ELIZABETH CRISTINA RODRIGUES

O Papel de RASSF9 em Melanoma Murino: genética reversa usando CRISPR/Cas9

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo

2019

ELIZABETH CRISTINA RODRIGUES

O Papel de RASSF9 em Melanoma Murino: genética reversa usando CRISPR/Cas9

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, Tecidual e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia de Sistemas

Orientador: Prof. Dr. João Gustavo Pessini Amarante-Mendes

São Paulo
2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Elizabeth Cristina Rodrigues

Titulo da Dissertação/Tese: O Papel de RASSF9 em Melanoma Murino: genética reversa usando CRISPR/Cas9

Orientador: João Gustavo Pessini Amarante-Mendes

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a **...../...../.....**, considerou o(a) candidato(a):

( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

À MINHA FAMÍLIA,

POR ME FAZEREM ACREDITAR QUE AMANHÃ

SEMPRE SERÁ MELHOR QUE HOJE.

Agradecimentos

Primeiramente à minha mãe, por seu exemplo de força e dedicação, obrigada por estar sempre ao meu lado, me ajudar nos piores momentos e por me apoiar incondicionalmente. À Deus e aos Orixás pela oportunidade de aprendizado e evolução pessoal, profissional e espiritual, que sempre haja a vela na sala.

Ao meu orientador, Gustavo por ter me aceitado em seu laboratório, confiado em meu trabalho e me ajudado a crescer como pessoal e profissionalmente. Por me ensinar que sensibilidade e percepção da necessidade do outro também são importantes na construção de um profissional melhor. E ao Roger por mostrar que amor por ciência é algo que não se perde, que aumenta com o tempo e que isso é essencial para continuar. A todos que estavam e que passaram pelo laboratório 244 durante esses quatro anos. Obrigada pela oportunidade de aprendizado.

À Julia, que chegou ao mundo para afirmar que amor incondicional não vem pelo sangue, vem pela família que nós escolhemos. À Amanda, minha sempre Dinha, minha comadre, pela Julia e por me dar uma família que amo e quero sempre por perto. Pelos nossos anos de amizade que conseguiu aumentar mesmo há distância, por todo amor e cuidado.

Esses anos morando em São Paulo me mostraram que Criolo estava errado! Existe amor em SP, mas esses amores nos dão tchau rápido demais. Nessa lista: Gustavo, Ronan, Daniel, Felipe, Henning, Melanie, Priscila, Isabella, Ana Paula, Anny. Que seus caminhos, mesmo que distantes tenham sempre muita luz, flores e sucesso. Aos amigos próximos, que viraram a minha família de SP, Dona Marlene, Seu Guisepe, Luana, Geisy, Amanda, Marlana, Rodrigo, Taís, Letícia, Matthew, Karla, Ana, Carla, Letícia, obrigada por alegrarem meus dias, por me ajudarem em tantos momentos. Aos de longa data, Maria Luisa, Jhonys, Henrique, Daniella, Patrícia, Andressa. Obrigada por tudo.

À Capes e FAPESP pelo auxílio financeiro que possibilitaram a minha mudança para São Paulo e a execução de um grande sonho de infância, fazer ciência. Aos funcionários do ICB, pelo trabalho e dedicação para manter as condições para a realização desse projeto. À USP, pelo suporte estrutural.

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, elas são a abertura para achar as que estão certas”.

Carl Sagan

RESUMO

Melanoma é o mais letal tipo de câncer de pele e é originado a partir da transformação de melanócitos e várias alterações gênicas estão relacionadas a esse processo. Mutações e aumento no número de cópias de genes Ras é um dos mais importantes eventos, que ocorre em cerca de 91% dos casos de melanoma. Há vários efetores de Ras com potencial terapêutico. A família RASSF (*Ras-association family*) é constituída por 10 membros (RASSF1-10), a maioria deles está relacionada a funções de supressores tumorais. RASSF9 é um membro do grupo N-terminal, que primeiramente foi descrito como P-CIP1, uma proteína envolvida no trafego de vesículas e foi demonstrada interagindo com Ras. A expressão de RASSF9 em camundongo é predominante no epitélio estratificado, onde é crucial para a homeostase tecidual. Além disso, a expressão de RASSF9 é maior em pessoas que tem uma maior exposição solar. Entretanto, não há informações sobre a função de RASSF9 em melanoma. Nós desenvolvemos uma linhagem de melanoma murino não metastática, Tm1.Luc, nocaute de RASSF9 com CRISPR/Cas9. Dados do TCGA demonstraram que RASSF9 está discretamente superexpressa em amostras de melanoma e que não há correlação entre o nível de expressão do mRNA e a fosforilação de seu promotor. Nós observamos uma redução na capacidade proliferativa *in vitro* e *in vivo* das células deficientes de RASSF9 que pode ser explicada pela supressão da via Ras/Raf/MERK/ERK, o que foi confirmado pro Western-Blot. Apesar da relevância de RASSF no processo de morte celular descrita em outros sistemas experimentais, nossos dados não permitem concluir, até o momento, se RASSF9 é capaz de modular significativamente esse processo celular em melanoma. Em resumo, nossos dados segurem que RASSF9 atua na regulação de Ras promovendo a proliferação de melanoma.

ABSTRACT

Melanoma is the most lethal skin cancer and is originated from melanocyte transformation. Several genetic changes are related to this process. Mutation or copy-number amplification of Ras is one of the most important events, which occurs in 91% of the cases. Therefore, regulators and/or partners of Ras could potentially be good drug targets for treatment. The Ras-association family (RASSF) comprises ten proteins (RASSF1-10), several of them are related to tumor suppression. RASSF9 is a member of N-terminal RASSF proteins and was first described as P-CIP1, a protein that is involved in vesicle trafficking, and has been shown to bind Ras proteins. In mice RASSF9 is predominantly expressed in the stratified epithelium, where it is crucial for epidermal homeostasis. Moreover, it was confirmed the RASSF9 gene is upregulated in samples of higher sun-exposure people. However, the function and importance of RASSF9 in melanoma is still obscure. Aiming to understand the role of RASSF9 in melanoma growth and metastasis, we have developed RASSF9-knockout TM1-luciferase cells by using CRISPR/Cas9 system. TCGA data analysis shows RASSF9 is upregulated in melanoma samples but without correlation between mRNA expression and promoter phosphorylation. We observed in RASSF9 knockout cells a reduction in proliferative capacity *in vitro* and *in vivo* that could be explained by suppression of Ras/Raf1/MEK/ERK pathway, as confirmed by Western-blot. Although previous evidence of the relevancy of RASSF members in cell death pathway, we were not able to conclude whether RASSF9 acts as a modulator in this cellular process in our experimental system. In summary, our results suggest that RASSF9 plays a role in Ras activation leading to proliferative capacity in melanoma cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estimativa da incidência de Melanoma por 100 mil habitantes de cada estado brasileiro em 2018 2
Figura 2 ABCDE da Identificação do Melanoma 3
Figura 3 Estrutura tridimensional de H-Ras interagindo a um análogo de GTP (GPPNHp) 8
Figura 4 Conservação do domínio GTPase de H-Ras 9
Figura 5 KEGG das vias de sinalização reguladas por Ras 12
Figura 6 Estrutura dos membros da família RASSF 13
Figura 7 Os domínios RA dos grupos de RASSF são filogeneticamente distintos.19
Figura 8 Ilustração esquemática do processo de clonagem do plasmídeo lentiCRISPRv2 34
Figura 9 Plasmídeo LentiCRISPRv2 36
Figura 10 Plasmídeo pCMV-VSV-G 37
Figura 11 Plasmídeo psPAX2 38
Figura 12 Estratégia de *gate* de análise da proliferação com VPD 450 41
Figura 13 Estratégica de gate dos ensaios de Morte Celular 43
Figura 14 Análises *in silico* do *status* de RASSF9 em amostras de Melanoma humano 46
Figura 15 Expressão de RASSF9 em linhagem de Melanoma Murino 47
Figura 16 Clivagem do LentiCRISPRv2 com BsmBI. 49
Figura 17 Confirmação da inserção de sgRNA de RASSF9 no vetor LentiCRISPRv2 50
Figura 18 Padronização da concentração de puromicina em Tm1.Luc 51
Figura 19 Avaliação da edição gênica por sequenciamento 52
Figura 20 Avaliação da depleção de RASSF9 por Western Blot 53
Figura 21 Padronização da concentração de α-RASSF9 em células Tm1.Luc para microscopia de fluorescência 55
Figura 22 Verificação da deficiência de RASSF9 por microscopia de fluorescência 56

Figura 23 Comparação da proliferação das células que expressam RASSF9 com as células nocauteadas 58
Figura 24 Cinética de Crescimento das células RASSF9$^{-/-}$ 59
Figura 25 Capacidade de formação de colônia das células deficientes de RASSF9 após 7 dias 61
Figura 26 Formação de esferoides após 4 dias de cultivo em células nocautes de RASSF9 63
Figura 27 Formação de esferoides após 7 dias de cultivo após depleção de RASSF9 64
Figura 28 Padronização da concentração de Estaurosporina para os ensaios de morte celular 66
Figura 29 Tratamento das células deficientes de RASSF9 com Estaurosporina. . 68
Figura 30 Avaliação do nível de expressão de proteínas chave de vias metabólicas 70
Figura 31: Curva de Crescimento das linhagens depletadas de RASSF9 *in vivo.*. 71
Figura 32: Curva de Sobrevida dos animais inoculado com as células nocaute.. . 72

LISTA DE SÍMBOLOS

°C - Grau centigrado

% - Porcentagem

cm - centímetro

µF - MicroFaraday

µg - Micrograma

µL - Microlitro

µM - Micromolar

g - Grama (unidade de medida de massa)

g - Aceleração de gravidade

kDa - QuiloDalton

L - litro

M - Molar

mg - Miligrama

mL - Mililitro

mM - Milimolar

ng - Nanograma

nm - Nanômetro

bp - Pares de bases

pH - Potencial hidrogeniônico

U - Unidade

V- Volt

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	análise de Variância
aPCK	Atypical protein kinase C
APS	Persufato de Amônio
ASPP	apoptosis stimulating proteins of p53
ATP	adenosine triphosphate
Bak	Bcl-2 homologous antagonist killer
Bax	BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator
BCL-2	B-cell lymphoma protein 2
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BLASTn	Basic Local Alignment Search Tool for nucleotides
BSA	Bovine Serum Albumin
Cas	CRISPR Associated
CDK4	cyclin-dependent kinase
cDNA	DNA complementar
CEUA	Comissão de ética e uso Animais
CKI1	cyclin-dependent kinase inhibitor 1
CRISPR	Clustered Regulary Interspaced Short Palindromic Repeats
CT	threshold cycle
C-terminal	Carboxi-terminal
DISC1	Death-inducing signaling complex
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
DR4	Death Receptor 4
DR5	Death Receptor 5
DSBs	DNA double-stranded breaks
DTT	Dietiltriol
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid

ERCC1	Excision Repair 1
ERK	extracellular signal–regulated kinases
FCCTX	Familial colorectal cancer type X
FDA	Food and Drug Administration
FoxO	forkhead box O
GAPs	GTPase activating proteins
gDNA	DNA genômico
GDP	guanosina 5’-difosfato
GEFs	guanine nucleotide exchange factors
GTP	Trifosfato de guanosina
HDR	Homology directed repair
IAP	Inhibitor of apoptosis
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome
LB	Meio Luria-Bertani
L-Glut	L-Glutamina
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MOAP-1	Modulator of apoptosis 1
mRNA	RNA mensageiro
MST	Misato Protein
NHEJ	Non-homologous end-joining
NSCLC	non-small-cell lung câncer
PAM (Proteína)	peptidylglycine α-amidating monooxygenase
PAM (Sequência)	Protospacer Adjacent Motif
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDK1	Phosphoinositide-dependent kinase-1
PEI	Polyethylenimine
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PKC	protein kinase C
PP1A	Protein phosphatase 1 A

qPCR	Quantative PCR
RA	RalGDS/AF6 Ras association domain
Ras	RAt Sarcoma vírus
RASSF	Ras association domain-containing protein
RB	retinobastoma
RNA	Ácido Ribonucleico
SARAH	Salvador-RASSF-Hippo
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
SFB	Soro fetal bovino
sgRNA	small guide RNA
SOP	sensory organ precursor
ST	Sem tratamento
STRIPAK	Striatin-interacting phosphatase and kinase
TALEN	transcription activator–like effector nucleases
TAZ	Tafazzin
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TEMED	N, N, N´, N´- Tetrametiletilenodiamina
TNF	Fator de Necrose tumoral
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
VPD450	Violet Proliferation Dye 450
YAP	yes-associated protein 1
ZFN	zinc-finger nuclease

