aumento de expressão de Gadd45a.

5.7.4 Indução de senescência pelo bloqueio da função de E2F

A indução de senescência ocorre pela inibição de proibirina em E2F1, o que leva ao bloqueio do ciclo celular.

A família E2F atua em vários pontos de checagem do ciclo celular ativando ondas de transcrição que levam à célula a entrar em diferentes fases do ciclo. Sua superexpressão é suficiente para a entrada da célula no ciclo celular, independentemente da presença de fatores de crescimento (Johnson *et al.* 1993).

Células em G0 tem o ciclo celular bloqueado por E2F4 e E2F5, membros repressores da família E2F (Harbour *et al.* 1999). Após estímulo mitótico, ocorre a fosforilação de Rb e o estado fosforilado de Rb permite que E2F1 seja liberado para exercer sua atividade transcricional (Chellappan *et al.* 1991). A fosforilação de Rb libera os membros repressores da família E2F permitindo o acúmulo de membros ativadores do ciclo celular. Entre os membros ativadores, está E2F1 e sua ativação, juntamente com E2F2 e E2F3, há uma mudança para a fase de síntese (S) do ciclo celular (leone *et al.* 1998).

Proibitina liga-se diretamente aos reguladores da atividade de E2F. Através de ensaios de imunoprecipitação, proibitina foi co-localizada com os inibidores de E2F Rb, p107 e p130. Apesar de sua capacidade de se ligar a Rb, proibitina não inibe sua atividade, podendo funcionar como um agente capaz de aumentar a eficiência de Rb. É interessante notar a deleção do sítio de ligação de proibitina com Rb, na molécula de proibitina, impede a capacidade de proibitina funcionar não só como um repressor de E2F1, mas também como um bloqueador de ciclo celular (Wang *et al.* 1999).

As figuras 43 e 44 mostram que a inibição de proibitina leva a uma perda da senescência induzida por adriamicina, nas linhagens de melanoma humano 624 e WM 164, respectivamente, provavelmente pela ativação de E2F1. As figuras mostram que há uma considerável diminuição da perda de senescência nas duas linhagens. O efeito de bloqueio de ciclo celular por proibitina pode ser evidenciado pelo aumento de células na fase G1 do ciclo celular após tratamento que leve a indução da expressão de proibitina como cisplatina (figura suplementar S1) e tunicamicina (figura suplementar. S2).

No balanço geral, parece ser mais importante a proteção mitocondrial exercida pelo aumento de proibitina do que a dificuldade que esse aumento pode levar em termos de ciclo celular. Se, por um lado, a senescência induzida pelo acúmulo de proibitina dificultaria células de melanoma a entrarem em ciclo celular, por outro lado, esse bloqueio dificultaria a ação de drogas lesivas ao DNA.

Em outros modelos, como na capacidade de reparo de DNA após exposição à luz UVB, proibitina parece funcionar como um regulador do processo de reparo de DNA controlado por E2F e não como um orquestrador da resposta. Essa ideia parte da baixa diferença observada na quantidade de células hipodiplóides após irradiação com luz UVB. No caso da senescência, observa-se um efeito estatístico bem maior, havendo uma grande perda da capacidade das linhagens 624 e WM 164 em senescer. Isso mostra que a regulação de E2F1 por proibitina tem importâncias distintas, de acordo com a função celular exercida por E2F1.

5.8 Expressão de proibitina por fatores do microambiente tumoral e a maturação de macrófagos

A ideia da relação entre o microambiente tumoral e a expressão de proibitina pode explicar em parte a falha do tratamento antitumoral, caso se confirme que sua expressão possa aumentar pela ação do microambiente tumoral. A indução independente de tratamento já era observada em modelo de progressão de melanoma, onde há acúmulo de proibitina de acordo com a progressão tumoral (fig. suplementar S6).

Diversas citocinas são lançadas no microambiente tumoral e essas citocinas modulam e controlam o comportamento de diversos tipos celulares, não só a célula tumoral propriamente dita. Monócitos circulantes podem ser diferenciados em macrófagos M1 e macrófagos M2. Macrófagos M1 são

diferenciados pela ação de LPS e TNF ou IFN γ e tem uma associação com a resistência à formação tumoral. Já os macrófagos M2 são diferenciados por IL4 e atuam promovendo a formação do tumor.

A figura 37 mostra que TGF β é capaz de induzir a expressão de proibitina na linhagem de câncer de pulmão A549. Existe certa incoerência nesse resultado, pois TGF β é um indutor clássico de transição epitélio-mesênquima, logo, esperava-se que sua ação diminuísse a expressão de proibitina. O aumento de expressão de proibitina na linhagem A549 pode ser explicado pela capacidade de TGF β induzir ROS (Hubackova *et al.* 2012).

Já a figura 38 mostra que na linhagem de melanoma murino B16F10 há diminuição de expressão de proibitina após tratamento com TGF β . Essa resposta está mais de acordo com a ideia de indução de transição epitélio-mesênquima por TGF β , já que a diminuição da expressão de proibitina permitiria a EMT induzida por E2F1.

A diferenciação de macrófagos em M1 e M2 depende do ambiente de citocinas que os monócitos encontram ao entrar no microambiente tumoral. Monócitos circulantes podem ser diferenciados em macrófagos M1 e macrófagos M2. Macrófagos M1 são diferenciados pela ação de LPS e TNF ou IFN γ e tem uma associação com a resistência à formação tumoral. Já os macrófagos M2 são diferenciados por IL4 e atuam promovendo a formação do tumor.

Em macrófagos extraídos de camundongos C57BL/6, há uma diminuição dos níveis de proibitina após tratamento com IL4, TGF β ou após tratamento com LPS e IFN γ . É interessante notar que o tratamento apenas

com IFN γ leva a diminuição da expressão de proíbitina em células epiteliais intestinais humanas (Kathiria *et al.* 2012). Talvez apenas o tratamento com IFN γ seja necessário para a diminuição da expressão de proíbitina.

A indução de proíbitina por TGF β parece ser contexto-dependente, pois TGF β induz a expressão de proíbitina na linhagem tumoral A549 (figura 37), diminui a expressão de proíbitina na linhagem B16F10 (figura 38) e diminui sua expressão em macrófagos (figura 45).

O status energético do macrófago pode polarizar sua ativação em M1 ou M2. O controle do metabolismo de glicose pode levar a uma polarização M1 ou M2. A ativação de macrófagos em M1 leva a uma reprogramação para um metabolismo glicolítico, permitindo que o macrófago sobreviva em ambientes com baixa tensão de oxigênio (Haschemi *et al.* 2012). Era de se esperar que proíbitina tivesse sua expressão aumentada, pois a baixa tensão de oxigênio pode levar à formação de ROS intracelular. Proíbitina, então, protegeria o macrófago nessas condições.

Como o aumento de expressão de proíbitina não foi observado após a diferenciação dos macrófagos em M1, proíbitina poderia ter algum papel na maturação e polarização dessas células, diminuindo sua expressão para a polarização M1. Existe uma relação entre E2F1 e a polarização de células mielóides. A expressão contínua de E2F1 em linhagem de leucemia mieloblástica M1, que são bastante indiferenciadas, impede sua diferenciação em macrófagos, após serem tratadas com IL6 (Amanullah *et al.* 2000). Talvez exista essa relação com o tratamento com IL6 nos

monócitos extraídos de camundongos, mas ainda assim, o tratamento com LPS e IFN γ levou a uma diminuição da expressão de proibitina.

6. SUMÁRIO DOS REULTADOS

1. Vimblastina induz acúmulo de proíbitina apenas na linhagem LB373 na concentração de 10nM. Não houve indução de morte celular nessa concentração. As linhagens Mel 85 e SKMel 37 não tiveram os níveis de proíbitina aumentados após tratamento com vimblastina. A linhagem SKMel 37 mostrou-se a mais sensível ao tratamento com vimblastina;
2. A privação de soro fetal bovino induz acúmulo de proíbitina nas linhagens LB373 e SKMel 37. Há aumento nos níveis de ROS nas duas linhagens após depleção de SFB. A linhagem SKMel 37 tem a forma de suas mitocôndrias modificadas após cultivo com baixa concentração ou ausência de SFB;
3. O tratamento com cisplatina, dacarbazina ou temozolamida induz acúmulo de proíbitina nas linhagens WM 164 e 624. Apenas o tratamento com cisplatina leva a uma diminuição da viabilidade celular dessas linhagens;
4. O tratamento com tunicamicina leva ao acúmulo de proíbitina nas linhagens LB373 e Mel 85. A inibição de proíbitina sensibiliza a linhagem LB373 ao tratamento com tunicamicina, mas não provoca a saída de proíbitina na mitocôndria;
5. Proíbitina está colocalizada com a mitocôndria nas linhagens LB373 e Mel 85. Não se observou colocalização entre proíbitina e a mitocôndria na linhagem SKMel 37;

6. Proibitina não está colocalizada com MCM2 e MCM5 nas linhagens LB373 e Mel 85. Nessas linhagens, MCM5 está localizada no nucléolo. Houve colocalização entre proibitina e MCM7 nessas duas linhagens;
7. A inibição de proibitina induz a expressão de MMP2, MMP9, MMP14 e MMP15 nas linhagens MDA-MB-231 e SKMel 02;
8. A inibição de proibitina induz a expressão de MMP2 e MMP9, mas não induz a expressão de MMP14 e MMP15 na linhagem A549;
9. A inibição de proibitina induz a expressão de fibronectina nas linhagens MDA-MB-231 e SKMel 02. Não se observou aumento de expressão de fibronectina na linhagem A549 após inibição de proibitina;
10. A inibição de proibitina induz a expressão de vimentina nas linhagens A549 (RNAm e proteína) e SKMel 02 (RNAm). Não se observou aumento de expressão de vimentina na linhagem MDA-MB-231 após inibição de proibitina;
11. O tratamento com TGF β induz acúmulo de proibitina na linhagem A549, mas diminui sua expressão na linhagem de melanoma murino B16F10;
12. A inibição de proibitina protege a linhagem A549 contra o tratamento com UVB. Há aumento de GADD45a e ZBRK1 nessa linhagem após inibição de proibitina. A linhagem SKMel 02 também tem a expressão de GADD45a e ZBRK1 aumentados após inibição de proibitina;

- 13.A inibição de proibirina diminui a senescência induzida por adriamicina nas linhagens 624 e WM 164;
- 14.A ativação de macrófagos em M1, por IFN γ e LPS, ou a ativação de macrófagos em M2, por IL4, diminuem a expressão de proibirina. O tratamento com TGF β também diminui a expressão de proibirina em macrófagos.