Sumário

RESUMO i

ABSTRACT ii

LISTA DE FIGURAS iii

LISTA DE SÍMBOLOS v

LISTA DE ABREVIATURAS vi

1. Introdução 1

1.1. Melanoma 1

1.2 Proteína Ras 7

1.3 Família RASSF 13

1.3.1. Membros C-terminais 16

1.3.2 Membros N-terminais 19

1.3.3 RASSF9 21

2. Objetivos 24

2.1. Objetivo Geral 24

2.2. Objetivos Específicos: 24

2.2.1. Determinar o perfil de expressão de RASSF9 em Melanoma humano e murino 24

2.2.2. Desenvolver uma linhagem de melanoma nocaute de RASSF9 24

2.2.3. Determinar as funções de RASSF9 *in vitro* 24

2.2.4. Elucidar o papel de RASSF9 no crescimento *in vivo* de melanoma 24

3. Metodologia 25

3.1. Linhagens celulares e condições de cultivo 25

3.2. Camundongos e Declaração Ética 25

3.3. Extração e Uso de Ácidos Nucleicos 26
3.3.1. Extração de RNA..... 26
3.3.2 Síntese de cDNA..... 27
3.3.3. Reação de qPCR 27
3.3.4. Extração de DNA genômico 28
3.3.5. Extração de DNA Plasmidial 28
3.3.6. PCR convencional..... 29
3.3.6. Eletroforese de DNA em Gel de Agarose..... 29
3.3.7 Purificação do produto de PCR 30
3.3.7 Reação de Sequenciamento 30
3.4. Marcação de proteínas específicas 31
3.4.1. Obtenção de extrato proteico 31
3.4.2 Eletroforese de proteínas em gel de Poliacrilamida (*SDS Page*) 31
3.4.3. *Western blot* 31
3.4.4 Imunofluorescência 32
3.5. Preparo e uso de Bactérias Stbl3 33
3.5.1. Preparo de Bactérias quimiocompetentes..... 33
3.5.2. Transformação de bactérias quimiocompetentes..... 33
3.6 Obtenção de plasmídeo contendo o sgRNA de RASSF9..... 33
3.6.1 Desenho dos sgRNAs 34
3.6.2 Anelamento dos sgRNAs 35
3.6.3 Clivagem do vetor LentiCRISPRv2 35
3.6.4 Reação de Ligação 36
3.7 Transdução de células Tm1.Luc..... 37
3.7.1 Transfecção de células HEK293T 37

3.7.2 Transdução de células Tm1.Luc com Lentivirus 39
3.7.3 Diluição limitante 39
3.8 Ensaios Fenotípicos *in vitro* 40
3.8.1 Curva de crescimento *in vitro* 40
3.8.2 Proliferação com Marcador intracelular (VPD) 40
3.8.3 Ensaio clonogênico 42
3.8.4 Formação de Esferoides 42
3.8.5 Ensaio de Morte Celular 43
3.9 Análise Fenotípica *in vivo* 44
3.9.1 Crescimento tumoral 44
3.10 Análises Estatísticas 44
4. Resultados 45
4.1. RASSF9 em Melanoma 45
4.2 Geração de Linhagem RASSF9$^{-/-}$ 48
4.2.1. Obtenção de LentiCRISPRv2 com sgRNA de RASSF9 48
4.2.3. Depleção de RASSF9 em células Tm1.Luc 51
4.3 Alterações Fenotípica *in vitro* 57
4.3.1 Crescimento Celular das linhagens RASSF9$^{-/-}$ 57
4.3.5 Efeito da indução de morte com Estaurosporina 65
4.3.6 Alteração de vias metabólicas após a depleção de RASSF9 69
4.4 Alterações de Crescimento *in vivo* 71
5. Discussão 73
6. Conclusão 83
7. Referências 84

1. Introdução

1.1. Melanoma

A pele é um órgão complexo organizado pela presença de diferentes tipos celulares. A incidência de transformações malignas nesse tecido tem aumentado nas últimas décadas e, em 2018, representaram o 19° tipo de câncer mais comum no mundo, com cerca de 300 mil novos casos diagnosticados (BRAY et al., 2018). O câncer de pele pode ser dividido em dois tipos principais, o não melanoma e o melanoma, os quais apresentam comportamento e requerem abordagens de tratamento diferenciadas. O primeiro grupo é o mais comum, originado de células residentes da pele como as células basais e de células escamosas, ou ainda a partir de células do tecido conjuntivo. O segundo grupo, o melanoma, é o tipo de câncer de pele originado pela transformação de melanócitos, as células responsáveis pela pigmentação da pele (BULMAN; NEAGU; CONSTANTIN, 2013; CHUMMUN; MCLEAN, 2017).

O melanoma é o tipo de câncer de pele menos incidente, representando entre 1 e 3% dos casos. Nos Estados Unidos, de acordo com a Sociedade Americana de Câncer, estima-se que cerca de 96,480 mil novos casos serão diagnosticados, sendo cerca de 57,220 em homens e de 39,260 em mulheres. No Brasil em 2018, a estimativa é de 6.260, sendo 2.920 casos novos em homens e 3.340 casos novos em mulheres (Figura 1). Dentre os diferentes tipos de câncer de pele, o melanoma apresenta a maior taxa de mortalidade, sendo responsável por aproximadamente 80% das mortes relacionadas com câncer de pele. Em geral, as mortes não são decorrentes do tumor primário, mas sim da formação de focos secundários, metástases, em outros órgãos do organismo, por exemplo, pulmão e cérebro. Após a detecção do foco metastático, estima-se que a expectativa de vida do paciente seja de 9 meses a 3 anos (MERLINO et al., 2016; SCHADENDORF et al., 2015; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017). Estima-se que nos Estados Unidos haverá 7,230 mortes em decorrência da progressão desse tipo de tumor, sendo 4,740 de homens e 2,490 de mulheres, no Brasil estima-se para o mesmo ano 1.794, sendo 1.012 homens e 782 mulheres.

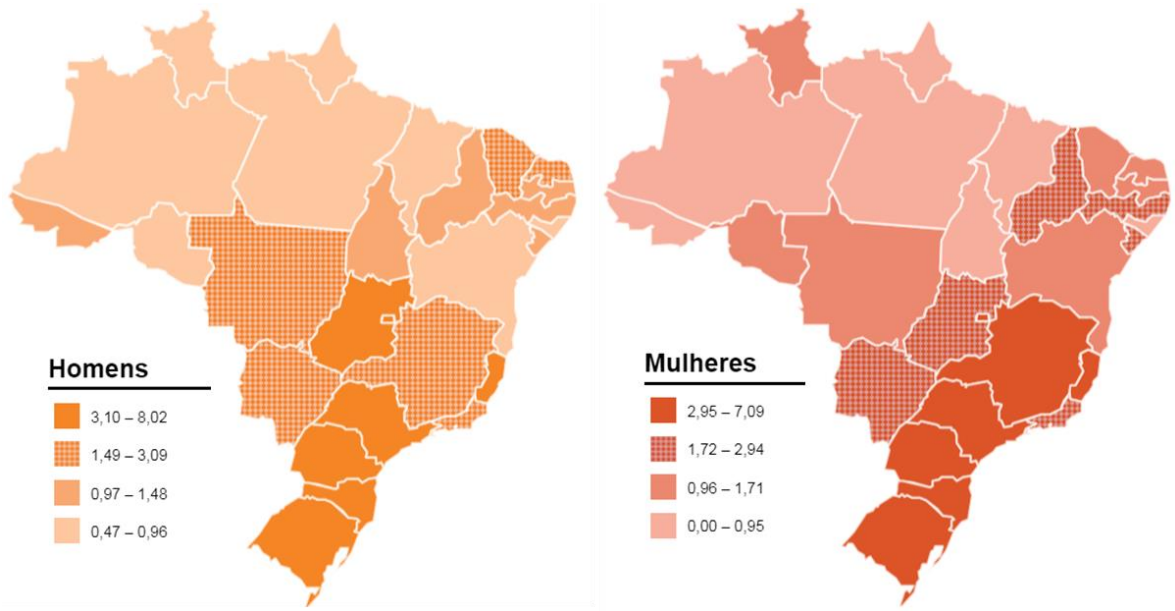

Figura 1 Estimativa da incidência de Melanoma por 100 mil habitantes de cada estado brasileiro em 2018

Em laranja a incidência de melanoma para homens por 100 mil habitantes, em vermelho, o mesmo dado para as mulheres brasileiras (INCA, 2018)

O aumento na incidência de melanoma é concomitante com a diminuição da camada de ozônio, o que acarreta num aumento na exposição de raios UV emitidos pelo Sol, muitas vezes causando históricos de recorrentes queimaduras solares, gera dois fatores relevantes de risco do desenvolvimento desse tipo de câncer. Além desses, o histórico familiar de melanoma maligno, junto a ascendência de origem europeia com olhos claros e cabelos loiros ou ruivos, presença de sardas e/ou nevos melanocíticos também contribuem como fatores de risco para a doença (AZOURY; LANGE, 2014). O diagnóstico se dá por exame dermatológico com biopsia de tecido suspeito.

Há mais de 30 anos, neste exame dermatológico é levado em consideração o chamado “ABCDE” da identificação do melanoma, ilustrado na Figura 2, no qual algumas características são levadas em consideração. Tecidos tumorais apresentam, em sua maioria proliferação assimétrica (A), ou seja, metade do tumor não é igual à outra metade. Ocorre a geração de bordas (B) irregulares, essas marcas também apresentam duas ou mais cores (C) e seus diâmetros (D) são superiores à 6mm e há uma evolução (E), caracterizada por alterações no

tamanho, cor ou forma da lesão a detecção precoce é a melhor maneira de prevenir a proliferação da doença (TSAO et al., 2015).

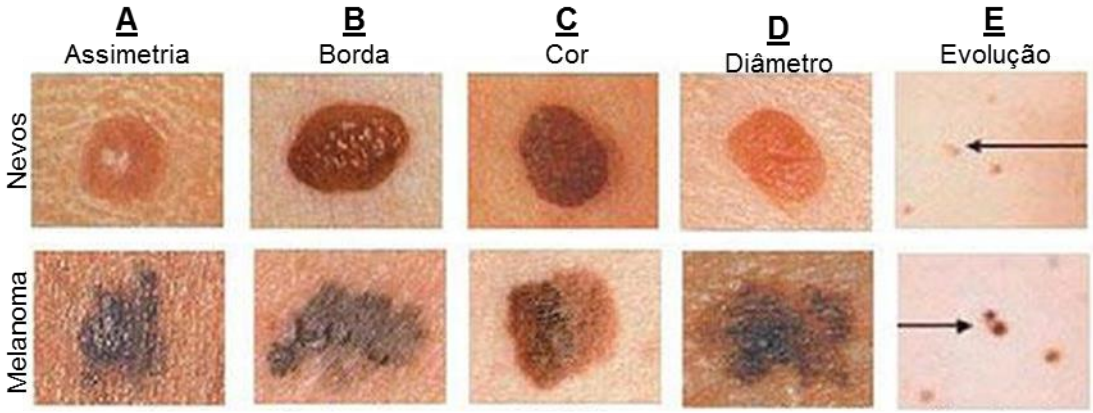

Figura 2 ABCDE da Identificação do Melanoma

Os critérios utilizados na classificação de manchas suspeitas leva em consideração os 5 critérios apresentados da esquerda à direita, sendo eles, A de assimetria, B de bordas, C de cor, D de diâmetro e E de evolução (Adaptado de (TSAO et al., 2015).

Apesar de proveniente do mesmo tipo celular, o melanoma pode ser classificado em duas principais classes, o proveniente de melanócitos da pele, melanoma cutâneo, e melanoma não cutâneo, proveniente de melanócitos residentes de outros órgãos, como olhos ou tecido gastrointestinal que são raros. Dentro do melanoma cutâneo temos alguns subtipos divididos de acordo com características patológicas e locais frequentes de seus aparecimento, sendo eles: Melanoma de extensão superficial, nodular, lentigo maligno, acral lentiginoso. O melanoma de extensão superficial é o mais prevalente, sendo responsável por 60 a 70% dos casos, ele tem uma correlação com exposição solar aguda, contínua ou intermitente, atingindo regiões como a região posterior das pernas de mulheres e o dorso de homens, e é mais recorrente em indivíduos de pele clara (GOLDSTEIN; GOLDSTEIN, 2001). O melanoma nodular é o segundo mais prevalente, representando entre 15 e 30% dos casos, é mais agressivo com nódulos com tendência ao crescimento vertical, ou seja, invadindo outros tecidos, está relacionado com a formação de ulceração e sangramento. O melanoma lentigo maligno representa entre 5 e 10% dos casos de melanoma e similar ao melanoma de extensão superficial, ocorre em áreas de alta exposição solar, como face e dorso das mãos, sendo relacionado à idades avançadas, apresentam

epiderme atrófica. O melanoma acral lentiginoso é um tipo raro de melanoma cutâneo encontrado na pele da região palmo-plantar, mas também pode estar presente no leito ungueal. É mais frequente em indivíduos de etnia negra (CHUMMUN; MCLEAN, 2017; CLARK et al., 1969).

A classificação e estadiamento do melanoma levam em consideração aspectos clínicos e patológicos do mesmo, usando a integração das classificações de profundidade de Breslow (BRESLOW, 1970) e estadiamento de Clark (CLARK et al., 1969). Na análise de profundidade de Breslow, quanto maior a profundidade da lesão da derme, ou seja, um crescimento vertical, pior o diagnóstico. Esse estadiamento é dividido em tumor primário (T) seguido por um número que o classifica de acordo com a profundidade. Assim temos que, T0, representa ausência de evidências de tumor primário; Tis, melanoma *in situ,* T1 tumor com profundidade de até 1mm; T2 tumores que apresentam profundidade entre 1,01 e 2 mm; T3 entre 2,01 e 4 mm; e T4 com profundidade superior a 4 mm (BALCH et al., 2009).

Enquanto que o estadiamento de Clark, leva em consideração o nível de invasão do tumor. Sendo estadio I com a presença de crescimento tumoral no espaço intradérmico; no estadio II há a invasão da derme papilar; no estadio III, o tumor atinge o espaço entre a derme papilar e reticular e há a presença de focos secundários em nódulos linfáticos; enquanto no estadio IV ocorre a invasão da derme reticular e extrapolação dos focos secundários para outros órgãos, como pulmão e cérebro. Em geral, a letalidade do melanoma não é decorrente do tumor primário, mas sim da formação de focos secundários, metástases, em outros órgãos. Após a detecção do foco metastático, estima-se que a expectativa de vida do paciente seja de 9 meses a 3 anos (BALCH et al., 2009; MERLINO et al., 2016; SCHADENDORF; KOCHS; LIVINGSTONE, 2013).

Em geral, há uma dificuldade no tratamento do melanoma quando este é diagnosticada em graus avançados da doença, uma vez que o melanoma apresenta altas taxas de resistências a quimioterápicos e à radioterapia. Cisplatina, por exemplo, é um dos quimioterápicos utilizados na prática clínica como adjuvante à cirurgia e no caso de melanomas metastáticos (HUTCHINSON;

CANCER; ALLIANCE, 2010). De modo geral, o tratamento com cisplatina gera danos ao DNA, o que acaba ativando a via intrínseca da apoptose (BARABAS et al., 2008; SHALOAM; TCHOUNWOU, 2014). Entretanto existem diversos mecanismos pelos quais as células de melanoma apresentam resistência ao tratamento com esse quimioterápico. Por exemplo, através do aumento da expressão de membros antiapoptóticos da família Bcl-2 ou ainda, pela supressão da expressão de membros pró-apoptóticos da mesma família (GALLUZZI et al., 2012; MILLER et al., 2010). Ou ainda pelo aumento da expressão da proteína ERCC1, uma proteína de reparo de DNA, que é ativada através da via de RAS/RAF/MAPK (LI; MELTON, 2012).

A via RAS/RAF/MAPK tem alta relevância em melanoma uma vez que nela estão presentes as principais proteínas com alterações identificadas até o momento em melanoma. BRAF, uma das isoformas de RAF apresenta um *hotspot* para mutações decorrentes de exposição à luz UV. Nessa alteração, uma citocina é convertida em timina no exon 15 códon 600 o que substitui na proteína um aminoácido de ácido glutâmico por uma valina, gerando a principal mutação de melanoma, presente entre 35 e 50% dos casos. A forma $BRAFV^{600}$ que tem como consequência células com a via MAPK constitutivamente ativada (ASCIERTO et al., 2012; GHOSH; CHIN, 2009; TÍMÁR et al., 2016; VORA, 2014). Recentemente, o FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou três drogas para o tratamento de melanomas que apresentam essa mutação, são elas o vemurafenib, dabrafenib e o trametinib após apresentarem estudos de fase III com ganho consideráveis na taxa de resposta ao tratamento, sobrevida livre de progressão e sobrevida global (MCARTHUR; RIBAS, 2013).

Até 2015 alguns trabalhos com um grande número de pacientes utilizando apenas uma abordagem de identificação de alteração genética ou então com mais de uma ferramenta em poucas amostras de melanoma haviam sido publicados. Akbani e colaboradores (2015), modificaram esse cenário, trazendo um trabalho que utilizou mais de 330 amostras de melanoma de sítios primários e de metástases, além de utilizar diferentes abordagens na avaliação das alterações genéticas como metilação, mutação e alterações no número de cópias gênicas,

além do nível de expressão em termos de mRNA e de proteínas. Foi sugerido assim, uma nova classificação de melanoma baseado nas principais mutações presentes nesse tipo tumoral. Os dados desse trabalho foram de acordo com o que já se sabia sobre a genética de melanoma, com BRAF apresentando a maior taxa de mutação (52% dos casos), seguida por RAS (N/H/K) mutada (28% dos casos), NF1 mutada (14% dos casos). Um quarto grupo foi adicionado, no qual as três proteínas apresentam sua sequência original conservada, triplo selvagem (6% dos casos). Interessantemente, esse último grupo foi visto com um maior número de cópias de oncogenes como KIT e CDK4.

Esses dados demonstram e reforçam a importância da regulação da via RAS/RAF/MAPK em melanoma, estando alterada em algum nível em 90% dos casos (AKBANI et al., 2015). Sendo que Ras é a proteína mais mutada em tumores sólidos (cerca de 30%) e sua regulação é um evento celular complexo e dependente de vários fatores: qual a isoforma ativada; para qual via de sinalização esse estímulo será decodificado e, como consequência, quais efetores serão mobilizados nessa resposta. Nos últimos anos, houve um grande avanço nessa área, mas ainda há muito a ser descoberto sobre a regulação e controle da atividade desse grupo de proteínas (OVERMEYER; MALTESE, 2011).

1.2 Proteína Ras

A descoberta de Ras, em 1985, se deu pelo estudo de retrovírus de diferentes organismos capazes de induzir uma rápida formação de sarcomas em ratos, de onde originou o nome da proteína Ras, do inglês, *Rat Sarcoma virus* (COX; DER, 2010). Ras é pertencente à superfamília de proteínas Ras, a qual é subdividida em proteínas Ras, Rho, Ast/Sar, Ran e Rab. Todas estas são proteínas GTPases monoméricas, as quais apresentam um estado ativo ligado a GTP e um estado inativo ligado à GDP, a alteração entre esses estados é dependente da ação de dois grupos de proteínas: as GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*) e as GAPs (*GTPase activating proteins*). Proteínas Ras funcionam como comutadores celulares estando relacionadas à transdução de sinal extracelular por sua interação com receptores de membrana, seguido pela ativação de diferentes cascatas de sinalização que levam ao controle da proliferação, diferenciação, morfologia e apoptose (ALBERTS et al., 2014; HENNIG et al., 2015).

Existem três isoformas da proteína Ras em mamíferos, H-, K- e N-Ras, as quais compartilham as propriedades bioquímicas de seus domínios Gs e estes apresentam 90% de identidade entre si. O domínio G, presente na porção N-terminal das proteínas Ras é normalmente dividido em duas partes, uma região alostérica e uma efetora, também chamadas de *switch I* e *II*, respectivamente, e onde o *switch* I é a região de interação a GTP (Ras-GTP)(Figura 3). Na região C-terminal hpa a sequência CAAAX, na qual C representa uma cisteína, A e AA representam aminoácidos alifáticos, geralmente valina, leucina ou isoleucina, e X pode variar, mas em sua grande maioria, é uma posição ocupada por metionina ou serina. Modificações pós traducionais, como adição de grupos isoprenos, num processo de farnesilação, que aumentam as propriedades hidrofóbicas da proteína e facilitam a interação dela à face interna da membrana plasmática. Nessa região a isoforma N-Ras apresenta, por exemplo, a sinalização para sua interação com endomembranas, o que não ocorre com as outras isoformas (BOS, 2018; PARKER; MATTOS, 2018; ZHOU et al., 2018).

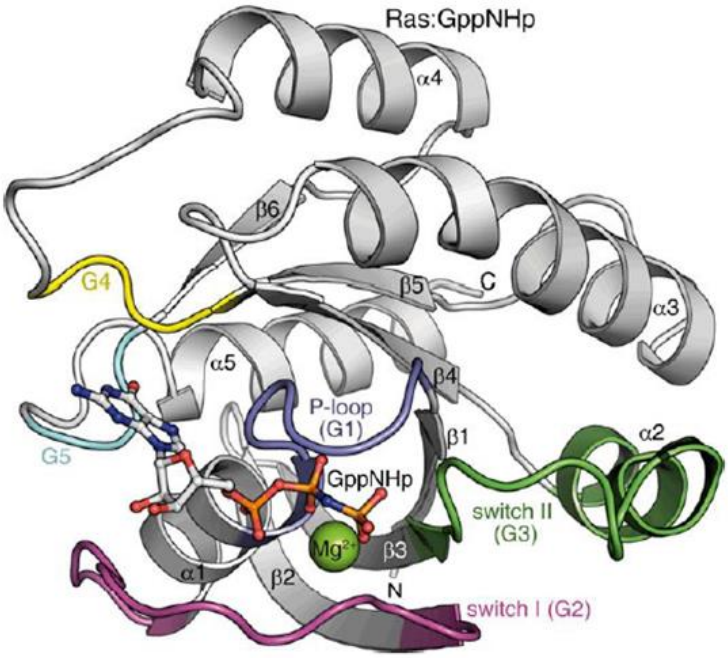

Figura 3 Estrutura tridimensional de H-Ras interagindo a um análogo de GTP (GPPNHp)

Diferentes regiões da proteína estão marcadas e representam a região de alça-P (G1), região de *switch* I (G2), região *switch II*(G3), além das regiões de reconhecimento de guanina (G4 e G5) (ITZEN; GOODY, 2011).

O domínio G é altamente conservado dentre o grupo metazoa, por exemplo, o domínio de interação de H-Ras de humano apresenta 82 e 86% de identidade com os ortólogos em *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans,* respectivamente (ALEXANDER, 2012). Em *D. melanogaster* a ativação de um receptor de tirosina quinase culmina na ativação de Ras, cuja atividade é essencial à diferenciação das células fotorreceptoras precursoras do olho. Enquanto que, em *C. elegans,* o ortólogo de Ras, chamado de Let-60, está envolvido na diferenciação da vulva, um órgão ectodermal que tem conexão com o sistema reprodutivo interno e que se desenvolve após a fase de diferenciação embrionária (ALBERTS et al., 2014). Assim como nesses organismos, em mamíferos, mutações nos receptores de membranas associados a ativação de Ras, GAPs, GEFs e às próprias proteínas Ras, acarretam em uma perda da capacidade de controle de ativação e/ou inativação das proteínas Ras, consequentemente, ocorre a quebra da homeostase celular. A ativação

constitutiva da proteína Ras e como consequência da via Ras/MAPK está associada a um grupo de patologias ao qual pode ser dado o nome de RASopatias. Como, por exemplo, a neurofibromatose do Tipo 1 e várias síndromes de desenvolvimento humanas, como: Noonan; Legius; Costello e a síndrome linfoproliferativa autoimune IV (FERNÁNDEZ-MEDARDE; SANTOS, 2011; SIMANSHU et al., 2018).

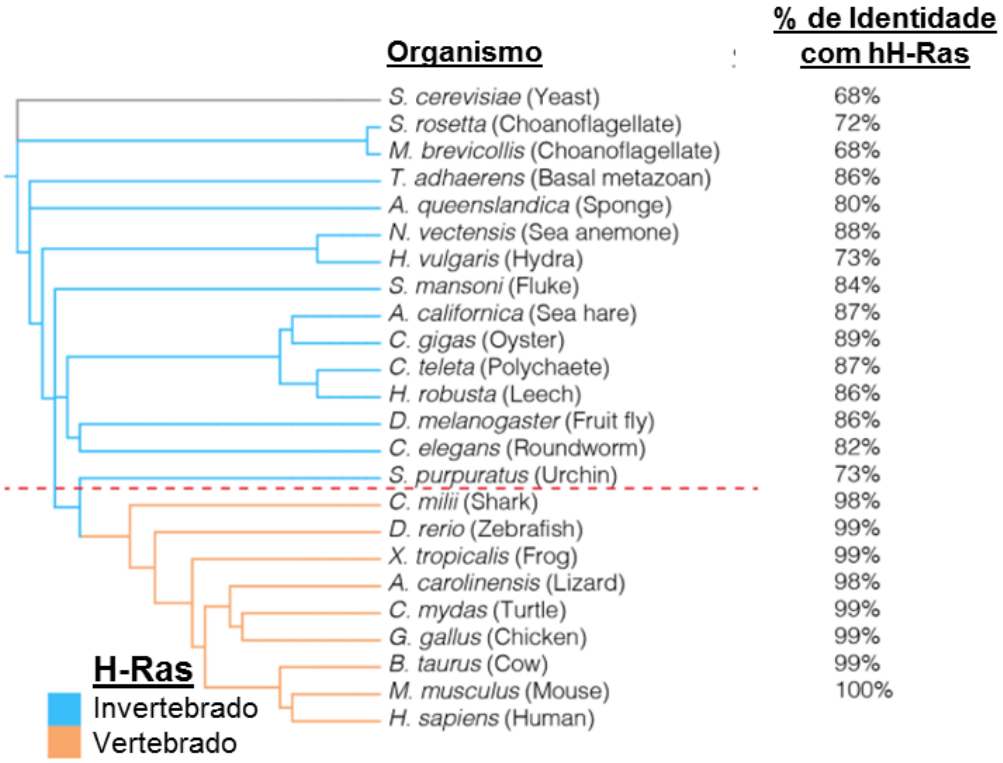

Figura 4 Conservação do domínio GTPase de H-Ras

H-Ras apresenta um alto nível de conservação de sequência dentro de metazoa, a esquerda a árvore que mostra a conservação e a direta os níveis de identidade das sequências do domínio de H-Ras de diferentes organismos comparados com a sequência apresentada pela proteína humana (hH-Ras) (Adaptado de Alexander *et al,* (ALEXANDER, 2012)).