7. CONCLUSÃO

Proibitina é parte da resposta a diversos mecanismos de estresse celular. Mecanismos que levem a lesão de mitocôndria, desestabilizando-a a ponto de haver um descontrole na produção de ROS podem levar a um aumento de expressão de proibitina. Esse aumento pode estar associado a um sistema de proteção mitocondrial e, conseqüentemente, celular, como visto pela inibição de proibitina e a sensibilização aos tratamentos com cisplatina e tunicamicina. Com isso, **a localização mitocondrial de proibitina favorece a sobrevivência da célula tumoral.**

Por outro lado, **quando localizada no núcleo, proibitina tem um efeito oposto.** A relação de inibição de proibitina em vias controladas pela família do fator de transcrição E2F mostra que o excesso de proibitina poderia bloquear o desenvolvimento do tumor, seja em termos de manutenção da senescência celular ou pelo controle de vias relacionadas com migração e transição epitélio mesenquimal, que são absolutamente necessárias para o desenvolvimento e a progressão tumoral. Assim, pelo menos em parte, **proibitina nuclear controlaria negativamente a progressão tumoral dependente de E2F1, crítico para a progressão de melanomas.**

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alborzinia H, Can S, Holenya P, Scholl C, Lederer E, Kitanovic I, Wölfl S. 2011 Real-time monitoring of cisplatin-induced cell death. *PLoS One*. 2011;6(5):e19714. doi: 10.1371/journal.pone.0019714.
- Aka JA, Lin SX. 2012, Comparison of functional proteomic analyses of human breastcancer cell lines T47D and MCF7. *PLoS One*.7(2):e31532.
- Alaiya AA, Al-Mohanna M, Aslam M, Shinwari Z, Al-Mansouri L, Al-Rodayan M, Al-Eid M, Ahmad I, Hanash K, Tulbah A, Bin Mahfooz A, Adra C. 2011, Proteomics-based signature for human benign prostate hyperplasia and prostate adenocarcinoma. *Int J Oncol*. 2011 Apr;38(4):1047-57.
- Amanullah A, Hoffman B, Liebermann DA. 2000 Deregulated E2F-1 blocks terminal differentiation and loss of leukemogenicity of M1 myeloblastic leukemia cells without abrogating induction of p15(INK4B) and p16(INK4A). *Blood*. 2000 Jul 15;96(2):475-82.
- Ande, S.R., Gu, Y., Nyomba, B.L., Mishra, S. 2009, Insulin induced phosphorylation of prohibitin at tyrosine 114 recruits Shp1, *Biochim Biophys Acta.*, 1793(8), pp.1372-1378.
- Aragane Y, Kulms D, Metze D, Wilkes G, Pöppelmann B, Luger TA, Schwarz T. 1998 Ultraviolet light induces apoptosis via direct activation of CD95 (Fas/APO-1) independently of its ligand CD95L. *J Cell Biol*. 1998 Jan 12;140(1):171-82.
- Arbiser, J. L. 2004, Molecular regulation of angiogenesis and tumorigenesis by signal transduction pathways: evidence of predictable and reproducible patterns of synergy in diverse neoplasms, *Semin.Cancer Biol.*, 14(2), pp. 81-91.
- Arozarena I, Bischof H, Gilby D, Belloni B, Dummer R, Wellbrock C. 2011 In melanoma, beta-catenin is a suppressor of invasion. *Oncogene*. 2011 Nov 10;30(45):4531-43. doi: 10.1038/onc.2011.162.
- Artal-Sanz, M., Tsang, W. Y., Willems, E. M., Grivell, L. A., Lemire, B. D., van der, S. H., Nijtmans, L. G. 2003, The mitochondrial prohibitin complex is essential for embryonic viability and germline function in *Caenorhabditis elegans*, *J.Biol.Chem.*, 278(34), pp. 32091-32099.

- Ashkenazi, A., Dixit, V. M. 1999, Apoptosis control by death and decoy receptors, *Curr.Opin.Cell Biol.*, 11(2), pp. 255-260.
- Bellon, S. F., Coleman, J. H., Lippard, S. J. 1991, DNA unwinding produced by site-specific intrastrand cross-links of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II), *Biochem.*, 30(32), pp. 8026-8035.
- Benguedouar L, Boussenane HN, Wided K, Alyane M, Rouibah H, Lahouel M. Efficiency of propolis extract against mitochondrial stress induced by antineoplastic agents (doxorubicin and vinblastin) in rats. *Indian J Exp Biol.* 2008 Feb;46(2):112-9.
- Berdasco, M., and Esteller, M. 2010, Aberrant epigenetic landscape incancer: How cellular identity goes awry. *Dev. Cell* 19, 698–711.
- Berger, K. H., Yaffe, M. P. 1998, Prohibitin family members interact genetically with mitochondrial inheritance components in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol.Cell Biol.*, 18(7), pp. 4043-4052.
- Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D.2000. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol Jun*;2(6):326-32.
- Bi M, Naczki C, Koritzinsky M, Fels D, Blais J, Hu N, Harding H, Novoa I, Varia M, Raleigh J, Scheuner D, Kaufman RJ, Bell J, Ron D, Wouters BG, Koumenis C. 2005, ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumorgrowth. *EMBO J.* 2005 Oct 5;24(19):3470-81.
- Bieda M, Xu X, Singer MA, Green R, Farnham PJ. 2006 Unbiased location analysis of E2F1-binding sites suggests a widespread role for E2F1 in the human genome. *Genome Res.* 2006 May;16(5):595-605.
- Bindra RS, Crosby ME, Glazer PM. 2007 Regulation of DNA repair in hypoxic cancer cells. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26:249–260.
- Bouchon, B., Papon, J., Communal, Y., Madelmont, J. C., Degoul, F. 2007, Alkylation of prohibitin by cyclohexylphenyl-chloroethyl urea on an aspartyl residue is associated with cell cycle G(1) arrest in B16 cells, *Br.J.Pharmacol.*, 152(4), pp. 449-455.
- Bollag G, Hirth P, Tsai J, Zhang J, Ibrahim PN, Cho H, Spevak W, Zhang C, Zhang Y, Habets G, Burton EA, Wong B, Tsang G, West BL, Powell B, Shellooe R, Marimuthu A, Nguyen H, Zhang KY, Artis DR, Schlessinger J, Su F, Higgins B, Iyer R, D'Andrea K, Koehler A, Stumm M, Lin PS, Lee RJ, Grippo J, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, Chapman PB, Flaherty KT, Xu X, Nathanson KL, Nolop K. 2010, Clinical efficacy of a RAF inhibitor

- needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature*. 2010 Sep 30;467(7315):596-9.
- Boyd AS, Shakhtour B, Shyr Y 2008 Minichromosome maintenance protein expression in benign nevi, dysplastic nevi, melanoma, and cutaneous melanoma metastases. *J Am Acad Dermatol*. 2008 May;58(5):750-4. doi: 10.1016/j.jaad.2007.12.026.
- Brewer JW, Diehl JA. 2000 PERK mediates cell-cycle exit during the mammalian unfolded protein response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Nov 7;97(23):12625-30.
- Bryan, T. M., Cech, T. R. 1999, Telomerase and the maintenance of chromosome ends, *Curr.Opin.Cell Biol.*, 11(3), pp. 318-324.
- Cara J. Gottardi, Ellen Wong, Barry M. Gumbiner 2001 E-Cadherin Suppresses Cellular Transformation by Inhibiting β -Catenin Signaling in an Adhesion-Independent Manner *J Cell Biol*. 2001 May 28; 153(5): 1049–1060.
- Carcagno AL, Ogara MF, Sonzogni SV, Marazita MC, Sirkin PF, Ceruti JM, Cánepa ET. 2009 E2F1 transcription is induced by genotoxic stress through ATM/ATR activation. *IUBMB Life*. 2009 May;61(5):537-43. doi: 10.1002/iub.197.
- Chan DA, Giaccia AJ. 2007 Hypoxia, gene expression, and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26:333–339.
- Chaney, S. G., Vaisman, A. 1999, Specificity of platinum-DNA adduct repair, *J.Inorg.Biochem.*, 77(1-2), pp. 71-81.
- Chang YP, Wang G, Bermudez V, Hurwitz J, Chen XS. Crystal structure of the GINS complex and functional insights into its role in DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jul 31;104(31):12685-90. Epub 2007 Jul 25.
- Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M, Hogg D, Lorigan P, Lebbe C, Jouary T, Schadendorf D, Ribas A, O'Day SJ, Sosman JA, Kirkwood JM, Eggermont AM, Dreno B, Nolop K, Li J, Nelson B, Hou J, Lee RJ, Flaherty KT, McArthur 2011, Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med*. 2011 Jun 30;364(26):2507-16.
- Chellappan SP, Hiebert S, Mudryj M, Horowitz JM, Nevins JR. 1991 The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell*. 1991 Jun 14;65(6):1053-61.
- Chen D, Chen F, Lu X, Yang X, Xu Z, Pan J, Huang Y, Lin H, Chi P. 2010, Identification of prohibitin as a potential biomarker for colorectal

- carcinoma based on proteomics technology. *Int J Oncol.* 2010 Aug;37(2):355-65.
- Chen HZ, Tsai SY, Leone G. 2009 Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nat Rev Cancer.* 2009 Nov;9(11):785-97
- Chen NG, Lu CC, Lin YH, Shen WC, Lai CH, Ho YJ, Chung JG, Lin TH, Lin YC, Yang JS. 2011, Proteomic approaches to study epigallocatechin gallate-provoked apoptosis of TSGH-8301 human urinary bladder carcinoma cells: roles of AKT and heat shock protein 27-modulated intrinsic apoptotic pathways. *Oncol Rep.* Oct;26(4):939-47.
- Chen XL, Zhou L, Yang J, Shen FK, Zhao SP, Wang YL. 2011, Hepatocellular carcinoma-associated protein markers investigated by MALDI-TOF MS. *Mol Med Report.* Jul-Aug;3(4):589-96
- Chen YW, Chou HC, Lyu PC, Yin HS, Huang FL, Chang WS, Fan CY, Tu IF, Lai TC, Lin ST, Lu YC, Wu CL, Huang SH, Chan HL. 2011, Mitochondrial proteomics analysis of tumorigenic and metastatic breast cancer markers. *Funct Integr Genomics.* Jun;11(2):225-39.
- Chin, L. 2003, The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man, *Nat.Rev.Cancer*, 3(8), pp. 559-570.
- Chiu WH, Luo SJ, Chen CL, Cheng JH, Hsieh CY, Wang CY, Huang WC, Su WC, Lin CF 2012 Vinca alkaloids cause aberrant ROS-mediated JNK activation, Mcl-1 downregulation, DNA damage, mitochondrial dysfunction, and apoptosis in lung adenocarcinoma cells. *Biochem Pharmacol.* May 1;83(9):1159-71. doi: 10.1016/j.bcp.2012.01.016.
- Choi, D., Lee, S. J., Hong, S., Kim, I. H., Kang, S. 2008, Prohibitin interacts with RNF2 and regulates E2F1 function via dual pathways, *Oncogene*, 27(12), pp. 1716-1725.
- Chudnovsky, Y., Khavari, P. A., Adams, A. E. 2005, Melanoma genetics and the development of rational therapeutics, *J.Clin.Invest*, 115(4), pp. 813-824.
- Cox JS, Walter P. 1996 A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell.* Nov 1;87(3):391-404.
- Crevel G, Hashimoto R, Vass S, Sherkow J, Yamaguchi M, Heck MM, Cotterill S 2007 Differential requirements for MCM proteins in DNA replication in *Drosophila* S2 cells. *PLoS One.* Sep 5;2(9):e833
- Croteau DL, Bohr VA. 1997 Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells. *J Biol Chem.* 1997 Oct 10;272(41):25409-12. Review.

- Cullen, K. J., Yang, Z., Schumaker, L., Guo, Z. 2007, Mitochondria as a critical target of the chemotherapeutic agent cisplatin in head and neck cancer, *J.Bioenerg.Biomembr.*, 39(1), pp. 43-50.
- DeNardo, D.G., Andreu, P., and Coussens, L.M. 2010, Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev.* 29, 309–316.
- DeBerardinis, R.J., Lum, J.J., Hatzivassiliou, G., and Thompson, C.B. 2008, The biology of cancer: Metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab.* 7, 11–20.
- Donahue, B. A., Augot, M., Bellon, S. F., Treiber, D. K., Toney, J. H., Lippard, S. J., Essigmann, J. M. 1990, Characterization of a DNA damage-recognition protein from mammalian cells that binds specifically to intrastrand d(GpG) and d(ApG) DNA adducts of the anticancer drug cisplatin, *Biochem.*, 29(24), pp. 5872-5880.
- Dong D, Ni M, Li J, Xiong S, Ye W, Virrey JJ, Mao C, Ye R, Wang M, Pen L, Dubeau L, Groshen S, Hofman FM, Lee AS. 2008, Critical role of the stress chaperone GRP78/BiP in tumor proliferation, survival, and tumorigenesis in transgene-induced mammary tumor development. *Cancer Res.* Jan 15;68(2):498-505.
- Eastman, A. 1987, The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes, *Pharmacol.Ther.*, 34(2), pp. 155-166.
- Edelman, G.M., Gallin, W.J., Delouree, A., Cunningham, B.A., and Thiery, J.P. 1983. Early epochal maps of two different cell adhesion molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80:4384–4388.
- Fink, D., Aebi, S., Howell, S. B. 1998, The role of DNA mismatch repair in drug resistance, *Clin.Cancer Res.*, 4(1), pp. 1-6.
- Fried, L., Arbiser, J. L. 2008, The reactive oxygen-driven tumor: relevance to melanoma, *Pigment Cell Melanoma Res.*, 21(2), pp. 117-122.
- Friguet, B., Bulteau, A. L., Petropoulos, I. 2008, Mitochondrial protein quality control: implications in ageing, *Biotechnol.J.*, 3(6), pp. 757-764.
- Furuta, T., Ueda, T., Aune, G., Sarasin, A., Kraemer, K. H., Pommier, Y. 2002, Transcription-coupled nucleotide excision repair as a determinant of cisplatin sensitivity of human cells, *Cancer Res.*, 62(17), pp. 4899-4902.
- Fusaro, G., Dasgupta, P., Rastogi, S., Joshi, B., Chellappan, S. 2003, Prohibitin induces the transcriptional activity of p53 and is exported from the nucleus upon apoptotic signaling, *J.Biol.Chem.*, 278(48), pp. 47853-47861.