Em câncer Ras foi o primeiro oncogene descrito e, como dito anteriormente, está mutada em cerca de 30% dos tumores sólidos, frequentemente sendo associado a um pior prognóstico. O número de mortes de pacientes de tumores que apresentavam mutações KRas, por exemplo, é de aproximadamente um milhão por ano, números similares à doenças como malária e tuberculose. Sozinha, segundo dados do cBioPortal, mutações *missense* nessa isoforma

representa 85% das mutações em Ras, seguida por 12% em N-Ras e 3% em H-Ras. As isoformas mutadas podem estar relacionadas com a origem do tumor, onde há uma correlação maior de mutações em K-Ras em câncer coloretal, carcinoma pancreático e pulmonar de células não pequenas (NSCLC - *non-small-cell lung câncer)*; mutações de H-Ras em câncer de pele e de cabeça e pescoço; e de N-Ras em malignidades hematopoiéticas (MANUSCRIPT, 2013).

Em melanoma, o trabalho do Akbani *et al* (2015) mostrou que 90% das amostras analisadas apresentavam algum tipo de alteração na via RAS/RAF/MAPK. As proteínas RAF, as principais efetoras de Ras, são representadas por três proteínas, ARAF, BRAF e CRAF, também chamada de RAF1, que estão envolvidas com a transdução de sinal na via MEK/ERK. Comentamos sobre melanoma e BRAF anteriormente, onde BRAF apresentou em 52% dos casos analisados a variante mutada $BRAFV^{600}$ essa variante aparece como relevante em câncer de ovário, de colón e de tireoide (LAVOIE; THERRIEN, 2015).

As proteínas Ras podem interagir com vários efetores na célula dentre eles as GAPs, como RalGDS; reguladores negativos de suas atividades como p120GAP; e um grande grupo de efetores, como é o caso das proteínas RAF, além de MEKK e PI3K (COX; DER, 2010; ENGIN et al., 2017). Na Figura 5, temos o KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) das vias de sinalização reguladas por Ras, nele podemos observar a abrangência de processos celulares regulados por essa proteína, além da gama de moléculas efetoras que atuam regulando sua função. A interação de Ras com outras vias, como p53, não está completamente elucidada. Na verdade, há alguns dados que demonstram a participação de Ras na modulação de morte celular. Por exemplo, H-Ras é um regulador crucial em processos de apoptose mediada por receptores. Diferentemente de K-Ras, H-Ras é capaz de inibir a apoptose mediada por TRAIL, atuando na supressão da expressão dos receptores DR4 e DR5 na membrana das células (CHEN et al., 2014). Além disso, essa mesma isoforma de Ras pode interagir com membros anti-apoptóticos da família BCL-2, o que sensibiliza as

células a apoptose pela via intrínseca, uma vez que facilita a resposta gerada pela migração de Bax e Bak à membrana da mitocôndria (DENIS et al., 2003).

Vavvas e colaboradores (1998) identificaram por sistema duplo-híbrido de levedura um novo efetor de Ras, NORE1. Em seu trabalho eles mostraram que esta proteína interage com Ras:GTP através de um domínio RA (*RalGDS/AF6 Ras association domain*) presente na porção C-terminal da proteína. NORE1 interage com as quinases MST(KHOKHLATCHEV et al., 2002), proteínas chave da via Hippo também conhecida como via Salvador/Warts/Hippo, é responsável pelo controle do tamanho dos órgãos de animais através da regulação da proliferação e indução da apoptose. A ação de RASSF5 na regulação de Ras permite a conexão de Ras à via Hippo. Interessantemente, os principais efetores da indução de morte celular regulada pro Ras são membros da família RASSF (DONNINGER et al., 2017).

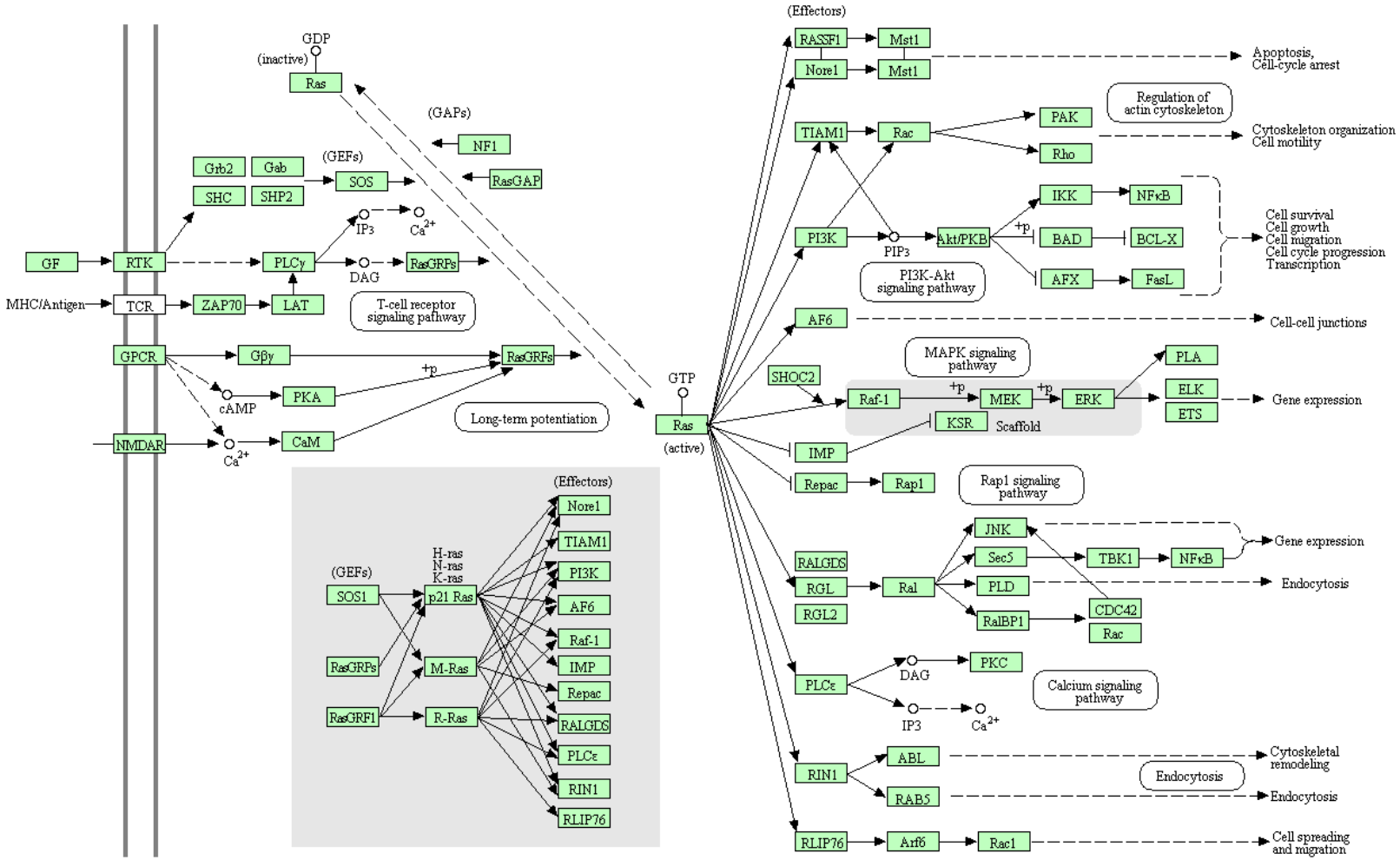

Figura 5 KEGG das vias de sinalização reguladas por Ras
KEGG obtido a partir de https://www.genome.jp/kegg/kegg2.html. À direita temos os processos celulares regulados por Ras.

1.3 Família RASSF

A família de proteínas RASSF (*Ras-ASSociation Domain Family-RASSF*), é um grupo de proteínas que conservam entre si um domínio de associação a proteína Ras (*RalGDS/AF6 Ras association domain - RA domain).* De acordo com a posição do domínio RA os membros dessa família são classificados em C-terminais (em humanos RASSF1-6) e N-terminais (em humanos RASSF7-10) (

Figura 6) (DONNINGER et al., 2016; VOLODKO et al., 2014). Como nenhum desses membros apresenta domínios enzimáticos conhecidos, aparentemente atuam como proteínas *scaffold,* podendo se ligar a diferentes proteínas independentes ou a complexos proteicos. Além do domínio RA, as proteínas pertencentes ao grupo C-terminal, também apresentam um domínio SARAH (*Salvador-RASSF-Hippo*) o qual está envolvido com homo e heterodimerização das isoformas de RASSF e como outras proteínas que também apresentam esse domínio, como as proteínas Mst1/2 (*macrophage-stimulating 1*) (BITRA et al., 2017; SÁNCHEZ-SANZ et al., 2016).

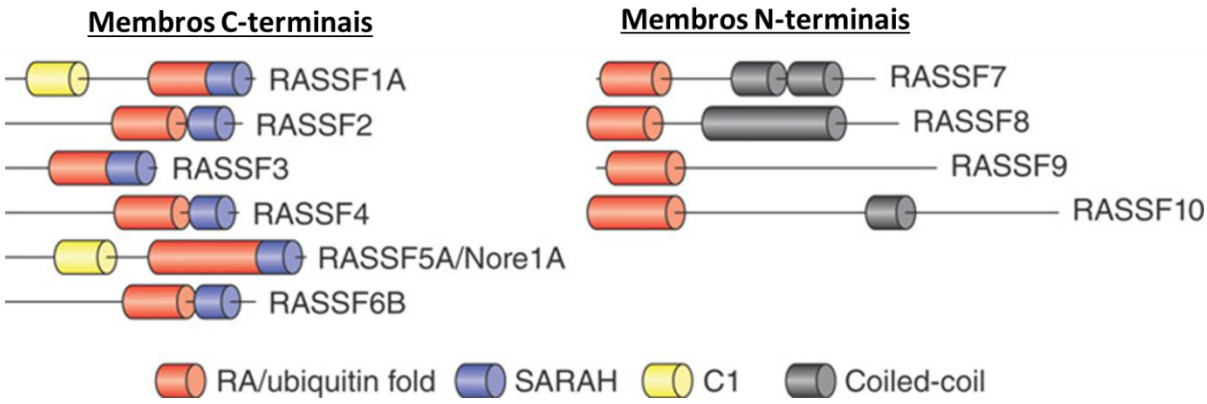

Figura 6 Estrutura dos membros da família RASSF

A família RASSF consiste no grupo C-terminal (RASSF1-6) e no N-terminal (RASSF7-10). Ambos grupos apresentam o domínio RA (em vermelho), o primeiro ainda e o domínio SARAH (em azul). No grupo N-terminal, ainda temos a região *coiled-coil* (cinza). RASSF1 e RASSF5 ainda apresentam um domínio rico em cisteínas (C1 em amarelo).

As proteínas do grupo N-terminal não apresentam o domínio SARAH, mas a elas são preditas regiões *coiled-coil* na porção C-terminal, essas região apresentam estruturas α-hélices ricas em aminoácidos hidrofóbicos, como isoleucina, leucina e valina. Que podem atuar na oligomerização de proteínas e no caso de RASSF7 também auxilia na regulação da sinalização da via Hippo (ZHENG et al., 2017).