- Govindarajan, B., Klafter, R., Miller, M.S., Mansur, C., Mizesko, M., Bai, X., LaMontagne, K. Jr., Arbiser, J.L., 2002, Reactive oxygen-induced carcinogenesis causes hypermethylation of p16(Ink4a) and activation of MAP kinase. *Mol Med.*, 8(1), pp.1-8.
- Govindarajan, B., Bai, X., Cohen, C., Zhong, H., Kilroy, S., Louis, G., Moses, M., Arbiser, J. L. 2003, Malignant transformation of melanocytes to melanoma by constitutive activation of mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK) signaling, *J.Biol.Chem.*, 278(11), pp. 9790-9795.
- Govindarajan, B., Sligh, J. E., Vincent, B. J., Li, M., Canter, J. A., Nickoloff, B. J., Rodenburg, R. J., Smeitink, J. A., Oberley, L., Zhang, Y., Slingerland, J., Arnold, R. S., Lambeth, J. D., Cohen, C., Hilenski, L., Griendling, K., Martinez-Diez, M., Cuezva, J. M., Arbiser, J. L. 2007, Overexpression of Akt converts radial growth melanoma to vertical growth melanoma, *J.Clin.Invest*, 117(3), pp. 719-729.
- Gregg L. Semenza 2010 Defining the Role of Hypoxia-Inducible Factor 1 in Cancer Biology and Therapeutics *Oncogene*. 2010 February 4; 29(5): 625–634
- Grivennikov, S.I., Greten, F.R., and Karin, M. 2010, Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140, 883–899.
- Haggerty TJ, Zeller KI, Osthus RC, Wonsey DR, Dang CV. 2003, A strategy for identifying transcription factor binding sites reveals two classes of genomic c-Myc target sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 29;100(9):5313-8.
- Han, E. K., Mcgonigal, T., Butler, C., Giranda, V. L., Luo, Y. 2008, Characterization of Akt overexpression in MiaPaCa-2 cells: prohibitin is an Akt substrate both in vitro and in cells, *Anticancer Res.*, 28(2A), pp. 957-963.
- Hanahan, D., Folkman, J. 1996, Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis., *Cell*, 86, pp. 353-364.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A. 2000, The hallmarks of cancer, *Cell*, 100(1), pp. 57-70.
- Harbour JW, Luo RX, Dei Santi A, Postigo AA, Dean DC. 1999 Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell*. 1999 Sep 17;98(6):859-69.
- Harding HP, Zhang Y, Ron D. 1999 Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*. 1999 Jan 21;397(6716):271-4.

- Harris, C. C. 1996, p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic--an abridged historical perspective, *Carcinogenesis*, 17(6), pp. 1187-1198.
- Haschemi A, Kosma P, Gille L, Evans CR, Burant CF, Starkl P, Knapp B, Haas R, Schmid JA, Jandl C, Amir S, Lubec G, Park J, Esterbauer H, Bilban M, Brizuela L, Pospisilik JA, Otterbein LE, Wagner O. The sedoheptulose kinase CARKL directs macrophage polarization through control of glucose metabolism. *Cell Metab*. 2012 Jun 6;15(6):813-26.
- Hayflick, L. 1997, Mortality and immortality at the cellular level. A review, *Biochemistry (Mosc.)*, 62(11), pp. 1180-1190.
- Hazar-Rethinam M, Endo-Munoz L, Gannon O, Saunders N. 2011 The role of the E2F transcription factor family in UV-induced apoptosis. *Int J Mol Sci*. 2011;12(12):8947-60. doi: 10.3390/ijms12128947.
- Hinderhofer M, Walker CA, Friemel A, Stuermer CA, Möller HM, Reuter A. 2009 Evolution of prokaryotic SPFH proteins. *BMC Evol Biol*. Jan 12;9:10. doi: 10.1186/1471-2148-9-10.
- Hoye, A. T., Davoren, J. E., Wipf, P., Fink, M. P., Kagan, V. E. 2008, Targeting mitochondria, *Acc.Chem.Res.*, 41(1), pp. 87-97.
- Hubackova S, Krejcikova K, Bartek J, Hodny Z. 2012 IL1- and TGF β -Nox4 signaling, oxidative stress and DNA damage response are shared features of replicative, oncogene-induced, and drug-induced paracrine 'Bystander senescence'. *Aging (Albany NY)*. 2012 Dec 30
- Isonishi, S., Saitou, M., Yasuda, M., Tanaka, T. 2001, Mitochondria in platinum resistant cells, *Hum.Cell*, 14(3), pp. 203-210.
- INCA – Instituto Nacional do Câncer
<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>
- Inoue M, Sato EF, Nishikawa M, Park AM, Kira Y, Imada I, Utsumi K. 2003 Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr Med Chem*. 2003 Dec;10(23):2495-505. Review.
- Jakubowska, A., Gronwald, J., Górski, B., Huzarski, T., Byrski, T., Benner, A., Lubiński, J., Scott, R.J., Hamann, U., 2007, The 3' untranslated region C > T polymorphism of prohibitin is a breast cancer risk modifier in Polish women carrying a BRCA1 mutation. *Breast Cancer Res Treat*, 104(1):67-74.
- Jiang HY, Wek SA, McGrath BC, Scheuner D, Kaufman RJ, Cavener DR, Wek RC. 2003 Phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2 is required for activation of NF-kappaB in response to diverse cellular stresses. *Mol Cell Biol*. 2003 Aug;23(16):5651-63.

- Jing GJ, Xu DH, Shi SL, Li QF, Wang SY, Wu FY, Kong HY. 2010, Aberrant expression of nuclear matrix proteins during HMBA-induced differentiation of gastric cancer cells. *World J Gastroenterol*. 2010 May 7;16(17):2176-82.
- Johnson JL, Pillai S, Pernazza D, Sebti SM, Lawrence NJ, Chellappan SP. Regulation of Matrix Metalloproteinase Genes by E2F transcription factors: Rb-Raf-1 interaction as a novel target for metastatic disease. *Cancer Res*. 2011 Nov 15
- Jones, R.G., and Thompson, C.B. 2009, Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev*. 23, 537–548.
- Jordan MA, Thrower D, Wilson L. 1991 Mechanism of inhibition of cell proliferation by Vinca alkaloids. *Cancer Res*. 1991 Apr 15;51(8):2212-22.
- Jordan, M.A., Wilson, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer*. 2004 Apr;4(4):253-65.
- Jin R, Sun Y, Qi X, Zhang H, Zhang Y, Li N, Ding W, Chen D. E2F1 is involved in DNA single-strand break repair through cell-cycle-dependent upregulation of XRCC1 expression. *DNA Repair (Amst)*. 2011 Sep 5;10(9):926-33. Epub 2011 Jul 16.
- Johannessen CM, Boehm JS, Kim SY, Thomas SR, Wardwell L, Johnson LA, Emery CM, Stransky N, Cogdill AP, Barretina J, Caponigro G, Hieronymus H, Murray RR, Salehi-Ashtiani K, Hill DE, Vidal M, Zhao JJ, Yang X, Alkan O, Kim S, Harris JL, Wilson CJ, Myer VE, Finan PM, Root DE, Roberts TM, Golub T, Flaherty KT, Dummer R, Weber BL, Sellers WR, Schlegel R, Wargo JA, Hahn WC, Garraway LA. 2010, COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature*. 2010 Dec 16;468(7326):968-72.
- Johnson DG, Schwarz JK, Cress WD, Nevins JR. 1993 Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. *Nature*. 1993 Sep 23;365(6444):349-52.
- Jupe, E.R., Liu, X.T., Kiehlbauch, J.L., McClung, J.K., Dell'Orco, R.T., 1996, The 3' untranslated region of prohibitin and cellular immortalization. *Exp Cell Res*. 10;224(1), pp. 28-35.
- Kalluri R, Weinberg RA. 2009 The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009 Jun;119(6):1420-8.
- Kaplan FM, Shao Y, Mayberry MM, Aplin AE. 2011, Hyperactivation of MEK-ERK1/2 signaling and resistance to apoptosis induced by the oncogenic B-RAF inhibitor, PLX4720, in mutant N-RAS melanoma cells. *Oncogene*. 2011 Jan 20;30(3):366-71.

- Kathiria AS, Butcher LD, Feagins LA, Souza RF, Boland CR, Theiss AL. 2012, Prohibitin 1 modulates mitochondrial stress-related autophagy in human colonic epithelial cells. *PLoS One*. 2012;7(2):e31231.
- Kaye, F. J. 2002, RB and cyclin dependent kinase pathways: defining a distinction between RB and p16 loss in lung cancer, *Oncogene*, 21(45), pp. 6908-6914.
- Keenan J, Murphy L, Henry M, Meleady P, Clynes M. 2009, Proteomic analysis of multidrug-resistance mechanisms in adriamycin-resistant variants of DLKP, a squamous lung cancer cell line. *Proteomics*. Mar;9(6):1556-66.
- Kelland, L. R. 1993, New platinum antitumor complexes, *Crit Rev.Oncol.Hematol.*, 15(3), pp. 191-219.
- Kelland, L. R. 2000, A new resistance mechanism to cisplatin?, *Drug Resist.Updat.*, 3(3), pp. 139-141.
- Kelland, L. R., Mistry, P., Abel, G., Loh, S. Y., O'Neill, C. F., Murrer, B. A., Harrap, K. R. 1992, Mechanism-related circumvention of acquired cis-diamminedichloroplatinum(II) resistance using two pairs of human ovarian carcinoma cell lines by ammine/amine platinum(IV) dicarboxylates, *Cancer Res.*, 52(14), pp. 3857-3864.
- Kimura K, Wada A, Ueta M, Ogata A, Tanaka S, Sakai A, Yoshida H, Fushitani H, Miyamoto A, Fukushima M, Uchiumi T, Tanigawa N. 2010, Comparative proteomic analysis of the ribosomes in 5-fluorouracil resistance of a human colon cancer cell line using the radical-free and highly reducing method of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Int J Oncol*. Nov;37(5):1271-8.
- Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. 1997, Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 386, 761–763.
- Kool, M., de Haas, M., Scheffer, G. L., Scheper, R. J., van Eijk, M. J., Juijn, J. A., Baas, F., Borst, P. 1997, Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines, *Cancer Res.*, 57(16), pp. 3537-3547.
- Koumenis C, Naczki C, Koritzinsky M, Rastani S, Diehl A, Sonenberg N, Koromilas A, Wouters BG. 2002 Regulation of protein synthesis by hypoxia via activation of the endoplasmic reticulum kinase PERK and phosphorylation of the translation initiation factor eIF2 α . *Mol Cell Biol*. 2002 Nov;22(21):7405-16
- Kowaltowski AJ, Castilho RF, Grijalba MT, Bechara EJ, Vercesi AE. 1996 Effect of inorganic phosphate concentration on the nature of inner

- mitochondrial membrane alterations mediated by Ca^{2+} ions. A proposed model for phosphate-stimulated lipid peroxidation. *J Biol Chem.* 1996 Feb 9;271(6):2929-34.
- Langhorst, M. F., Reuter, A., Stuermer, C. A. 2005, Scaffolding microdomains and beyond: the function of reggie/flotillin proteins, *Cell Mol.Life Sci.*, 62(19-20), pp. 2228-2240.
- Li W, Melton DW. 2012, Cisplatin regulates the MAPK kinase pathway to induce increased expression of DNA repair gene ERCC1 and increase melanoma chemoresistance. *Oncogene.* 2012 May 10;31(19):2412-22. doi: 10.1038/onc.2011.426. Li L, Chen Y, Gibson SB.
- Li L, Chen Y, Gibson SB. 2013 Starvation-induced autophagy is regulated by mitochondrial reactive oxygen species leading to AMPK activation. *Cell Signal.* Jan;25(1):50-65. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.09.020.
- Liao D, Johnson RS. 2007 Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Ver* 2007;26:281–290.
- Lippens S, Hoste E, Vandenabeele P, Agostinis P, Declercq W. 2009 Cell death in the skin. *Apoptosis.* 2009 Apr;14(4):549-69. doi: 10.1007/s10495-009-0324-z. Review.
- Lee JH, Nguyen KH, Mishra S, Nyomba BL. 2010, Prohibitin is expressed in pancreatic beta-cells and protects against oxidative and proapoptotic effects of ethanol. *FEBS J.* 2010 Jan;277(2):488-500.
- Lee, J. M., Dedhar, S., Kalluri, R., Thompson, E. W. 2006, The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease, *J.Cell Biol.*, 172(7), pp. 973-981.
- Leith JT, Cook S, Chougule P, Calabresi P, Wahlberg L, Lindquist C, Epstein M. 1994, Intrinsic and extrinsic characteristics of human tumors relevant to radiosurgery: comparative cellular radiosensitivity and hypoxic percentages. *Acta Neurochir Suppl.* 1994;62:18-27. Review.
- Leone G, DeGregori J, Yan Z, Jakoi L, Ishida S, Williams RS, Nevins JR. 1998 E2F3 activity is regulated during the cell cycle and is required for the induction of S phase. *Genes Dev.* 1998 Jul 15;12(14):2120-30.
- Li, P. F., Dietz, R., von Harsdorf, R. 1999, p53 regulates mitochondrial membrane potential through reactive oxygen species and induces cytochrome c-independent apoptosis blocked by Bcl-2, *EMBO J.*, 18(21), pp. 6027-6036.
- Liao CC, Tsai CY, Chang WC, Lee WH, Wang JM. RB·E2F1 complex mediates DNA damage responses through transcriptional regulation of

- ZBRK1. *J Biol Chem*. 2010 Oct 22;285(43):33134-43. Epub 2010 Aug 16
- Lim R, Lappas M, Ahmed N, Permezel M, Quinn MA, Rice GE. 2011, 2D-PAGE of ovarian cancer: analysis of soluble and insoluble fractions using medium-range immobilized pH gradients. *Biochem Biophys Res Commun*. Mar 18;406(3):408-13.
- Lleo A, Invernizzi P, Selmi C, Coppel RL, Alpini G, Podda M, Mackay IR, Gershwin ME. Autophagy: highlighting a novel player in the autoimmunity scenario. *J Autoimmun*. 2007 Sep-Nov;29(2-3):61-8. Epub 2007 Aug 10.
- Liu, J., Deyoung, S. M., Zhang, M., Dold, L. H., Saltiel, A. R. 2005, The stomatin/prohibitin/flotillin/HflK/C domain of flotillin-1 contains distinct sequences that direct plasma membrane localization and protein interactions in 3T3-L1 adipocytes, *J.Biol.Chem.*, 280(16), pp. 16125-16134.
- Liu D, Lin Y, Kang T, Huang B, Xu W, Garcia-Barrio M, Olatinwo M, Matthews R, Chen YE, Thompson WE. 2012 Mitochondrial dysfunction and adipogenic reduction by prohibitin silencing in 3T3-L1 cells. *PLoS One*. 2012;7(3):e34315. doi: 10.1371/journal.pone.0034315.
- Lukashev D, Ohta A, Sitkovsky M. 2007 Hypoxia-dependent anti-inflammatory pathways in protection of cancerous tissues. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26:273–279.
- Luo, J., Nikolaev, A. Y., Imai, S., Chen, D., Su, F., Shiloh, A., Guarente, L., Gu, W. 2001, Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress, *Cell*, 107(2), pp. 137-148.
- Liu X, Ren Z, Zhan R, Wang X, Wang X, Zhang Z, Leng X, Yang Z, Qian L. 2009, Prohibitin protects against oxidative stress-induced cell injury in cultured neonatal cardiomyocyte. *Cell Stress Chaperones*. 2009 May;14(3):311-9
- Ma Y, Hendershot LM. 2004 The role of the unfolded protein response in tumour development: friend or foe? *Nat Rev Cancer*. Dec;4(12):966-77. Review.
- Maimon E, Hubbi, Weibo Luo, Jin H. Baek, Gregg L. Semenza 2011 MCM Proteins Are Negative Regulators of Hypoxia-Inducible Factor 1 *Mol Cell*. 2011 June 10; 42(5): 700–712.
- Manjeshwar, S., Branam, D.E., Lerner, M.R., Brackett, D.J., Jupe, E.R., 2003, Tumor suppression by the prohibitin gene 3'untranslated region RNA in human breast cancer. *Cancer Res*, 1;63(17), pp. 5251-6.

- Marciniak SJ, Yun CY, Oyadomari S, Novoa I, Zhang Y, Jungreis R, Nagata K, Harding HP, Ron D. 2004, CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* 2004 Dec 15;18(24):3066-77.
- Martins, N. M., Santos, N. A., Curti, C., Bianchi, M. L., Santos, A. C. 2008, Cisplatin induces mitochondrial oxidative stress with resultant energetic metabolism impairment, membrane rigidification and apoptosis in rat liver, *J.Appl.Toxicol.*, 28(3), pp. 337-344.
- Maryanovich M, Gross A. 2013 A ROS rheostat for cell fate regulation. *Trends Cell Biol.* Mar;23(3):129-34.
- Maser RS, Mirzoeva OK, Wells J, Olivares H, Williams BR, Zinkel RA, Farnham PJ, Petrini JH. 2001 Mre11 complex and DNA replication: linkage to E2F and sites of DNA synthesis. *Mol Cell Biol.* 2001 Sep;21(17):6006-16.
- Maverakis E, Miyamura Y, Bowen MP, Correa G, Ono Y, Goodarzi H. 2010 Light, including ultraviolet. *J Autoimmun.* 2010 May;34(3):J247-57. doi: 10.1016/j.jaut.2009.11.011.
- McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ. 2001, Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol.* Feb;21(4):1249-59.
- Menssen A, Hermeking H. 2002, Characterization of the c-MYC-regulated transcriptome by SAGE: identification and analysis of c-MYC target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Apr 30;99(9):6274-9.
- Merkwirth C, Dargazanli S, Tatsuta T, Geimer S, Löwer B, Wunderlich FT, von Kleist-Retzow JC, Waisman A, Westermann B, Langer T. 2008, Prohibitins control cell proliferation and apoptosis by regulating OPA1-dependent cristae morphogenesis in mitochondria. *Genes Dev.* 2008 Feb 15;22(4):476-88.
- Milani M, Rzymiski T, Mellor HR, Pike L, Bottini A, Generali D, Harris AL. 2009 The role of ATF4 stabilization and autophagy in resistance of breast cancer cells treated with Bortezomib. *Cancer Res.* May 15;69(10):4415-23.
- Min NY, Kim JH, Choi JH, Liang W, Ko YJ, Rhee S, Bang H, Ham SW, Park AJ, Lee KH. 2012 Selective death of cancer cells by preferential induction of reactive oxygen species in response to (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 Apr 27;421(1):91-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.03.120.

- Miyajima A, Nakashima J, Yoshioka K, Tachibana M, Tazaki H, Murai M. 1997 Role of reactive oxygen species in cis-dichlorodiammineplatinum-induced cytotoxicity on bladder cancer cells. *Br J Cancer*. 1997;76(2):206-10.
- Moeller BJ, Richardson RA, Dewhirst MW. 2007 Hypoxia and radiotherapy: opportunities for improved outcomes in cancer treatment. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26:241–248.
- Mouawad R, Sebert M, Michels J, Bloch J, Spano JP, Khayat D. 2010 Treatment for metastatic malignant melanoma: old drugs and new strategies. *rit Rev Oncol Hematol*. 2010 Apr;74(1):27-39. doi: 10.1016/j.critrevonc.2009.08.005.
- Muraguchi T, Kawawa A, Kubota S. 2010, Prohibitin protects against hypoxia-induced H9c2cardiomyocyte cell death. *Biomed Res*. 2010 Apr;31(2):113-22.
- Nazarian R, Shi H, Wang Q, Kong X, Koya RC, Lee H, Chen Z, Lee MK, Attar N, Sazegar H, Chodon T, Nelson SF, McArthur G, Sosman JA, Ribas A, Lo RS. 2010, Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature*. 2010 Dec 16;468(7326):973-7.
- NCI - National Cancer Institute
<http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/melanoma/HealthProfessional/page9>
- Nevins JR. 1998 Toward an understanding of the functional complexity of the E2F and retinoblastoma families. *Cell Growth Differ*. 1998 Aug;9(8):585-93. Review.
- Nijtmans, L. G., de Jong, L., Artal, S. M., Coates, P. J., Berden, J. A., Back, J. W., Muijsers, A. O., van der, S. H., Grivell, L. A. 2000, Prohibitins act as a membrane-bound chaperone for the stabilization of mitochondrial proteins, *EMBO J.*, 19(11), pp. 2444-2451.
- Nishigori C. 2006 Cellular aspects of photocarcinogenesis. *Photochem Photobiol Sci*. 2006 Feb;5(2):208-14. Epub 2005 Dec 1. Review.
- Nishimura K, Ishiai M, Horikawa K, Fukagawa T, Takata M, Takisawa H, Kanemaki MT. 2012 Mcm8 and Mcm9 form a complex that functions in homologous recombination repair induced by DNA interstrand crosslinks. *Mol Cell*. Aug 24;47(4):511-22. doi: 10.1016/j.molcel.2012.05.047. Epub 2012 Jul 5.
- Oliva CR, Moellering DR, Gillespie GY, Griguer CE. 2011 Acquisition of chemoresistance in gliomas is associated with increased

- mitochondrial coupling and decreased ROS production. *PLoS One*. 2011;6(9):e24665
- Peng X, Mehta R, Wang S, Chellappan S, Mehta RG. 2006, Prohibitin is a novel target gene of vitamin D involved in its antiproliferative action in breast cancer cells. *Cancer Res*. 2006 Jul 15;66(14):7361-9.
- Peng X, Mehta RG. 2007, Differential expression of prohibitin is correlated with dual action of Vitamin D as a proliferative and antiproliferative hormone in breast epithelial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2007 Mar;103(3-5):446-50.
- Pinto, A. L., Lippard, S. J. 1985, Sequence-dependent termination of in vitro DNA synthesis by cis- and trans-diamminedichloroplatinum (II), *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 82(14), pp. 4616-4619.
- Polager S, Kalma Y, Berkovich E, Ginsberg D. 2002 E2Fs up-regulate expression of genes involved in DNA replication, DNA repair and mitosis. *Oncogene*. 2002 Jan 17;21(3):437-46.
- Pollock, P. M., Meltzer, P. S. 2002, A genome-based strategy uncovers frequent BRAF mutations in melanoma, *Cancer Cell*, 2(1), pp. 5-7.
- Preston, T. J., Abadi, A., Wilson, L., Singh, G. 2001, Mitochondrial contributions to cancer cell physiology: potential for drug development, *Adv.Drug Deliv.Rev.*, 49(1-2), pp. 45-61.
- Qi Y, Chiu JF, Wang L, Kwong DL, He QY. 2005, Comparative proteomic analysis of esophageal squamous cell carcinoma. *Proteomics*. 2005 Jul;5(11):2960-71.
- Qin H, Liu T, Yang JL, Huang X, Liu B, Song X, Zhao X, Wei YQ. 2006, [Analysis of differential protein expression profile between retinoic acid resistant and sensitive acute promyelocytic leukemia cells]. *Ai Zheng*. 2006 Jul;25(7):828-32.
- Rajalingam, K., Wunder, C., Brinkmann, V., Churin, Y., Hekman, M., Sievers, C., Rapp, U. R., Rudel, T. 2005, Prohibitin is required for Ras-induced Raf-MEK-ERK activation and epithelial cell migration, *Nat.Cell Biol.*, 7(8), pp. 837-843.
- Rambold AS, Kostecky B, Elia N, Lippincott-Schwartz J. 2011 Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrientstarvation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jun 21;108(25):10190-5. doi: 10.1073/pnas.1107402108.
- Rastogi, S., Joshi, B., Fusaro, G., Chellappan, S. 2006, Camptothecin induces nuclear export of prohibitin preferentially in transformed cells through a CRM-1-dependent mechanism, *J.Biol.Chem.*, 281(5), pp. 2951-2959.