O próprio nome da família sugere sua interação com as proteínas Ras e muitos dos seus membros podem atuar interagindo com Ras ou outras GTPases *in vitro* (RODRIGUEZ-VICIANA; SABATIER; MCCORMICK, 2004). Como comentado, NORE1 foi capturada em ensaios de duplo-hibrido por sua interação com Ras (VAVVAS et al., 1998). RASSF1 e NORE1, apresentam 60% de similaridade e uma alta identidade de sequência, por conta disso, NORE-1, foi transferida à família proteica RASSF se tornando o membro 5 (RASSF5) (KHOKHLATCHEV et al., 2002). Assim como NORE-1, RASSF1 também é capaz de conectar Ras a indução de apoptose pela via Hippo (OH et al., 2006). A regulação da via Hippo pelas proteínas RASSF pode ocorrer por diferentes mecanismos e até agora todos as proteínas da família são capazes de interagir com membros da via. O mais comum é pela interação e consequente ativação das proteínas Mst1 e Mst2, onde acredita-se que dois mecanismos são concomitantes. O primeiro, na formação do heterodímero Mst:RASSF há um impedimento da fosforilação e ativação do fator de transição FoxO (*forkhead box O*), uma vez que este só é ativada pela formação de homodímeros de Mst:Mst. No segundo mecanismo, a formação do heterodímero Mst:RASSF é necessária no sequestro da forma inibitória de Mst para o citoplasma, isso deixa livre a forma ativa a formar homodímeros no núcleo e para a fosforilação da histona H2B (BITRA et al., 2017; HAURI et al., 2013). RASSF3, por exemplo, é capaz de regular a via Hippo pela sua interação com o complexo STRIPAK (*Striatin-interacting phosphatase and kinase*) o qual tem se visto um importante regulador da formação de diversos tipos de câncer por controlar proliferação e a indução de apoptose (SHI; JIAO; ZHOU, 2016).

Dammann e colaboradores (2000) identificaram RASSF1 durante a busca pelo gene supressor de câncer de pulmão presente *locus* 3p21.3. Nesse trabalho, as três isoformas de RASSF1 (A-C) foram identificadas e observou-se que as isoformas A e C são expressas em todos os tecidos sadios. Enquanto que, apenas RASSF1A encontra-se suprimido em quase 50% das amostras de câncer de pulmão analisadas. Essa supressão se dá pela metilação das ilhas CpG presentes no promotor do gene. Fenótipo acabou também sendo observado em câncer de mama, rim e carcinoma nasofaríngeo e acredita-se que RASSF1 é o supressor de tumoral que mais frequentemente apresenta essa alteração epigenética (DONNINGER et al., 2016; GORDON; BAKSH, 2011; RICHTER et al., 2015).

O processo de metilação pode ser descrito como uma ligação covalente de um grupamento metil em citocinas do DNA, preferencialmente ocorrendo em CpGs dinucleotídeos. Regiões de 200 a 3000 bp que apresentam mais de 50% de conteúdo CG, são chamadas de ilhas CpGs, estas quando estão em regiões promotoras e sofrem hipermetilação, acabam por impedir a expressão do gene regulado pelo promotor (KADER; GHAI; MAHARAJ, 2018). A hipermetilação de regiões promotoras é um fenômeno comum em câncer para a depleção da expressão de genes supressores tumorais e é o principal mecanismo para abolição dos membros de RASSF, como RASSF10 e RASSF6 em leucemia infantil, o primeiro ainda está suprimido em câncer gástrico, sarcoma, mama, pâncreas e de pulmão. RASSF6 também foi vista suprimido em melanoma, leucemia linfoblástica e neuroblastoma (CHAN; KATAN, 2013; MEZZANOTTE et al., 2014; RICHTER et al., 2015; RICHTER; WALESCH; DAMMANN, 2016; RICHTER; WALESCH; WU, 2012; YOUNESIAN et al., 2017).

1.3.1. Membros C-terminais

Dentro da família RASSF os membros mais estudados são RASSF1 e RASSF5. Sendo que a sua supressão de RASSF1 está envolvida com a tumorigênese mediada por Ras mutada em câncer de pulmão. Além disso, ela apresenta uma forte interação com K-Ras, conectando essa forma de Ras com vias pró-apoptóticas, com sua interação com Mst, que pode acarretar na fosforilação de YAP (*yes-associated protein 1*) e TAZ (*Tafazzin*) resultando em sua acumulação no citoplasma e que induz a apoptose. RASSF1 também pode se ligar à proteína MOAP-1 (*Modulator of apoptosis 1)* a qual ativa a proteína Bax, um importante indutor da via de apoptose (DONNINGER et al., 2017; GORDON; BAKSH, 2011; SCHMIDT et al., 2018; VOS et al., 2000).

Modelo de animais nocautes de RASSF1A ou que apresentam apenas uma cópia desse gene apresentam um aumento na formação espontânea de câncer de pulmão, principalmente, a partir de 18 meses (TOMMASI et al., 2005). Entretanto essa suscetibilidade a formação de tumores espontâneos é consideravelmente aumentada quando associada a variante mutada de K-Ras^{G12D}, nessa variante há a substituição de uma glicina por um aspartato (BOURNET et al., 2016), assim demonstrando que a atuação de RASSF1A é inibitório na carcinogênese (SCHMIDT et al., 2018). Animais nocautes de RASSF1 apresentam maiores focos inflamatórios e um diminuição em sua capacidade de resolução da inflamação. Acredita-se que RASSF1A atue na regulação do processo inflamatório juntamente com K-Ras por um mecanismo ainda não elucidado (KITAJIMA; THUMMALAPALLI; BARBIE, 2016). RASSF1, bem como os outros membros do subgrupo C-terminal vem sendo relacionado ao controle da migração, atuando na dinâmica de microtúbulos, estabilização de β-catenina, no reparo a danos no DNA e por suas interações com a proteína Ras (ECKFELD et al., 2004; IWASA; HOSSAIN; HATA, 2018; IWASA; JIANG; HATA, 2015; KUDO et al., 2012; PARK et al., 2010; VOS et al., 2003).

A expressão de RASSF5 é abundante em tecidos saudáveis como cérebro, pulmão, fígado, rim e próstata. Assim como RASSF1, a expressão de RASSF5 em

tumores é diminuída por metilação da região promotora do gene, o que indica uma função de supressor tumoral em hepatocarcinoma, câncer coloretal, osteosarcoma, carcinoma folicular de tiroide e neurobastoma (LI et al., 2017; PARK et al., 2010; RICHTER et al., 2015). RASSF5 interage com diversos membros da família Ras e pode conectar esse grupo ao controle da senescência. A senescência é um processo celular regulado por duas principais vias, a via de p53 e pela via da proteína que regula a progressão no ciclo celular, a proteína do retinobastoma (RB). Vários tumores, incluindo melanoma modulam ambas as vias para impedir a ativação do processo de senescência celular, sendo assim, as células não perdem sua capacidade de divisão (BENNETT, 2016; MACKENZIE ROSS et al., 2013). RASSF5 atua como um conector da via de Ras ao processo de senescência, uma vez que é capaz de interagir com as duas proteínas centrais da regulação da senescência celular, com o sequestro de p53, para o citoplasma e, como consequência bloqueando a expressão de genes envolvidos no processo de senescência; e com RB interagindo diretamente com essa proteína e PP1A (*Protein phosphatase 1 A*) o que ativa RB e induz o processo de senescência (BARNOUD; DONNINGER; CLARK, 2016; CALVISI et al., 2009; KOTURENKIENE et al., 2017). RASSF5 também é capaz de controlar a indução de apoptose via Ras, como comentado anteriormente, entretanto isso pode ocorrer por outros mecanismos. A superexpressão de RASSF5 é capaz de sensibilizar as células ao tratamento com anticorpos α-TNF, resultando em apoptose mediada por TRAIL e consequente indução da apoptose pela via extrínseca (PARK et al., 2010).

Dentre os outros membros do grupo C-terminal, RASSF2 regula, via K-Ras, a atividade de PAR-4, um receptor de proteína G expresso majoritariamente em pulmão, tireoide e pâncreas e que está envolvido com a indução de apoptose. Curiosamente, a expressão de RASSF2 em câncer de tireoide é suprimida por metilação da região promotora (SCHAGDARSURENGIN et al., 2010; VOS et al., 2003). O complexo proteico formado por RASSF3 também é regulado por K-Ras e a sua superexpressão inibe a proliferação celular e induz a apoptose. Em câncer de pulmão de células não-pequenas com supressão da expressão de RASSF3 apresenta maior agressividade, entretanto o mecanismo desse processo ainda

não foi elucidado. Além disso, RASSF3 parece estar envolvida na resistência de câncer de mama ao tratamento com Herceptina (FUKATSU et al., 2014; JACQUEMART; SPRINGS; CHEN, 2009; KUDO et al., 2012).

RASSF4 foi o quinto membro da família a ser identificado e apresenta cerca de 60% de similaridade com RASSF2 e, bem como RASSF1 em câncer de pulmão, sua depleção facilita na transformação de células via Ras em múltiplo mieloma (ECKFELD et al., 2004; SMEDT et al., 2018). O último membro do grupo C-terminal, RASSF6, se liga diretamente a K-Ras e é capaz de induzir a morte celular por diferentes mecanismos. RASSF6 é capaz de ativar Bax, que migra à membrana da mitocôndria e induz a liberação de citocromo c, que culmina na ativação efetoras e a indução do processo de apoptose (IKEDA et al., 2007; IWASA et al., 2013). A supressão de RASSF6 em adenocarcinoma do ducto pancreático e de câncer coloretal também está envolvida com um pior prognóstico e com a redução da sobrevida dos pacientes (YE et al., 2015; ZHOU et al., 2017).

Em suma, os membros do grupo C-terminal podem atuar majoritariamente na regulação da morte celular, mas também em processos de senescência, regulação do ciclo celular, migração e proliferação. Muitas de suas interações ocorrem pelo motivo SARAH presente na porção C-terminal da proteína (SÁNCHEZ-SANZ et al., 2016) a compreensão das proteínas de interação do grupo N-terminal poderá descrever novas funções a essa família proteica.

1.3.2 Membros N-terminais

Os membros do grupo N-terminal são os menos estudados da família RASSF. Eles não apresentam em suas sequências o domínio SARAH e a localização do domínio de interação a proteína Ras é na porção N-terminal da proteína. Há algumas diferenças de sequência entre os domínios RA dos dois grupos o que sugere que exista uma origem evolucionária distinta entre eles (UNDERHILL-DAY; HILL; LATIF, 2011). O primeiro gene identificado nesse grupo foi RASSF7 devido a proximidade de seu *locus* com o *locus* do gene de H-Ras. De modo similar, o *locus* de RASSF8 foi identificado também por sua proximidade ao *locus* da isoforma K-Ras. Essa região é chamada de Pas1 e está associada a formação de câncer de pulmão mediado por mutação de K-Ras (FALVELLA et al., 2006; SHERWOOD et al., 2010).

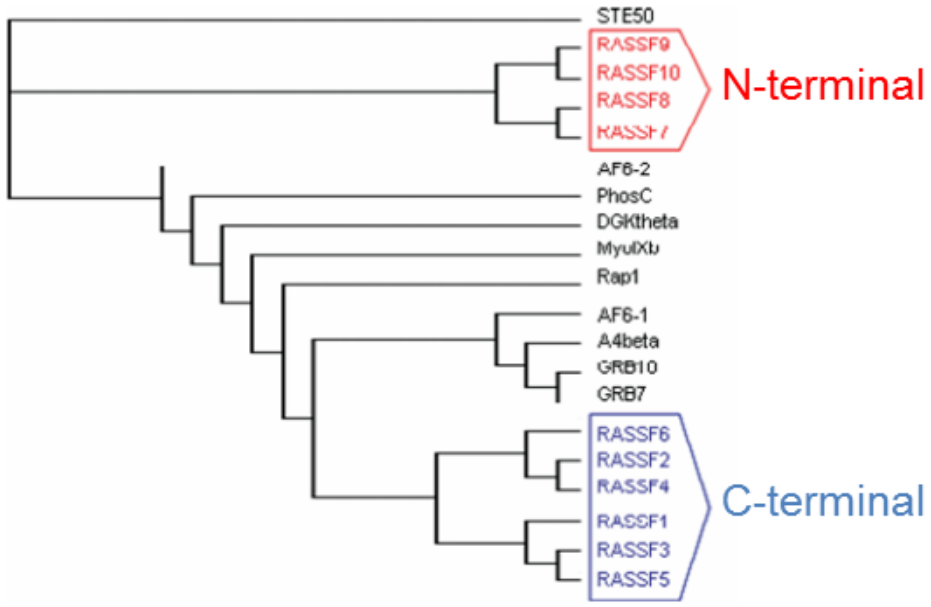

Figura 7 Os domínios RA dos grupos de RASSF são filogeneticamente distintos. Filogenia do domínio de interação a proteína Ras (RA) dos genes RASSF1-10. Outros dez domínios de interação a Ras foram também analisados (AF6 apresenta dois domínios distintos de interação a Ras) (adaptado de (SHERWOOD et al., 2010).

A astrogênese é um processo regulado por DISC1, através da modulação da vida RAS/MEK/ERK. Wang e colaboradores (2016) demonstraram que esse processo é mediado por RASSF7, o qual é ativado por DISC1 e transmite o sinal à Ras. RASSF7 vem sendo demonstrado como apresentando importantes funções em resposta à hipóxia, organização de microtúbulos, proliferação e controle da indução de apoptose (GULSEN et al., 2016; RECINO et al., 2010; SHERWOOD et al., 2008). Um trabalho recente, demonstrou que RASSF7 é capaz de interagir com Myc, impedindo a transformação oncogênica mediada por esse fator transcricional (KUMARASWAMY et al., 2018).