- Reichrath J, Rech M, Moeini M, Meese E, Tilgen W, Seifert M. 2007 In vitro comparison of the vitamin D endocrine system in 1,25(OH)₂D₃-responsive and -resistant melanoma cells. *Cancer Biol Ther.* Jan;6(1):48-55.
- Reid JM, Kuffel MJ, Miller JK, Rios R, Ames MM. 1999 Metabolic activation of dacarbazine by human cytochromes P450: the role of CYP1A1, CYP1A2, and CYP2E1. *Clin Cancer Res.* 1999 Aug;5(8):2192-7.
- Richon, V. M., Schulte, N., Eastman, A. 1987, Multiple mechanisms of resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II) in murine leukemia L1210 cells, *Cancer Res.*, 47(8), pp. 2056-2061.
- Rizwani, W., Alexandrow, M., Chellappan, S. 2009, Prohibitin physically interacts with MCM proteins and inhibits mammalian DNA replication. *Cell Cycle.* May 15;8(10):1621-9. Epub 2009 May 27.
- Romero-Ramirez L, Cao H, Nelson D, Hammond E, Lee AH, Yoshida H, Mori K, Glimcher LH, Denko NC, Giaccia AJ, Le QT, Koong AC. 2004, XBP1 is essential for survival under hypoxic conditions and is required for tumor growth. *Cancer Res.* Sep 1;64(17):5943-7.
- Ron, D. & Walter, P., 2007 Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 519–529
- Roos WP, Kaina B. 2006 DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med.* 2006 Sep;12(9):440-50. Epub 2006 Aug 8. Review.
- Sala E, Mologni L, Truffa S, Gaetano C, Bollag GE, Gambacorti-Passerini C. 2008, BRAF silencing by short hairpin RNA or chemical blockade by PLX4032 leads to different responses in melanoma and thyroid carcinoma cells. *Mol Cancer Res.* 2008 May;6(5):751-9.
- Santos, C.X., Tanaka, L.Y., Wosniak, J., Laurindo, F.R. 2009, Mechanisms and implications of reactive oxygen species generation during the unfolded protein response: roles of endoplasmic reticulum oxidoreductases, mitochondrial electron transport, and NADPH oxidase. *Antioxid Redox Signal* Oct;11(10):2409-27.
- Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Kim, D. H., Guertin, D. A., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Sabatini, D. M. 2004, Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton, *Curr.Biol.*, 14(14), pp. 1296-1302.

- Sato, T., Saito, H., Swensen, J., Olifant, A., Wood, C., Danner, D., Sakamoto, T., Takita, K., Kasumi, F., Miki, Y., . 1992, The human prohibitin gene located on chromosome 17q21 is mutated in sporadic breast cancer, *Cancer Res.*, 52(6), pp. 1643-1646.
- Schleicher M, Shepherd BR, Suarez Y, Fernandez-Hernando C, Yu J, Pan Y, Acevedo LM, Shadel GS, Sessa WC. 2008, Prohibitin-1 maintains the angiogenic capacity of endothelial cells by regulating mitochondrial function and senescence. *J Cell Biol.* 2008 Jan 14;180(1):101-12.
- Schwarz T, Schwarz A. 2009 DNA repair and cytokine responses. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2009 Aug;14(1):63-6. doi: 10.1038/jidsymp.2009.3. Review.
- Shapiro, G. I., Harper, J. W. 1999, Anticancer drug targets: cell cycle and checkpoint control, *J.Clin.Invest*, 104(12), pp. 1645-1653.
- Sharma, A., Qadri, A. 2004, Vi polysaccharide of *Salmonella typhi* targets the prohibitin family of molecules in intestinal epithelial cells and suppresses early inflammatory responses, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 101(50), pp. 17492-17497.
- Sharma, P., Varma, R., Sarasij, R. C., Ira, Gousset, K., Krishnamoorthy, G., Rao, M., Mayor, S. 2004, Nanoscale organization of multiple GPI-anchored proteins in living cell membranes, *Cell*, 116(4), pp. 577-589.
- Sharpless, N. E., Kannan, K., Xu, J., Bosenberg, M. W., Chin, L. 2003, Both products of the mouse *Ink4a/Arf* locus suppress melanoma formation in vivo, *Oncogene*, 22(32), pp. 5055-5059.
- Shi H, Kong X, Ribas A, Lo RS. 2011, Combinatorial treatments that overcome PDGFR β -driven resistance of melanoma cells to V600EB-RAF inhibition. *Cancer Res.* 2011 Aug 1;71(15):5067-74.
- Shi, L., Nishioka, W. K., Th'ng, J., Bradbury, E. M., Litchfield, D. W., Greenberg, A. H. 1994, Premature p34cdc2 activation required for apoptosis, *Science*, 263(5150), pp. 1143-1145.
- Shim E, Lee YS, Kim HY, Jeoung D. 2007 Down-regulation of c-FLIP increases reactive oxygen species, induces phosphorylation of serine/threonine kinase Akt, and impairs motility of cancer cells. *Biotechnol Lett* Jan;29(1):141-7.
- Siddik, Z. H. 2003, Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance, *Oncogene*, 22(47), pp. 7265-7279.
- Singh S, Bora-Singhal N, Kroeger J, Laklai H, Chellappan SP. 2013 β Arrestin-1 and Mcl-1 Modulate Self-Renewal Growth of Cancer Stem-Like Side-Population Cells in Non-Small Cell Lung Cancer. *PLoS One.*;8(2):e55982

- Skobe, M., Fusenig, N. E. 1998, Tumorigenic conversion of immortal human keratinocytes through stromal cell activation, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 95(3), pp. 1050-1055.
- Sorenson, C. M., Eastman, A. 1988, Influence of cis-diamminedichloroplatinum(II) on DNA synthesis and cell cycle progression in excision repair proficient and deficient Chinese hamster ovary cells, *Cancer Res.*, 48(23), pp. 6703-6707.
- Sporn, M. B. 1996, The war on cancer, *Lancet*, 347(9012), pp. 1377-1381.
- Sripathi SR, He W, Atkinson CL, Smith JJ, Liu Z, Elledge BM, Jahng WJ. 2011, Mitochondrial-nuclear communication by prohibitin shuttling under oxidative stress. *Biochemistry*. 2011 Oct 4;50(39):8342-51.
- Srisomsap C, Subhasitanont P, Otto A, Mueller EC, Punyarit P, Wittmann-Liebold B, Svasti J. 2002, Detection of cathepsin B up-regulation in neoplastic thyroid tissues by proteomic analysis. *Proteomics*. Jun;2(6):706-12.
- Strub GM, Paillard M, Liang J, Gomez L, Allegood JC, Hait NC, Maceyka M, Price MM, Chen Q, Simpson DC, Kordula T, Milstien S, Lesnefsky EJ, Spiegel S. 2011, Sphingosine-1-phosphate produced by sphingosine kinase 2 in mitochondria interacts with prohibitin 2 to regulate complex IV assembly and respiration. *FASEB J*. 2011 Feb;25(2):600-12
- Suzuki S, Kurata M, Abe S, Miyazawa R, Murayama T, Hidaka M, Yamamoto K, Kitagawa M. 2012, Overexpression of MCM2 in myelodysplastic syndromes: association with bone marrow cell apoptosis and peripheral cytopenia. *Exp Mol Pathol*. 2012 Feb;92(1):160-6. doi: 10.1016/j.yexmp.2011.11.003.
- Swietach P, Vaughan-Jones RD, Harris AL. 2007 Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26:299–310.
- Takata H, Matsunaga S, Morimoto A, Ma N, Kurihara D, Ono-Maniwa R, Nakagawa M, Azuma T, Uchiyama S, Fukui K. 2007, PHB2 protects sister-chromatid cohesion in mitosis. *Curr Biol*. Aug 7;17(15):1356-61.
- Teng, M.W.L., Swann, J.B., Koebel, C.M., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. 2008, Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. *J. Leukoc. Biol*. 84, 988–993.
- Terashima, M., Kim, K. M., Adachi, T., Nielsen, P. J., Reth, M., Kohler, G., Lamers, M. C. 1994, The IgM antigen receptor of B lymphocytes is associated with prohibitin and a prohibitin-related protein, *EMBO J.*, 13(16), pp. 3782-3792.
- Theiss AL, Idell RD, Srinivasan S, Klapproth JM, Jones DP, Merlin D, Sitaraman SV. 2007, Prohibitin protects against oxidative stress

- in intestinalepithelial cells. *FASEB J.* 2007 Jan;21(1):197-206. Epub 2006 Nov 29.
- Ushio-Fukai, M. 2006, Localizing NADPH oxidase-derived ROS, *Sci.STKE.*, 2006(349), p. re8.
- Vajdic, C.M., and van Leeuwen, M.T. 2009, Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation. *Int. J. Cancer* 125, 1747–1754.
- Varner, J. A., Cheresh, D. A. 1996, Integrins and cancer, *Curr.Opin.Cell Biol.*, 8(5), pp. 724-730.
- Vaziri, H., Dessain, S. K., Ng, E. E., Imai, S. I., Frye, R. A., Pandita, T. K., Guarente, L., Weinberg, R. A. 2001, hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase, *Cell*, 107(2), pp. 149-159.
- Wang D, Russell JL, Johnson DG. 2000 E2F4 and E2F1 have similar proliferative properties but different apoptotic and oncogenic properties in vivo. *Mol Cell Biol.* 2000 May;20(10):3417-24.
- Wang S, Nath N, Adlam M, Chellappan S. 1999 Prohibitin, a potential tumor suppressor, interacts with RB and regulates E2F function. *Oncogene.* 1999 Jun 10;18(23):3501-10.
- Wang, S., Zhang, B., Faller, D. V. 2002, Prohibitin requires Brg-1 and Brm for the repression of E2F and cell growth, *EMBO J.*, 21
- Warburg, O.H. 1930. *The Metabolism of Tumours: Investigations from the Kaiser Wilhelm Institute for Biology, Berlin-Dahlem* (London, UK: Arnold Constable). (12), pp. 3019-3028.
- Warburg, O. 1956a, On the origin of cancer cells. *Science* 123, 309–314.
- Warburg, O. 1956b, On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124, 269–270.
- Weinberg, R. A. 1995, The retinoblastoma protein and cell cycle control, *Cell*, 81(3), pp. 323-330.
- Werb, Z. 1997, ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology., *Cell*, 91, pp. 439-442
- Xie Y, Tang E, Ren B, Feng L. 2010, Overexpression of S-adenosylhomocysteine hydrolase and down-regulation of prohibitin and c-Myc binding protein in the human esophageal squamous cell line HEEC exposed to N-nitrosomethylbenzylamine. *Mol Med Report.* May-Jun;3(3):503-8
- Yang H, Higgins B, Kolinsky K, Packman K, Go Z, Iyer R, Kolis S, Zhao S, Lee R, Grippo JF, Schostack K, Simcox ME, Heimbrook D, Bollag G,

- Su F. 2010, RG7204 (PLX4032), a selective BRAFV600E inhibitor, displays potent antitumor activity in preclinical melanoma models. *Cancer Res.* 2010 Jul 1;70(13):5518-27. Epub 2010 Jun 15. Erratum in: *Cancer Res.* 2010 Nov 15;70(22):9527.
- Yu F, Zhu X, Feng C, Wang T, Hong Q, Liu Z, Tang S. 2011, Proteomics-based identification of spontaneous regression-associated proteins in neuroblastoma. *J Pediatr Surg.* Oct;46(10):1948-55.
- Zhang G, Wang Y, Zhang Y, Wan X, Li J, Liu K, Wang F, Liu K, Liu Q, Yang C, Yu P, Huang Y, Wang S, Jiang P, Qu Z, Luan J, Duan H, Zhang L, Hou A, Jin S, Hsieh TC, Wu E. 2012 Anti-cancer activities of tea epigallocatechin-3-gallate in breast cancer patients under radiotherapy. *Curr Mol Med.* 2012 Feb;12(2):163-76.
- Zhao P, Zhong W, Ying X, Yao B, Yuan Z, Fu J, Zhou Z. 2010, Comparative proteomic analysis of anti-benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide-transformed and normal human bronchial epithelial G0/G1 cells. *Chem Biol Interact.* 2010 Jul 30;186(2):166-73.
- Zhou TB, Qin YH, Li ZY, Xu HL, Zhao YJ, Lei FY. 2012 All-trans retinoic Acid treatment is associated with prohibitin expression in renal interstitial fibrosis rats. *Int J Mol Sci.* 2012;13(3):2769-82. doi: 10.3390/ijms13032769

FIGURAS SUPLEMENTARES

Fig. Suplementar S1 Fase G1 do ciclo celular na linhagem de melanoma humano LB373 após tratamento com 25 μ M de cisplatina (CIS) por 24h na presença de siRNA contra proibitina (PHB). Controle (ctl)

Fig. Suplementar S2 Fase G1 do ciclo celular na linhagem de melanoma humano LB373 após tratamento com 1mg/ml de Tunicamicina (TUN) por 24h na presença de siRNA contra proibitina (PHB). Controle (ctl)

Fig. Suplementar S3 Inibição parcial de proibitina por siRNA confere sensibilização à cisplatina nas linhagens LB373 e Mel 85. *O knock-down* parcial de PHB impede sua superexpressão após tratamento com cisplatina nas linhagens LB373 (S3a) e Mel 85 (S3c). A perda da capacidade de superexpressão de proibitina é suficiente para a sensibilização das linhagens LB373 e Mel85 ao tratamento com cisplatina (S3b e S3d, respectivamente).

Fig. Suplementar S4 Sensibilização da linhagem LB373 ao tratamento com cisplatina após inibição de proibitina.

Expressão e Localização de β -Catenina

Fig. Suplementar S5 Localização subcelular de β -Catenina nas linhagens LB373, Mel 85 e SKMel 37 após inibição de proibitina

Fig. Suplementar S6 Expressão de Proibitina ao longo do desenvolvimento do melanoma. Análise de Tissue Microarray, por Raphael Salles. Dados não publicados.

Fig. Suplementar S7 Degradação da matriz de colágeno pelas linhagens de melanoma humano 624 e SKMel 02 após inibição de proibitina

Fig. Suplementar S8 Expressão de Vimentina após inibição de proibitina, na linhagem A549. **(a)** Expressão proteica de vimentina após inibição de proibitina por siRNA. **(b)** atividade de luciferase do promotor de vimentina após transfecção de E2F1 ou cotransfecção de E2F1 e Proibitina (PHB). **(c)** microscopia confocal mostrando o aumento de expressão de vimentina após inibição de proibitina.

Fig. Suplementar S9 Expressão de E-caderina e N-caderina, por Real Time PCR, após inibição de proibitina na linhagem de câncer de pulmão A549

APÊNDICE

Chapter 4

Melanoma Genetics: From Susceptibility to Progression

Guilherme Francisco, Priscila Daniele Ramos Cirilo,
Fernanda Toledo Gonçalves,
Tharcísio Citrângulo Tortelli Junior and
Roger Chammas

Additional information is available at the end of the chapter

<http://dx.doi.org/10.5772/54143>

1. Introduction

Melanoma genetics has been for a long time a great challenge to cancer biologists, in part due to a complete lack of a single candidate gene to melanoma development. Different from breast and colorectal cancers, where BRCA-1/2 and APC/mismatch repair genes, respectively, characterize familial clusters of cancer susceptibility (reaching penetrance rates as high as 90% in some cases), in melanomas, the mutation rate of the most commonly altered genes associated with disease progression do not exceed 60% of the cases in familial clusters. Among the “classical melanoma genes” are those coded at the *CDKN2A* locus (coding for p14 and p16, both related to cell cycle arrest), BRAF (specially the V600E mutation), a downstream transducer of the RAS signaling pathway and critical for the cellular response to growth signals, and mutations in NRAS, somewhat related to initiation and progression of melanoma.

However, alterations in those genes, either by mutations or by epigenetic alterations do not account for all melanoma cases. Moreover, the mutations found in the classical melanoma genes are not typical UV signature mutations (such as C to T transitions). This observation poses an interesting problem in melanoma biology. Extensive epidemiological data indicates that intermittent exposure to UV radiation, mainly UVB is a major etiologic factor for melanoma development. On the other hand, genes commonly mutated in melanomas lack UV signature mutations. Thus, evidence so far for the presence of UVB-generated signature mutations in melanoma that could be defined as driver mutations has been less than compelling. Two critical questions need therefore to be answered; (1) If the classical melanoma genes do not account for the majority of cases, what other

Polymorphisms in the *p27^{kip-1}* and *prohibitin* genes denote novel genes associated with melanoma risk in Brazil, a high ultraviolet index region

Guilherme Francisco^{a,f,*}, Fernanda T. Gonçalves^{b,*}, Olinda C. Luiz^c, Renata F. Saito^{a,f}, Rodrigo A. Toledo^d, Tomoko Sekiya^d, Tharcisio C. Tortelli Jr.^{a,f}, Esther D.V.B. Viola^{a,f}, Tatiane K. Furuya Mazzotti^{a,f}, Priscila D.R. Cirilo^{a,f}, Cyro Festa-Neto^e, José A. Sanches^e, Gilka J.F. Gattás^b, José Eluf-Neto^c and Roger Chammas^{a,f}

Ultraviolet (UV) radiation is a major environmental risk factor to the development of cutaneous melanoma as it induces pyrimidine dimers in DNA. Genes that exert their function by arresting the cell cycle are critical to avoid carcinogenic mutations, allowing the processing of DNA repair systems. This study was carried out to evaluate the role of polymorphisms in cell cycle genes such as *TP53*, *p27^{kip-1}*, *CDKN2A*, *prohibitin*, and *GADD153* in melanoma risk as well as their influence on known risk factors in a high UV index region. A hospital-based case-control study was carried out in Brazil to evaluate the contribution of polymorphisms in cell cycle genes toward melanoma risk. The study comprised 202 melanoma patients and 210 controls. The polymorphisms analyzed were *TP53* Arg72Pro, *p27^{kip-1}* Val109Gly, *GADD153* Phe10Phe (rs697221), *CDKN2A* 3'UTR C540G, and *prohibitin* 3'UTR C1703T. As regards, *p27^{kip-1}* Val109Gly, both heterozygous and homozygous Gly genotypes were shown to be protective genotypes on calculating both crude and adjusted odds ratios (ORs) for age, sex, and educational level [OR 0.37; 95% confidence interval (CI) 0.16–0.87; $P < 0.05$]. Similarly, the *prohibitin* TT genotype increased melanoma risk in the crude and adjusted analyses (OR 2.40; 95% CI 1.10–5.26; $P < 0.05$). The *p27^{kip-1}* Gly protective genotype decreased the risk for melanoma in a stratified analysis of the known risk factors such as hair and eye color, sunburns, pigmented lesions, and

European ancestry. The *prohibitin* TT genotype increased the risk of melanoma by such host factors. Our results showed for the first time that polymorphisms in *p27^{kip-1}* Val109Gly and in *prohibitin* 3'UTR C1703T genotypes modulate the risk to melanoma in a high UV index region. *Melanoma Res* 00:000–000 © 2013 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins.

Melanoma Research 2013, 00:000–000

Keywords: case-control, melanoma, p27, polymorphism, prohibitin

^aExperimental Oncology Laboratory, Medical Investigation Laboratory, Unit 24, Department of Radiology, ^bMedical Investigation Laboratory, Unit 40, Department of Legal Medicine, Medical Ethics, Social and Occupational Medicine, ^cMedical Investigation Laboratory, Unit 38, Department of Preventive Medicine, ^dEndocrine Genetics Unit, Medical Investigation Laboratory, Unit 25, Department of Internal Medicine, Endocrinology, ^eDepartment of Dermatology and ^fCenter for Translational Oncology, São Paulo State Cancer Institute (ICESP), School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Correspondence to Roger Chammas, MD, PhD, Center for Translational Oncology – São Paulo State Cancer Institute (ICESP), School of Medicine, University of São Paulo, Av. Dr. Arnaldo 251, 8th Floor, São Paulo 01246-000, Brazil
Tel: +55 11 3893 3549; fax: +55 11 3893 3024;
e-mail: rchammas@lim24.fm.usp.br

*Guilherme Francisco and Fernanda T. Gonçalves contributed equally to the writing of this article.

All supplementary digital content is available directly from the corresponding author.

Received 31 July 2012 Accepted 10 March 2013

Introduction

Sun exposure is a major environmental factor to the development of melanomas and nonmelanoma skin cancers. Its carcinogenic potential is related to the exposure to ultraviolet B (UVB) light (290–320 nm), because of its ability to cause DNA damage through the formation of pyrimidine dimers directly in addition to the induction of reactive oxygen species [1]. DNA damage leads to diverse cellular responses such as activation of DNA repair systems and/or induction of senescence or

apoptosis in a case of repair failure [2]. However, for either fate of the cell after DNA damage, cell cycle arrest is a critical step. Such an arrest may occur during the transition from the G1 to S phase, G2 phase to mitosis, or even during mitotic phases.

Several proteins act in cell cycle arrest and are related to cancer development, such as p53, p27^{kip-1}, p21, p16, and p14 (both coded from *CDKN2A* locus), and most of them are related to the p53 pathway [3]. Cell cycle arrest proteins are critical to melanoma development and are frequently mutated in familial and sporadic melanomas, for example, p16 [4], p27^{kip-1} [5], and p53 proteins [6].

All supplementary digital content is available directly from the corresponding author.

Other less known genes such as those from the *GADD* family (growth arrest and DNA damage) and *prohibitin* may also be related to cell cycle arrest control. Both may act in control of cell cycle arrest: the *GADD* genes may suppress cell growth and activate DNA repair [7], whereas prohibitin interacts with the E2F-1 pathway and MCM replication proteins [8,9].