Diferentemente do observado para os membros C-terminais, em carcinoma de tireoide, os níveis de expressão de RASSF7 e RASSF8 aumentam de acordo com a progressão tumoral, o que sugere uma função de oncogene (LI et al., 2013). Já em melanoma, RASSF8 desempenha função oposta, ou seja, foi demonstrado apresentando uma função de supressor tumoral através do controle da proliferação mediante controle de NFκB. Similar aos membros C-terminais da família, em melanoma, RASSF8 tem sua expressão suprimida durante a progressão tumoral (DALLOL et al., 2005; LOCK et al., 2010; UNDERHILL-DAY; HILL; LATIF, 2011; WANG et al., 2015b). A via NFκB também é utiliza por RASSF8 para controlar a proliferação de células de câncer de pulmão, no qual, essa proteína ainda está relacionada sua formação (FALVELLA et al., 2006; LOCK et al., 2010).

RASSF10 apresenta em sua região promotora uma grande ilha CpG, a qual está hipermetilada em câncer gástrico e coloretal, carcinoma hepatocelular, pulmão, tireoide e leucemias (GUO et al., [s.d.]; HILL et al., 2010; JIN et al., 2015; LI et al., 2014; PHYSIOLOGY, 2017; XUE et al., 2016). Em gliomas essa inativação aparece como um dos passos para a transformação celular (HILL et al., 2010). Similar a RASSF7, RASSF10 aparece com localização dispersa pelo citoplasma da célula, se concentrando nos polos do fuso mitótico durante a divisão celular, sugerindo um envolvimento com a divisão celular nas regiões (UNDERHILL-DAY; HILL; LATIF, 2011). Pouco se sabe a respeito das interações

de RASSF10, acredita-se que regule a ação de p53 em células de câncer de tireoide (WANG et al., 2015a).

1.3.3 RASSF9

RASSF9 foi identificada em ensaios de duplo-híbrido por sua interação com o domínio citoplasmático da proteína PAM (*peptidylglycine α-amidating monooxygenase*). PAM é uma proteína transmembrana encontrada em neurônios e células endócrinas, que catalisa a α-amidação, uma modificação essencial para a atividade de peptídeos bioativos como oxitocinas e vasopressina (CHEN; JOHNSON; MILGRAM, 1998). Inicialmente ela foi chamada de P-CIP1 ou PAMC1, por sua interação com o domínio que está localizado em vesículas secretórias. Posteriormente, por similaridade de sequência com RASSF7 e RASSF8, essa proteína foi renomeada e transferida à família RASSF, passando agora a ser o membro 9 desse grupo (SHERWOOD et al., 2008).

Foi observado que os níveis de expressão de RASSF9 eram superiores aos da proteína com a qual ela interage, PAM, com RASSF9 sendo amplamente expressa em vários tecidos, com maior relevância no coração, pulmão, rim e pele (LEE et al., 2011). Isso sugere que há outras interações de RASSF9 independente de sua relação com a proteína PAM e que possa atuar em outras vias que não foram identificadas (CHEN; JOHNSON; MILGRAM, 1998; RAJAGOPAL et al., 2009). Como comentado anteriormente, outros membros da família RASSF são capazes de atuar em diferentes vias metabólicas (VOLODKO et al., 2014). Em células tronco cardíacas, RASSF9 aparece superexpressa, mesmo que não haja uma função até o momento relacionada a essa observação (SONG et al., 2015; WU et al., 2016; ZHANG et al., 2015).

A localização subcelular de RASSF9 após expressão ectópicas se dá enriquecida em endossomos, onde é capaz de interagir com H-, K- e N-Ras (RODRIGUEZ-VICIANA; SABATIER; MCCORMICK, 2004). Diferente de outros membros da família RASSF, RASSF9 não apresenta as ilhas de CpGs clássicas em seu promotor, entretanto, em 18% das amostras de feocromocitomas, tumores

da região medular das glândulas suprarrenais, há a supressão da expressão de RASSF9 por metilação (RICHTER et al., 2015). Dados sugerem que RASSF9 possa estar relacionado com formação de câncer coloretal e meningioma (IGLESIAS GÃ^{3}MEZ; MOSQUERA ORGUEIRA, 2014; SÁNCHEZ-TOMÉ et al., 2015).

Sabe-se que RASSF9 atua na via Hippo, interagindo com YAP e TAZ, de modo similar a RASSF1, além de participar da regulação do complexo ASPP-1 e -2 (*apoptosis stimulating proteins of p53*) durante a segregação cromossomal. ASPP-1 e -2 são importantes supressores tumorais e ASPP-2 tem se mostrado relevante na interação com PAR-3, um importante regulador de processos de polarização celular (HAURI et al., 2013; MECHTLER; KNOBLICH, 2003; ZHANG et al., [s.d.]). Processos de polarização celular são relevantes como guias para divisões assimétricas, as quais ocorrem em diversos organismos e que, em mamíferos, tem relevância na formação da derme. Nela, as células-tronco presentes na camada basal, sofrem um processo de divisão no qual o fuso mitótico ocorre numa posição perpendicular à da camada basal. Essa divisão é um processo essencial para o inicio da diferenciação dos queratinócitos e na manutenção de uma camada basal de células não diferenciadas responsáveis por manutenção e renovação do tecido epitelial (DEGREGORI et al., 2005; JIA et al., 2016; MECHTLER; KNOBLICH, 2003).

A manipulação gênica de RASSF9 em camundongos demonstrou que após seis semanas de nascimento, apenas 10% de animais duplo-nocaute são viáveis. A redução da expectativa de vida foi de encontro ao observado com sinais de envelhecimento precoce. A pele desses animais apresentou hiperplasia e os queratinócitos perderam a capacidade de diferenciação. A ausência das etapas iniciais da diferenciação é uma das consequências da não polarização celular das residentes da camada basal e também, por estas não terem realizado divisões. Todos esses fenômenos em associação indica o papel crucial de RASSF9 na homeostase dermal (LEE et al., 2011).

Kita e colaboradores (2016) avaliaram e compararam o nível de expressão gênica de um grande número de amostras de pele humanas agrupadas de acordo

com sua taxa de exposição solar. Curiosamente, RASSF9 foi identificado como um gene cuja expressão é induzida frente à exposição contínua a raios UV, como a luz solar. Esses dados demonstram que a cor da pele não é a única forma de adaptação a luz solar e que há um controle no nível de expressão gênica induzido pela exposição solar.

Levando em consideração as informações expostas, a nossa hipótese é que RASSF9 pode apresentar importantes funções no estabelecimento e progressão do melanoma. Para responder isso, utilizamos da técnica de genética reversa através de CRISPR/Cas9 para nocautear o gene de um linhagem de melanoma não-metastático. Após isso, partimos para ensaios *in vivo* e *in vitro* para determinar as alterações comportamentais derivadas da depleção de RASSF9.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Levando em consideração a ausência de informações a respeito do papel e RASSF9 em melanoma, temos por objetivo elucidar essa questão, considerando diferentes aspectos do comportamento tumoral.

2.2. Objetivos Específicos:

2.2.1. Determinar o perfil de expressão de RASSF9 em Melanoma humano e murino

- Analisar dados *in silico* sobre o estado de RASSF9 em amostras de melanoma;
- Determinar o nível de expressão de RASSF9 em linhagens de melanoma murino;

2.2.2. Desenvolver uma linhagem de melanoma nocaute de RASSF9

- Clonar em vetor lentiviral sequências de sgRNA para nocaute de RASSF9 através de CRISPR/Cas9;
- Transduzir células da linhagem TM1 de melanoma murino e selecionar populações clonais deficientes para RASSF9
- Confirmar a deficiência dos clones por análise de DNA e proteína;

2.2.3. Determinar as funções de RASSF9 *in vitro*

- Determinar as alterações provenientes do nocaute na proliferação celular;
- Compreender o papel de RASSF9 na resposta à indução de morte celular;
- Verificar a existência de alteração nos níveis de expressão de proteínas ligadas a diferentes vias de sinalização;
- Determinar alterações na capacidade de migração decorrentes do nocaute de RASSF9;
- Avaliar se a RASSF9 está envolvida no crescimento de esferoides;

2.2.4. Elucidar o papel de RASSF9 no crescimento *in vivo* de melanoma

- Verificar o perfil de crescimento *in vivo* da linhagem de melanoma TM1, após o nocaute de RASSF9;

3. Metodologia

3.1. Linhagens celulares e condições de cultivo

Neste trabalho utilizamos a linhagem de melanoma murino, Tm1, células transformadas após o impedimento de adesão ao substrato de melanócitos da linhagem Melan-a (OBA-SHINJO et al., 2006). Em nosso laboratório, a linhagem Tm1 foi modificada afim de expressar luciferase, passando então a ser chamada de Tm1.Luc, durante o projeto de mestrado da Msc. Priscilla Cabral (Dados não publicados). Tm1.Luc foi cultivada com meio RPMI-1640 (Thermo Fisher), suplementado com 5% de soro bovino fetal (SBF- Thermo Fisher), 2mM de L-Glutamina (L-Glut- Thermo Fisher) e 100 µg/mL dos antibióticos penicilina e estreptomicina (Thermo Fisher). B16-F0 e B16-F10 foram cultivados com meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SBF (Thermo Fisher), 2mM de L-Glutamina (L-Glut- Thermo Fisher) e 100 µg/mL dos antibióticos penicilina e estreptomicina (Thermo Fisher). A linhagem HEK293T foi cultivada com meio DMEM (Thermo Fisher) suplementado com 10% de SBF (Thermo Fisher), 2mM de L-Glutamina (L-Glut- Thermo Fisher) e 100 µg/mL dos antibióticos penicilina e estreptomicina (Thermo Fisher). Todas as linhagens foram mantidas em estufa de cultivo à 37°C sob 5% de CO_2.

Repiques foram realizados quando as células se encontravam com cerca de 80% de confluência nas garrafas de cultivo, sendo desaderidas das garrafas com tripsina, contadas e adicionadas em uma concentração de $2x10^3$células/cm^2 em novas garrafas. As células foram mantidas a uma viabilidade de mínima de 90% confirmadas por coloração com azul de Trypan 0,2% e contagem em câmera de Neubauer.

3.2. Camundongos e Declaração Ética

Neste trabalho utilizamos camundongos isogênicos C57BL/6 fêmeas adultas, com idade entre 8 e 12 semanas, provenientes do Biotério de Experimentação do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Esses foram mantidos em estantes ventiladas com água e ração *ad libitum*, em condições livres de patógenos.

O estudo foi conduzido sob o protocolo número 61/2015 de acordo com as recomendações da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA/ICB-USP). Todos os procedimentos foram desenvolvidos seguindo as recomendações para minimizar o estresse e/ou dor dos animais.

3.3. Extração e Uso de Ácidos Nucleicos

3.3.1. Extração de RNA

As diferentes linhagens utilizadas neste trabalho, Tm1.Luc, Melan-a, B16-F0, B16-F10 e as linhagens RASSF9 deficientes produzidas neste trabalho e descritas abaixo, foram submetidas aos procedimentos descritos neste tópico e nos subsequentes da mesma sessão (3.3).

Garrafas de cultivo com as linhagens celulares citadas acima e apresentando cerca de 70% de confluência foram lavadas com PBS1 X, desaderidas com auxílio de tripsina, coletadas e centrifugadas por 5 minutos a 500 *x* g. O pellet formado foi então ressuspendido em meio de cultivo e após contagem, $1x10^6$ células foram separadas, centrifugadas a 500 *x* g e o pellet ressuspendido em 500 µL de TRIzol™ reagent (TermoFisher). Essa solução, em alguns casos foi congelada imediatamente em freezer -80°C.

No momento da extração, as amostras congeladas foram descongeladas em gelo e foi adicionado 100 µL de clorofórmio. Após homogeneização, as amostras foram deixadas a temperatura ambiente por 3 minutos. Em seguida, essas foram centrifugadas a 12.000 x g a 4°C por 15 minutos. Três fases são obtidas nesse momento, das quais a fase superior é a qual está presente o RNA.

Assim sendo, a fase superior foi coletada, e a ela 250 µL de isopropanol foram adicionados. As amostras foram vortexadas e mantidas e temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, foram centrifugadas a 12.000 x g por 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e ao pellet adicionamos 500 µL de etanol gelado 75% e repetimos a etapa de centrifugação, agora a 7500 x g por 5 minutos a 4°C. Essa etapa com etanol foi repetida mais duas vezes e, ao final, após remoção do excesso de etanol, aguardou-se que todo o etanol tivesse sido

evaporado. Ao verificar que a evaporação, às amostras foram adicionados 20 µL de H_2O DNAse free/RNAse free e incubadas a 60°C por 10 minutos. Decorrido esse tempo, amostras foram imediatamente colocadas em gelo e quantificadas no Nanodrop 2000 (ThermoFisher).