These genes are related to melanoma initiation and progression [3]. Nevertheless, little is known about genetic polymorphisms in these genes and their contribution toward melanoma carcinogenesis. Polymorphisms in *TP53* and *GADD153* have already been related to melanoma [10,11]. Similarly, polymorphisms in *prohibitin* [12] and *p27^{kip-1}* [13] have already been related to cancer development; however, there is lack of information on their contribution toward melanoma risk. A recent case-control study carried out in Brazil (a high UV index region) indicated an increased melanoma risk attributed to polymorphisms in DNA repair genes [14], suggesting that in such areas, polymorphisms in genes critical in cancer may impact melanoma development. Therefore, we aimed to perform an extension of that study, analyzing the impact of polymorphic variants of cell cycle-related genes on melanoma development.

Methods

We carried out a hospital-based case-control study in Brazil, including 202 melanoma patients and 210 controls. The participants were recruited between October 2004 and July 2008 from Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (FMUSP), Hospital do Câncer AC Camargo, and Instituto Brasileiro de Controle do Câncer (IBCC). All patients had histopathological confirmation of cutaneous melanoma. The control group comprised age-matched and sex-matched cancer-free individuals recruited from FMUSP. A more detailed description of the characteristics of patients and controls has been reported previously elsewhere [14,15].

All patients signed an informed consent form before being included into the study. Individuals who agreed to participate were interviewed using a standardized questionnaire that included information on sociodemographic data (age, sex, and educational level), host characteristics (e.g. color of skin, eyes, and hair), history of sun exposure (number of sunburns in childhood and adolescence), the Fitzpatrick's sun-reactive skin type, and European ancestry (origin of the grandparents). Medical data including a history of having undergone pigmented lesion removal (answering 'yes' or 'no') as well as the density of freckles (categorized as 'any/rare' or 'few/many') were also obtained. Such variables were previously identified as critical risk factors for melanoma [14]. Blood samples were also collected from the individuals.

Genomic DNA for genotyping of cell cycle genes was isolated from leukocytes, as described previously [14].

Genotyping was performed using PCR-RFLP. The gene variants studied were: *TP53* Arg72Pro (rs1042522), *p27^{kip-1}* Val109Gly (rs2066827), *GADD153* Phe10Phe C to T exchange (rs697221), *CDKN2A* 3'UTR C540G (rs11515), and *prohibitin* 3'UTR C1703T. We selected polymorphisms in genes critical to melanoma that had a variant allele frequency higher than 20% and which could be genotyped by PCR-RFLP and resulted in nonsynonymous changes or are located in critical regions of the gene. Sequencing of the *p27^{kip-1}* Val109Gly polymorphism in all samples was used to confirm the results. Results pertaining to *p27^{kip-1}* Val109Gly were also confirmed using an independent set of 370 healthy individuals. Details of the used primers and the PCR-RFLP method are listed in Table 1. Genotyping details can be found in our previous report [14].

To estimate the risk of melanoma associated with selected factors, odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (95% CIs) were calculated as approximations of relative risk using unconditional logistic regression analysis. All ORs were adjusted by multivariate logistic regression analysis for the sociodemographic status (age, sex, and educational level) [14]. To test the statistical significance of gene-host factors, we used a stratification analysis comprising a dominant genetic model for genotypes and dichotomized host factors. Hardy-Weinberg equilibrium was used to estimate the difference between the observed and expected genotype frequencies by using Monte Carlo's goodness-of-fit test on the control group. All tests were two-sided and were performed using the STATA 9.1 Software (StataCorp, College Station, Texas, USA). Complete details of the statistical analyses have also been described in a previous report [14].

Results

A total of 210 cancer-free controls (49% males) and 202 melanoma patients (50% males) were included in this study. The mean age $\pm$ SD was 51.7 ± 14.3 and 48.2 ± 14.8 years for patients and controls, respectively. No differences in terms of sex and age were observed between the groups ($P > 0.05$). Details on the T category criteria, Breslow's thickness, and Clark's levels have been described in a previous report [14]. The analyzed host factors indicated hair and eye color, number of freckles, phototype, history of sunburns, history of pigmented lesion removal, and European ancestry as being risk factors to melanoma [14].

The genotypes of the cell cycle genes *TP53* Arg72Pro, *p27^{kip-1}* Val109Gly, *GADD153* Phe10Phe C to T exchange (rs697221), *CDKN2A* 3'UTR C540G, and *prohibitin* 3'UTR C1703T and their association with the risk of melanoma are shown in Table 1. Except for *CDKN2A* polymorphism ($P = 0.006$), no deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium was observed for any genotype.

Table 1 Genotype and allele frequencies for gene polymorphisms and associated odds ratios for melanoma risk

SNPs	Patients ^a [N (%)]	Controls ^a [N (%)]	Crude OR (95% CI)	P	Adjusted OR (95% CI) ^b	P	Primers (5'→3')	Restriction enzyme
53 (Arg72Pro)								
Arg/Arg	84 (44.4)	86 (41.4)	1.00	—	1.00	—	F-GTCCAGCAATGGATGATT R-CAGGATTGAAGTCTCATGG	BstUI Arg 313 Pro 205/108
Arg/Pro	80 (42.3)	88 (42.3)	0.93 (0.61–1.43)	0.742	0.95 (0.61–1.50)	0.854		
Pro/Pro	25 (13.2)	34 (16.4)	0.75 (0.41–1.37)	0.352	0.74 (0.39–1.38)	0.363		
Pro allele	0.34	0.38	—	—	—	—		
27 ^{Kip-1} (Val16Gly)								
Val/Val	99 (53.8)	66 (38.2)	1.00	—	1.00	—	F-GTCGGGGTCTGTGCTTTTG R-GCCAGGTAGCACTGAACACC	BglII Val 761 Gly 564/198
Val/Gly	75 (40.8)	86 (49.7)	0.58 (0.37–0.90)	0.016	0.60 (0.38–0.95)	0.035		
Gly/Gly	10 (5.4)	21 (12.1)	0.32 (0.14–0.72)	0.006	0.37 (0.16–0.87)	0.022		
Gly allele	0.26	0.37	—	—	—	—		
prohibitin 3'UTR (C1703T)								
CC	86 (44.33)	104 (50.0)	1.00	—	1.00	—	F-TGAAGGATTGCATCTGCTGGGGCTG R-ACATTTGTTTCTTCCACAGTG	BmgBI C 85/43 T 128
CT	83 (42.78)	91 (43.75)	1.10 (0.73–1.67)	0.641	1.34 (0.85–2.11)	0.215		
TT	25 (12.89)	13 (6.25)	2.33 (1.12–4.82)	0.023	2.40 (1.10–5.26)	0.028		
T allele	0.34	0.28	—	—	—	—		
ADD153 C/T (rs697221)								
CC	117 (60.62)	130 (62.5)	1.00	—	1.00	—	F-ATTATCTGCGAGATGTGCTTTTCC R-CCAGGAGGTGAACATAGGTACC	Hpy188III C 95/51/23 T 150/23
CT	69 (35.75)	70 (33.65)	1.10 (0.72–1.66)	0.668	1.17 (0.75–1.81)	0.493		
TT	7 (3.63)	8 (3.85)	0.97 (0.34–2.76)	0.958	1.05 (0.34–3.30)	0.927		
T allele	0.21	0.20	—	—	—	—		
DKV2A 3'UTR C540G								
CC	86 (46.2)	97 (46.9)	1.00	—	1.00	—	F-GACATCCCGATTGAAGAA R-TTACGGTAGTGGGGAAGG	MspI C 154/44 G 198
CG	90 (48.4)	103 (49.8)	0.99 (0.66–1.48)	0.944	1.09 (0.71–1.67)	0.652		
GG	10 (5.4)	7 (3.4)	1.61 (0.59–4.42)	0.354	1.92 (0.65–5.64)	0.230		
G allele	0.29	0.28	—	—	—	—		

I, confidence interval; F, forward; N, number of individuals; OR, odds ratio; R, reverse; SNP, single-nucleotide polymorphism. Total values may vary due to missing values.

^aAdjusted for sociodemographic data (age, sex, and educational level).

The sequencing of the $p27^{kip-1}$ polymorphism matched 100% with the genotyping by PCR-RFLP.

Results for melanoma risk indicated a protective effect of the Gly allele of $p27^{kip-1}$ in both crude and adjusted ORs. The protective effect could be observed in both heterozygous and homozygous genotypes (Table 1). A risk effect was also observed with the TT genotype of the *prohibitin* gene in both crude and adjusted ORs. As regards *TP53*, *GADD153*, and *CDKN2A* polymorphisms, no association was observed. We also reconfirmed the association of $p27^{kip-1}$ with the incidence of melanoma using an independent set of 370 healthy controls (OR 0.35; 95% CI 0.17–0.73; $P < 0.01$ for Val/Val vs. Gly/Gly genotype).

Furthermore, we performed a stratified analysis for gene–host factors using a dichotomized model, considering the presence or absence of a host risk factor in addition to $p27^{kip-1}$ (Table 2) or *prohibitin* (Supplementary Table 1) polymorphisms, grouping the heterozygous and homozygous genotypes. As regards the $p27^{kip-1}$ Gly genotype (Table 2), a protective effect was observed for low-risk host factors such hair and eye color (black or brown color), presence of freckles (any/rare), sunburns (no), and European ancestry (no). The Gly protective genotype

decreased the OR and the 95% CI for all the high-risk host factors analyzed (Table 2). As regards *prohibitin*, presence of the T allele increased the OR and the 95% CI for risk factors such as sunburns during childhood and adolescence, having undergone pigmented lesions removal, and European ancestry (Supplementary Table 1), showing no effect on factors such as hair and eye color and presence of freckles. The age of onset among melanoma patients (mean $\pm$ SD) did not differ for *prohibitin* polymorphisms (CC genotype 51.55 ± 15.11 and CT + TT genotype 51.95 ± 13.81 ; $P = 0.84$) or for $p27^{kip-1}$ (Val/Val genotype 53.1 ± 14.1 and Val/Gly + Gly/Gly genotype 49.8 ± 13.8 ; $P = 0.11$) genotypes.

The same stratified analysis of host and environmental risk factors with regard to *TP53*, *GADD153* and *CDKN2A* polymorphisms analyzed in this study did not show statistical significance (data not shown). Moreover, no difference was observed in terms of melanoma risk as regards polymorphisms of the above-mentioned genes (data not shown).

Discussion

This study evaluated the impact of polymorphisms in cell cycle control genes on the risk of melanoma. The results

Table 2 Stratification analysis of the $p27$ polymorphism^a associated with cutaneous melanoma risk in addition to selected variables.