3.3.2 Síntese de cDNA

Para a síntese do cDNA foi utilizado o RNA extraído seguindo os passo do tópico 3.3.1., foi utilizado a enzima ImProm-II™ Rever Transcripase (Promega) seguindo as recomendações do fabricante. Para tanto, 2 µg de RNA foram acrescidos 0.5 µg de oligo(dT) 12-18 (TermoFisher) em solução de volume total de 10 µL. Essas amostras foram incubadas a 70°C por 5 minutos e em seguida por mais 5 minutos em gelo. A essa solução foi adicionado o volume para 1X do *ImProm-II reaction buffer*, 3mM de $MgCl_2$ 0.5mM de cada dNTP e 1µL da enzima ImProm-II™ Reverse Transcriptase. A solução de volume final de 20 µL foi incubada por 1 hora a 42°C e, em seguida, a enzima inativada por incubação a 70°C por 15 minutos. O produto foi estocada a -20°C até o momento de sua utilização na PCR em tempo real.

3.3.3. Reação de qPCR

Após a conversão do mRNA em cDNA, essas reações foram utilizadas na determinação do nível de expressão de diferentes genes. RASSF9, β-actina foi utilizados como controles endógenos. A Tabela 1 apresenta a sequência dos *primers* utilizados para a análise de cada gene e também a concentração utilizada de cada um nas reações de qPCR.

Tabela 1 Sequência de *primers* utilizados na qPCR

Nome	Sequência do *primer*	Concentração
actina F	5´CAACGAGCGGTTCCGATG 3´	400nM
actina R	5´GCCACAGGATTCCATACCCA 3´	400nM
q rassf9 F	5' GGGGGACAGTCTTCACGAGC 3'	600nM
q rassf9 R	5' CACGTACATGTCCCTGCCGT 3'	600nM

Os primers foram desenhados com auxílio da ferramenta online Primer Blast e as concentrações descritas foram designadas a partir da concentração com melhor curva de melting.

Para tal avaliação, 6.5µl de SYBR Green PCR Master Mix (TermoFisher), 100 ng de cDNA e a concentração padronizada de cada par de *primer*, o volume foi ajustado com H_2O DNAse/RNAse *free* para 12.5 µl. Utilizamos os valores do *threshold cycle* (CT) de cada amostra dos valores obtidos de de cada amostra, obtido na fase exponencial da reação. Assim, esses valores foram utilizados para os cálculos 2-ΔΔCt, no qual os valores foram normalizados pelo *housekeeping* β-actina.

3.3.4. Extração de DNA genômico

O DNA celular foi extraído e encaminhado para o sequenciamento e análise para determinação das mutações geradas após a técnica de CRISPR/Cas9. Para tal, as células foram submetidas ao mesmo procedimento inicial de extração de RNA com trizol (3.3.1). Porém, após a adição de clorofórmio e centrifugação, a fase superior foi desprezada e 300 µL de etanol 100% foram adicionados, homogeneizado e, em seguida, as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 3 minutos.

Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 2000 x g a 4°C por 5 minutos para a sedimentação do DNA. O pellet das amostras foi lavado duas vezes com 500 µL de 100 mM de citrato de sódio em 10% etanol (pH 8.5) e incubados por 30 minutos a temperatura ambiente com inversão temporária. Seguidas por centrifugação a 2000 *x* g a 4°C por 5 minutos. Posteriormente, as amostras foram ressuspendidas em 1.5 mL de etanol 75%, incubadas por 20 minutos e centrifugadas a 2000 x g a 4°C por 5 minutos. O pellet, após evaporação do etanol, foi ressuspendido em 400 µL de 8 mM NaOH. As amostras foram, em seguida, centrifugadas por 10 minutos a 12.000 x g a 4°C para a remoção de materiais insolúveis. A solução transferida para um novo tubo e utilizada na quantificação de DNA, a qual foi realizada no Nanodrop 2000 (ThermoFisher).

3.3.5. Extração de DNA Plasmidial

Após crescimento em meio LB, sob agitação constante por 18 horas a 37ºC, a cultura foi centrifugada a 8.000 x g por 2 minutos. A extração de DNA

plasmidial foi procedida de acordo com as instruções do kit QIAprep Miniprep (Qiagen), o qual é baseado na lise alcalina seguido por adsorção em sílica na presença de alta concentração de sal.

3.3.6. PCR convencional

Os *primers* da Tabela 2 foram utilizados na amplificação dos fragmentos de DNA a serem encaminhado para sequenciamento, foram amplificadas amostras provenientes de gDNA e de DNA plasmidial, além de PCR de colônia para determinar a inserção de plasmídeos recombinantes nas células competentes durante a clonagem. Foram utilizados 200 ng de DNA em solução e para o PCR de colônia, com auxílio de um palito estéril uma parcela das colônias foram transferidas aos tubos de 0.2mL. O DNA foi então adicionado a uma reação utilizando os seguintes reagentes (ThermoFisher): 10 µL de 10X buffer, 3.2 µL de $MgCl_2$ (50mM), 2.2 µL de cada primer forward e reverse, 1.1 µL de dNTPs (10mM), 1 µL de Taq polimerase. O volume da reação foi ajustado a 100 µL com H_2O DNAse free/RNAse free. As amostras foram incubadas em termociclador (EP S-Eppendorf) nas seguintes condições: 94°C por 10 minutos, 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 40 segundos, 72°C por 1 minuto, e ao final, 72°C por 4 minutos e mantidas a 4°C. A confirmação de amplificação se deu por eletrofose de DNA em gel agarose, conforme protocolo a seguir (Íten 3.3.7).

Tabela 2 Sequência de *primers* utilizados na PCR convencional

Nome	Sequência do *primer*
gR9 F	5' CCACTTGGACCGAGTAGGGA 3'
gR9 R	5' GTGAGCTGAACTCCTTGGCTA 3'
U6 F	5' GGGCAGGAAGAGGGCCTAT 3'

Os primers gR9 F e gR9 R foram utilizados em conjunto na amplificação do fragmento de DNA genômico a ser encaminhado para o sequenciamento. Enquanto que o primer U6 F foi utilizado nas reações de PCR de colônia e de PCR a partir da minipreparação plasmidial em conjunto com o *primer* sgRNA R de RASSF9.

3.3.6. Eletroforese de DNA em Gel de Agarose

A eletroforese em gel de agarose (1% e 2%) seguiu o descrito por Sambook e Russel(J. SAMBROOK, D.W. RUSSELL, 2001), onde a agarose é dissolvida em

TAE, o gel submerso no mesmo tampão e submetido a uma diferença de potencial (70 a 100 V) com amperagem constante. Para visualização do resultado, as moléculas foram coradas com brometo de etídeo 0,5 µg/mL por 20 minutos e visualizadas em transiluminador, com luz ultravioleta (260 nm).

3.3.7 Purificação do produto de PCR

Após confirmação da amplificação do DNA, as amostras foram purificadas com adição de um volume de solução 1:1 de fenol:clorofórmio, seguidas por centrifugação a 12.000 *x* g por 15 minutos, a 4°C. A fase superior foi coletada e a ela adicionado 200 µL de isopropanol, seguido por incubação à -20°C por uma hora. A centrifugação foi repetida e o sobrenadante foi removido. O pellet foi lavado com 200 µL de etanol 70% e, posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 12.000 *x* g por 15 minutos, a 4°C. Após evaporação do etanol, o pellet foi ressuspenso em 11 µL de TE. As amostras foram quantificadas e enviadas para Sequenciamento.

3.3.7 Reação de Sequenciamento

As amostras foram sequenciadas com a técnica de Sanger e a utilização de isótipos fluorescentes. Para tal, fizemos uma reação utilizamos o kit BigDye™ Terminator (Thermo Fisher) e 150ng de produto de DNA purificado, acrescido de 3.2pmol de *primer,* 2µL de BigDye e 1X de *Sequence Buffer.* Essa reação foi incubada em termociclador por 2 minutos a 96°C, seguido por 35 ciclos de 96°C por 45 segundos, 50°C por 30 segundos e 60°C por 4 minutos. O material foi purificado com adição de uma solução contendo 50% de etanol 100%, 3mM de acetato de sódio pH 5,2 e 1ng/ml de glicogênio. As amostras foram incubadas em gelo por 10 minutos, em seguida centrifugados por 4 000 *x g* por 20 minutos, o pellet lavado com etanol 70% gelado. Após repetir a centrifugação e o etanol ter evaporado, as amostras foram encaminhadas para o serviço de sequenciamento do Instituto de Química da USP, o qual utiliza o equipamento 3100 Avant Genetic Analyser (Thermo Fisher). Os resultados foram analisados com auxílio do programa BioEdit, e os múltiplos alinhamentos com a ferramenta ClustalW.

3.4. Marcação de proteínas específicas

3.4.1. Obtenção de extrato proteico

Um total de 10^6 células foi lavado com PBS 1X duas vezes com centrifugação por 5 minutos a 5000 *x* g. Após isso, foi adicionado ao pellet formado tampão de amostra para proteínas 1X, e foi submetido a incubação de 5 minutos a 95ºC. Armazenadas em freezer -20°C até o momento do uso.

3.4.2 Eletroforese de proteínas em gel de Poliacrilamida (*SDS Page*)

As amostras foram aplicadas, juntamente com o marcador de massa molecular de proteína *BenchMarck Ladder* (Invitrogen) em gel desnaturante de poliacrilamida (LAEMMLI, 1970) com soluções e concentração das mesmas discriminadas na Tabela 3. Os géis foram posteriormente submetidos a técnica de *Western blotting*.

Tabela 3 Preparo de gel *SDS-Page*

Soluções	Gel de empilhamento (5%)	Gel de Corrida (10%)
Acrilamida, estoque (33/0,9%)	0,7 ml	3,3 ml
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 (Concentração final de 400mM)	-	2,5 ml
Tris-HCl 1 M pH 6,8 (Concentração final de 120mM)	0,6 ml	-
H_2O	3,7 ml	4 ml
SDS 10% (concentração final 0,1%)	50 µl	100 µL
APS 10% (Concentração final 0.075%)	35 µl	100 µL
TEMED (concentração final 0,07%)	7 µl	4 µL
Volume final	**5 ml**	**10 ml**

3.4.3. *Western blot*

Para análise da expressão de proteínas específicas com auxílio de anticorpos, após a eletroforese em gel de poliacrilamida (3.4.2), as proteínas foram etetrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham HybondTM-C, GE Healthcare). A transferência foi realizada em tampão de transferência por 30 minutos com 30 V em sistema SemiDry (BioRad).

Posteriormente a transferência, a membrana foi corada com *Ponceau S* 0,1% em 1% ácido acético. Confirmando a transferência seguiu-se com o bloqueio por 1 hora a temperatura ambiente ou *overnight* a 4°C, sob leve agitação com leite integral 5% em PBS/0,1% Tween 20. O anticorpo primário foi adicionado e incubado por 3 horas a temperatura ambiente ou *overnight* a 4°C com leve agitação. Foram utilizados os anticorpos α-RASSF9 *rabbit* policlonal(Santa Cruz) 1:500, α-FLAG *mouse* monoclonal (Sigma) 1:1000, α-β-actina *mouse* monoclonal (Sigma) 1:1000, α-pAKT *mouse* (Santa Cruz) 1:200, α-AKT *mouse* (1:400), α-pERK1/2 *rabbit* (Santa Cruz) 1:200, Raf 1 *mouse* 1:1000, α-Ras *mouse* 1:500 e α-XIAP *mouse* 1:500, nas diluições informadas. Após incubação, a membrana foi lavada três vezes com PBS/0,1% Tween 20, seguindo de incubação com o anticorpo secundário α-IgG de camundongo (1:10000) ou de coelho (1:2000) conjugados com HRP, ambos diluídos em solução de leite 5% em PBS/0,1% Tween 20 por 1 hora, com agitação constante. Lavagens foram realizadas após a incubação com o anticorpo secundário e a revelação ocorreu com ECL caseiro em equipamento ImageQuant™ *LAS* 4000 (GE Healthcare Life Sciences).

3.4.4 Imunofluorescência

Um total de $2x10^3$ cell /cm^2 foram plaqueadas e, depois de 12 horas, fixadas com solução de metanol:acetona 1:1 por 5 minutos. Após lavagem com PBS 1X, as células foram permeabilizadas com 0,05% de Triton X-100 (Fisher Scientific) por 5 minutos e bloqueadas em PBS/BSA 1% por uma hora em temperatura ambiente. O anticorpo primário α-RASSF9 foi diluído em PBS/BSA 1% 1:250 e incubado nas células overnight a 4°C. Após lavagem com PBS as células foram incubadas com anticorpo secundário α-Rabbit-Alexa Fluor 456 (Thermo Fisher) por uma hora e seguidas para marcação de DNA com Hoechst 1µg/mL por 10 minutos. Para captura das imagens for utilizado o microscópio Axio Vert. A1 ZEISS e as imagens foram processadas com o software ImageJ e pluging FigureJ para construção das imagens finais.