Variables	Cases [N (%)]	Controls [N (%)]	Crude OR (95% CI)	P	Adjusted OR (95% CI) ^b	P
Hair color and $p27$ genotype						
Black or brown/ $p27$ 0	76 (43.43)	59 (35.54)	1.00	–	1.00	–
Black or brown/ $p27$ 1–2	69 (39.43)	97 (58.43)	0.55 (0.35–0.87)	0.011	0.58 (0.36–0.92)	0.022
Blonde or red/ $p27$ 0	17 (9.71)	4 (2.41)	3.30 (1.05–10.33)	0.040	3.26 (1.03–10.31)	0.045
Blonde or red/ $p27$ 1–2	13 (7.43)	6 (3.61)	1.68 (0.60–4.69)	0.320	1.47 (0.51–4.18)	0.475
Eye color and $p27$ genotype						
Black or brown/ $p27$ 0	69 (39.2)	53 (32.12)	1.00	–	1.00	–
Black or brown/ $p27$ 1–2	62 (35.23)	89 (53.94)	0.54 (0.33–0.87)	0.011	0.56 (0.34–0.92)	0.022
Green or blue/ $p27$ 0	24 (13.64)	9 (5.45)	2.05 (0.88–4.77)	0.097	2.31 (0.94–5.68)	0.068
Green or blue/ $p27$ 1–2	21 (11.93)	14 (8.49)	1.15 (0.54–2.48)	0.717	1.21 (0.55–2.67)	0.639
Freckles and $p27$ genotype						
Any/rare/ $p27$ 0	56 (32.18)	47 (29.75)	1.00	–	1.00	–
Any/rare/ $p27$ 1–2	53 (30.46)	85 (53.8)	0.52 (0.31–0.88)	0.014	0.53 (0.31–0.89)	0.017
Few/many/ $p27$ 0	36 (20.69)	11 (6.96)	2.75 (1.26–5.98)	0.011	2.47 (1.12–5.44)	0.025
Few/many/ $p27$ 1–2	29 (16.67)	15 (9.49)	1.62 (0.78–3.38)	0.196	1.49 (0.71–3.13)	0.295
Sunburn in childhood and $p27$ genotype						
No/ $p27$ 0	25 (26.32)	15 (22.73)	1.00	–	1.00	–
No/ $p27$ 1–2	26 (27.37)	30 (45.45)	0.50 (0.20–1.20)	0.122	0.50 (0.22–1.17)	0.112
Yes/ $p27$ 0	21 (22.11)	10 (15.15)	1.30 (0.50–3.40)	0.647	1.26 (0.45–3.51)	0.660
Yes/ $p27$ 1–2	23 (24.20)	11 (16.67)	1.30 (0.50–3.30)	0.644	1.34 (0.50–3.57)	0.564
Sunburn in adolescence and $p27$ genotype						
No/ $p27$ 0	29 (17.06)	35 (23.03)	1.00	–	1.00	–
No/ $p27$ 1–2	33 (19.41)	70 (46.05)	0.57 (0.30–1.08)	0.086	0.64 (0.33–1.24)	0.185
Yes/ $p27$ 0	60 (35.29)	22 (14.47)	3.29 (1.65–6.58)	0.001	4.65 (2.18–9.93)	<0.001
Yes/ $p27$ 1–2	48 (28.24)	25 (16.45)	2.32 (1.16–4.62)	0.017	3.12 (1.47–6.63)	0.003
Undergone pigmented lesions removal and $p27$ genotype						
No/ $p27$ 0	40 (22.60)	51 (30.91)	1.00	–	1.00	–
No/ $p27$ 1–2	35 (19.77)	85 (51.52)	0.53 (0.30–0.93)	0.027	0.54 (0.30–0.96)	0.036
Yes/ $p27$ 0	53 (29.94)	11 (6.67)	6.14 (2.84–13.27)	<0.001	5.61 (2.56–12.30)	<0.001
Yes/ $p27$ 1–2	49 (27.69)	18 (10.90)	3.47 (1.76–6.85)	<0.001	3.17 (1.59–6.33)	0.001
European ancestry and $p27$ genotype						
No/ $p27$ 0	33 (18.97)	37 (23.42)	1.00	–	1.00	–
No/ $p27$ 1–2	32 (18.39)	63 (39.87)	0.57 (0.30–1.07)	0.082	0.61 (0.32–1.15)	0.124
Yes/ $p27$ 0	57 (32.76)	22 (13.93)	2.90 (1.47–5.73)	0.002	2.86 (1.42–5.78)	0.003
Yes/ $p27$ 1–2	52 (29.88)	36 (22.78)	1.62 (0.86–3.05)	0.136	1.57 (0.82–3.02)	0.176

CI, confidence interval; N, number of individuals; OR, odds ratio.

^aArabic numbers representing $p27$ genotypes: 0 indicates Val/Val genotype, 1–2 indicates Val/Gly + Gly/Gly genotypes.

^bAdjusted for sociodemographic data (age, sex, and educational level).

of the study provide new information on the genetic predisposition of melanoma. First, the results for genes such as *TP53*, *GADD153*, and *CDKN2A* contradicted those of previous studies as regards their possible role in melanoma. A meta-analysis carried out to analyze the impact of *TP53* Arg72Pro on cancer reported this polymorphism as a protective factor against melanoma [10]. However, our data corroborated with the results of a study by Zou *et al.* [16]. As regards *CDKN2A*, the polymorphism 3'UTR C540G could alter the affinity toward miRNAs [17], a critical source of gene regulation, and was related to the development of melanoma in a case-control study published elsewhere [18]. However, we failed to attribute any significant risk to this variant in the present study. As regards the *GADD153* polymorphism, our results also refuted the association previously described by Korabiowska *et al.* [11].

In contrast, *prohibitin* and *p27^{kip-1}* were reported as novel variants associated with melanoma. *Prohibitin*, by its interaction with Rb protein family members, may act as an antiproliferative protein and may function as a tumor suppressor [8]. As regards *prohibitin*, the C allele showed functional activity in tumor suppression as compared with the T allele in breast cancer cell lines as well as in xenograft tumor growth in mice, thus demonstrating the suppressor activity of this polymorphism [19]. Case-control studies have also suggested the impact of *prohibitin* polymorphisms in ovarian and breast cancer risk [12]. Our results suggested that the *prohibitin* T allele may fail in its antiproliferative action and contribute to melanoma risk. Functional studies on *prohibitin* polymorphism in melanomas are necessary to confirm and elucidate its functionality.

As regards the *p27^{kip-1}* genotype, the Val109Gly exchange occurs within a binding domain that interacts with the p38^{αβ1} protein, which by phosphorylation promotes cytoplasmic translocation of *p27^{kip-1}* and its degradation [20]. As the subcellular localization of *p27^{kip-1}* is described as a critical factor to melanoma prognosis [5], we suggest that the amino acid exchange may alter the affinity of *p27^{kip-1}* for its partner p38^{αβ1}, contributing to a differential protein subcellular localization. As *p27^{kip-1}* exerts its function in the nucleus, an eventual preferential nuclear exclusion of the Val allele may render the Gly allele more protective against melanoma and may lead to a differential prognosis. In fact, the Gly genotype was more protective with low-risk host factors and also modified the effect of high-risk host factors [14]. Moreover, the Val/Val genotype has also been shown to be associated with a high risk of advanced prostate cancer [13].

As regards the host factors analyzed in association with the polymorphisms, a majority of them are known risk factors and have been described in detail in the previous work [14]. Despite that, the results from stratification clearly show the impact of the polymorphism modulating the penetrance of the risk factor. As regards *p27^{kip-1}*, the

results show the penetrance of the protective allele, thus reducing the risk attributed to the host factor when the genotype is Val/Val. In contrast, as regards *prohibitin*, its strength in modulating the penetrance of the known host factors in melanoma risk seems less impacting as compared with *p27^{kip-1}* polymorphisms, being restricted to variables such as European ancestry and having undergone pigmented lesion removal. The modulation of the penetrance of the host factors by the polymorphisms involved in melanoma risk confirm the knowledge on the multifactorial aspects of cancer development, in this case the genetic, host, and environmental factors, wherein both are intrinsically related to disease progression.

In summary, our data show the association of polymorphisms in cell cycle genes with host factors to melanoma risk. The limitation of this study may be attributed to the moderate sample size. Nonetheless, our study is the first report on *prohibitin* and *p27^{kip-1}* polymorphisms and melanoma risk. Moreover, we carried out this study in a high UV index region, in contrast to the majority of studies performed in regions such as North America, Europe, and Australia. Further studies are necessary to confirm these associations in different UV index regions to test the penetrance of these polymorphisms.

Acknowledgements

The authors thank FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) and CNPq-Brazil for their financial support and fellows.

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (process 06-52041-9, 05-56069-2) and CNPq (process no. 478239/03-3).

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

References

- Mitchell D, Fernandez A. The photobiology of melanocytes modulates the impact of UVA on sunlight-induced melanoma. *Photochem Photobiol Sci* 2012; **11**:69–73.
- Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kaçmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* 2004; **73**:39–85.
- Li W, Sanki A, Karim RZ, Thompson JF, Soon Lee C, Zhuang L, et al. The role of cell cycle regulatory proteins in the pathogenesis of melanoma. *Pathology* 2006; **38**:287–301.
- Udayakumar D, Mahato B, Gabree M, Tsao H. Genetic determinants of cutaneous melanoma predisposition. *Semin Cutan Med Surg* 2010; **29**:190–195.
- Chen G, Cheng Y, Zhang Z, Martinka M, Li G. Prognostic significance of cytoplasmic p27 expression in human melanoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011; **20**:2212–2221.
- Yu H, McDaid R, Lee J, Possik P, Li L, Kumar SM, et al. The role of BRAF mutation and p53 inactivation during transformation of a subpopulation of primary human melanocytes. *Am J Pathol* 2009; **174**:2367–2377.
- Fornace AJ Jr, Jackman J, Hollander MC, Hoffman-Liebermann B, Liebermann DA. Genotoxic-stress-response genes and growth-arrest genes. *gadd, MyD, and other genes induced by treatments eliciting growth arrest. Ann N Y Acad Sci* 1992; **663**:139–153.

- 8 Wang S, Nath N, Adlam M, Chellappan S. Prohibitin, a potential tumor suppressor, interacts with RB and regulates E2F function. *Oncogene* 1999; **18**:3501–3510.
- 9 Ritzwani W, Alexandrow M, Chellappan S. Prohibitin physically interacts with MCM proteins and inhibits mammalian DNA replication. *Cell Cycle* 2009; **8**:1621–1629.
- 10 Francisco G, Menezes PR, Eluf-Neto J, Chammas R. Arg72Pro TP53 polymorphism and cancer susceptibility: a comprehensive meta-analysis of 302 case-control studies. *Int J Cancer* 2011; **129**:920–930.
- 11 Korabiowska M, Cordon-Cardo C, Betke H, Schlott T, Kothaus M, Stachura J, et al. GADD153 is an independent prognostic factor in melanoma: immunohistochemical and molecular genetic analysis. *Histol Histopathol* 2002; **17**:805–811.
- 12 Jupe ER, Badgett AA, Neas BR, Craft MA, Mitchell DS, Resta R, et al. Single nucleotide polymorphism in prohibitin 39 untranslated region and breast-cancer susceptibility. *Lancet* 2011; **357**:1588–1589.
- 13 Kibel AS, Suarez BK, Belani J, Oh J, Webster R, Brophy-Ebbers M, et al. CDKN1A and CDKN1B polymorphisms and risk of advanced prostate carcinoma. *Cancer Res* 2003; **63**:2033–2036.
- 14 Gonçalves FT, Francisco G, de Souza SP, Luiz OC, Festa-Neto C, Sanches JA, et al. European ancestry and polymorphisms in DNA repair genes modify the risk of melanoma: a case-control study in a high UV index region in Brazil. *J Dermatol Sci* 2011; **64**:59–66.
- 15 Luiz OC, Gianini RJ, Gonçalves FT, Francisco G, Festa-Neto C, Sanches JA, et al. Ethnicity and cutaneous melanoma in the city of São Paulo, Brazil: a case-control study. *PLoS One* 2012; **7**:e36348.
- 16 Zou YF, Wang F, Feng XL. TP53 Arg72Pro polymorphism may have little involvement in the pathogenesis of skin cancer in Caucasians. *J Invest Dermatol* 2011; **131**:781–782.
- 17 Chen K, Song F, Calin GA, Wei Q, Hao X, Zhang W. Polymorphisms in microRNA targets: a gold mine for molecular epidemiology. *Carcinogenesis* 2008; **29**:1306–1311.
- 18 Kumar R, Smeds J, Berggren P, Straume O, Rozell BL, Akslen LA, et al. A single nucleotide polymorphism in the 3' untranslated region of the CDKN2A gene is common in sporadic primary melanomas but mutations in the CDKN2B, CDKN2C, CDK4 and p53 genes are rare. *Int J Cancer* 2001; **95**:388–393.
- 19 Manjeshwar S, Branam DE, Lerner MR, Brackett DJ, Jupe ER. Tumor suppression by the prohibitin gene 3' untranslated region RNA in human breast cancer. *Cancer Res* 2003; **63**:5251–5256.
- 20 Tomoda K, Kubota Y, Kato J. Degradation of the cyclin-dependent-kinase inhibitor p27^{kip1} is instigated by Jab1. *Nature* 1999; **398**:160–165.