3.5. Preparo e uso de Bactérias Stbl3

3.5.1. Preparo de Bactérias quimiocompetentes

As células competentes de *E. coli* Stbl3 foram preparadas de acordo com o método de Hanahan (J. SAMBROOK, D.W. RUSSELL, 2001). Este consiste em plaquear as células estoque em placa contendo o meio LB e incubar por 16 horas a 37ºC. Após esse período de tempo, foram selecionadas e transferidas de 4 a 5 colônias isoladas para 1mL de meio SOB. A essa solução é adicionado 100mL de meio SOB e incubado a 37ºC sob suave agitação até a fase de crescimento exponencial (densidade óptica de 600nm).

A cultura foi centrifugada por 10 minutos a 2700 x g a 4ºC e o precipitado ressuspendido em 40 mL de tampão FSB e incubado no gelo por 10 minutos. Após nova etapa de centrifugação, as células foram ressuspendidas em 2 mL de tampão FSB. Foi adicionado 70µL de DMSO, e incubado no gelo por 15 minutos. Após incubação, mais 70 µL de DMSO foram adicionados e a solução foi rapidamente aliquotada (50 µL e 100 µL por tubo) e estas foram armazenadas a -70ºC até o uso.

3.5.2. Transformação de bactérias quimiocompetentes

A transformação bacteriana ocorreu pelo método de choque térmico. No qual, os plasmídeos foram adicionados as bactérias e incubados por 30 minutos no gelo. Após esse período, a mistura foi incubada por 2 minutos a 42 ºC e, novamente, no gelo por 2 minutos. Cerca de 1 mL de meio LB foi adicionado ao tubo e as células foram mantidas a 37ºC, sob agitação constante, por uma hora. Diferentes volumes das bactérias transformadas foram inoculados em placas de Petri contendo meio de cultura LB-ágar 1,5% com 100µg/ml de ampicilina. As placas foram incubadas a 37ºC durante 18 horas. As colônias de bactérias que cresceram após esse período foram plaqueadas em meio líquido e seguiram para a extração de DNA plasmidial.

3.6 Obtenção de plasmídeo contendo o sgRNA de RASSF9

A clonagem de LentiCRISPRv2 se deu seguindo o esquema apresentado na Figura 8. Na qual está ilustrado os sgRNAs, sua fosforilação e reação de

anelamento, em paralelo com a clivagem do vetor e ligação com o produto de anelamento, transformação em bactérias competentes. Isso foi seguido por confirmação da inserção do sgRNA por PCR de bactéria, minipreparação plasmidial e sequenciamento de Sanger.

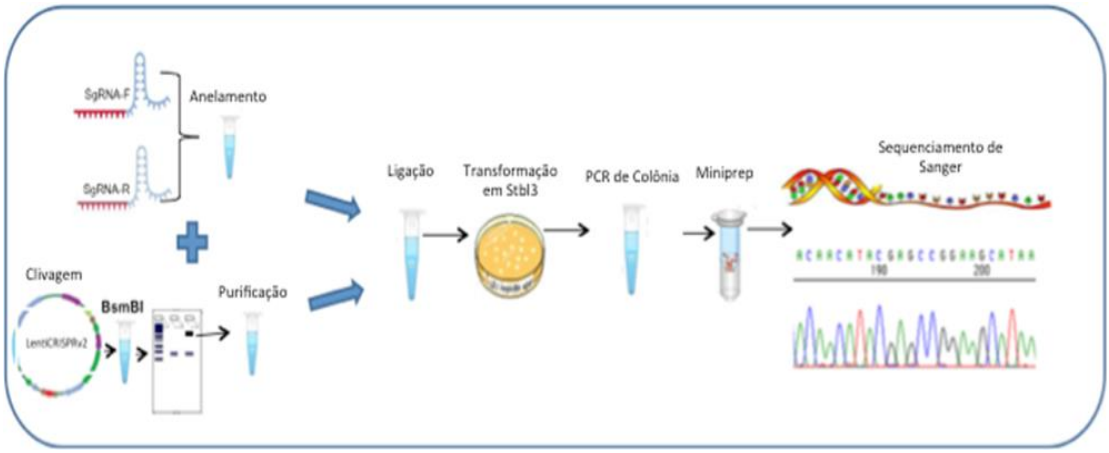

Figura 8 Ilustração esquemática do processo de clonagem do plasmídeo lentiCRISPRv2

Os sgRNAs de RASSF9 foram anelados e inseridos no vetor lentiCRISPR v2, clivado e purificado. Após a reação de ligação, bactérias foram transformadas e a inserção de sgRNA no plasmídeo foi avaliada por PCR de Colônia e Sequenciamento.

3.6.1 Desenho dos sgRNAs

Os sgRNAs utilizados foram desenhados pelas ferramentas *online DNA2.0 gRNA Design Tool* (https://www.dna20.com) e *gRNA design tool* (http://www.genescript.com) da Genescript. As sequências obtidas foram inseridas na ferramenta *Blastn* (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov) para confirmação de *locus.* Após essa verificação, as sequências foram enviadas à síntese pela empresa Invitrogen. As sequências dos sgRNAs desenhados estão representadas na Tabela 4.

Tabela 4 Sequência dos sgRNAs utilizados para o nocaute com CRISPR/Cas9

Nome	Sequência do sgRNA
rassf9 gF1	5´**CACCG**GAGAGAGAGGTGAAGGGCG 3´
rassf9 gR1	5´**AAAC**GCGCCCTTCACCTCTCTCTC**C** 3´
rassf9 gF2	5´**CACCG**GATACGTCCATCGTCAATAC 3´
rassf9 gR2	5´**AAAC**GTATTGACGATGGACGTATC**C** 3´

As sequências necessárias para o nocaute de RASSF9, foram desenhadas com o auxílio das ferramentas online DNA.20 e GeneScript, respectivamente, em itálico e sublinhado. Em negrito temos as sequências necessárias para a inserção do fragmento no vetor LentiCRISPRv2.

3.6.2 Anelamento dos sgRNAs

Para inserção dos sgRNAs no plasmídeo, estes precisaram ser anelados e tiveram suas extremidades fosforiladas. Com esse objetivo, uma reação contendo 10 µM do oligo *forward* (1 µL), 10 µM do oligo *reverse* (1 µL), além de 1 µL do tampão de ligação T4 10X (New England Biolabs), 0.5 µL de T4 PNK (New England Biolabs) foram adicionados à um volume de H_2O suficiente para 10 µL de solução. Essa foi incubada em termociclador (Eppendorf) a 37°C por 30 minutos, seguido por 95°C por 5 minutos e decréscimo a 25°C na proporção de 5°C/minuto. Os sgRNAs anelados foram diluídos na proporção de 1:200 e utilizada na reação de ligação.

3.6.3 Clivagem do vetor LentiCRISPRv2

Para a clivagem do vetor foi utilizado 10 µg de LentiCRISPRv2 (AddGene;Figura 9), 6µL de tampão NEB Buffer 3.1 (New England BioLabs) 10X, 1 µL de DTT (20 mM) e 1µL de BsmBI (New England BioLabs) foram adicionados em um total de 60 µL. Essa solução contendo o vetor foi incubada a 55°C por 3 horas seguido por 20 minutos à 80°C. O plasmídeo clivado foi desfosforilado pela enzima CIP (Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal) (New England Biolabs) por 1 hora a 37°C. Para avaliar a clivagem, as amostras foram aplicadas em um gel de agarose (0.8%), e corridas sob a voltagem de 90V. A banda maior foi purificada a partir de um kit de extração de gel (QIAquick Gel Extraction Kit - Qiagen).

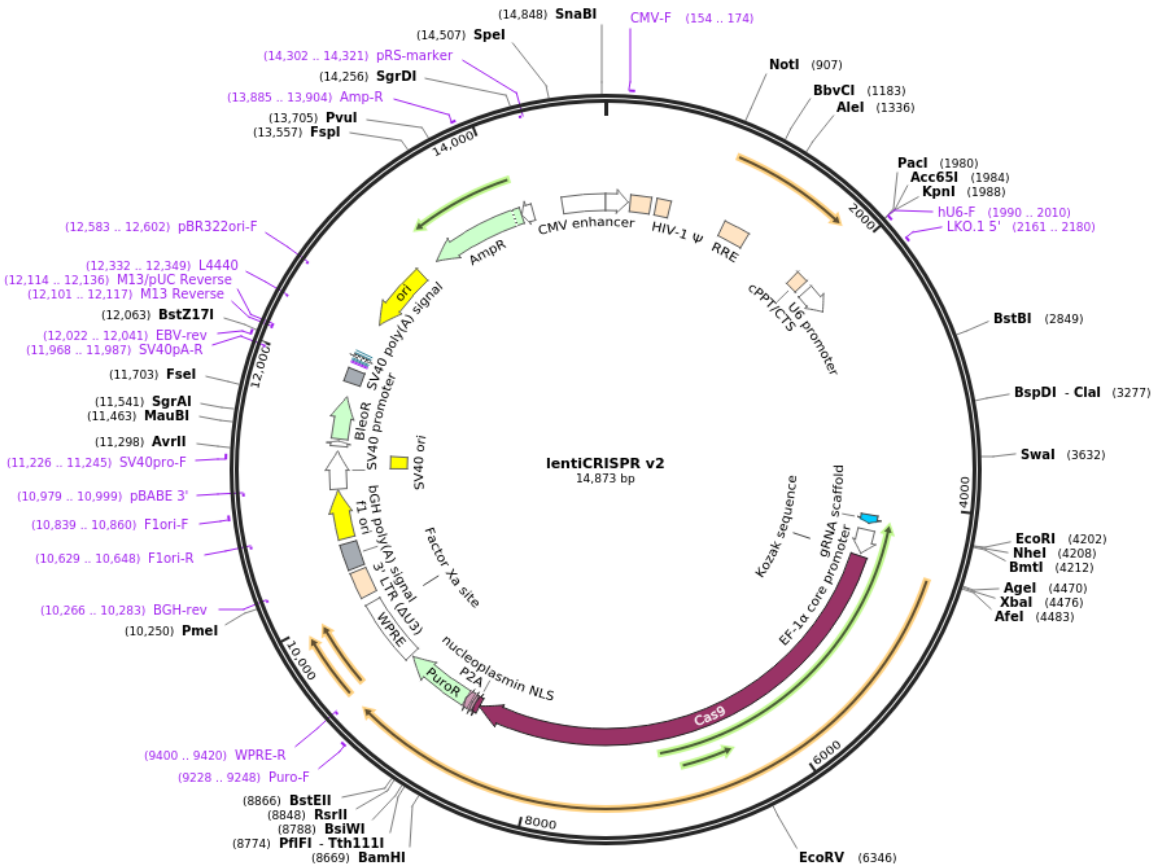

Figura 9 Plasmídeo LentiCRISPRv2

Nesse plasmídeo, temos os genes responsáveis pela codificação da proteína Cas9, fusionada ao epítopo Flag. Além de genes conferem resistência às ampicilina, para a seleção em bactérias, e à puromicina, na seleção em células de mamíferos.

3.6.4 Reação de Ligação

Uma reação de ligação de volume total de 10 µL foi preparada contendo 1 µL de cada oligo, 150 ng do plasmídeo lentiCRISPRv2 clivado, 5 µL do tampão 2X Quick Ligase (New England Biolabs), e 1 µL Quick Ligase (New England Biolabs). E incubada por 16 horas à 16°C.

Após isso, seguimos com a transformação em bactérias competentes, confirmação da clonagem por PCR de colônia, utilizando as mesmas condições de reação que o descrito no ítem PCR (3.3.6) e *primers* U6 e *reverse* sgRNA-1 ou -2. Após confirmação por eletroforese, partimos para a minipreparação plasmidial (Quiagen,seguindo as instruções do fabricante) e envio para sequenciamento.

3.7 Transdução de células Tm1.Luc

3.7.1 Transfecção de células HEK293T

Na produção do vírus lentiviral, foram plaqueadas $2x10^5$ células HEK293T por poço em uma placa de 6 poços. Após cerca de 24 horas, confirmou-se a confluência de cerca de 80% para a realização da transfecção. Em um tubo de 1.5 mL, foram adicionados 5µg do vetor clonado com o sgRNA de RASSF9, 3.5µg do plasmídeo de empacotamento *helper* pCMV-VSV-G (Addgene plasmid # 8454 ; http://n2t.net/addgene:8454 ; RRID:Addgene_8454) (Figura 10), 2.5µg do plasmídeo do envelope psPAX-2 (Addgene plasmid # 12260 ; http://n2t.net/addgene:12260 ; RRID:Addgene_12260) (Figura 11) e 22,5 µl de PEI (1mg/mL) e completou-se com DMEM sem soro para ajustar o volume para 1 mL.

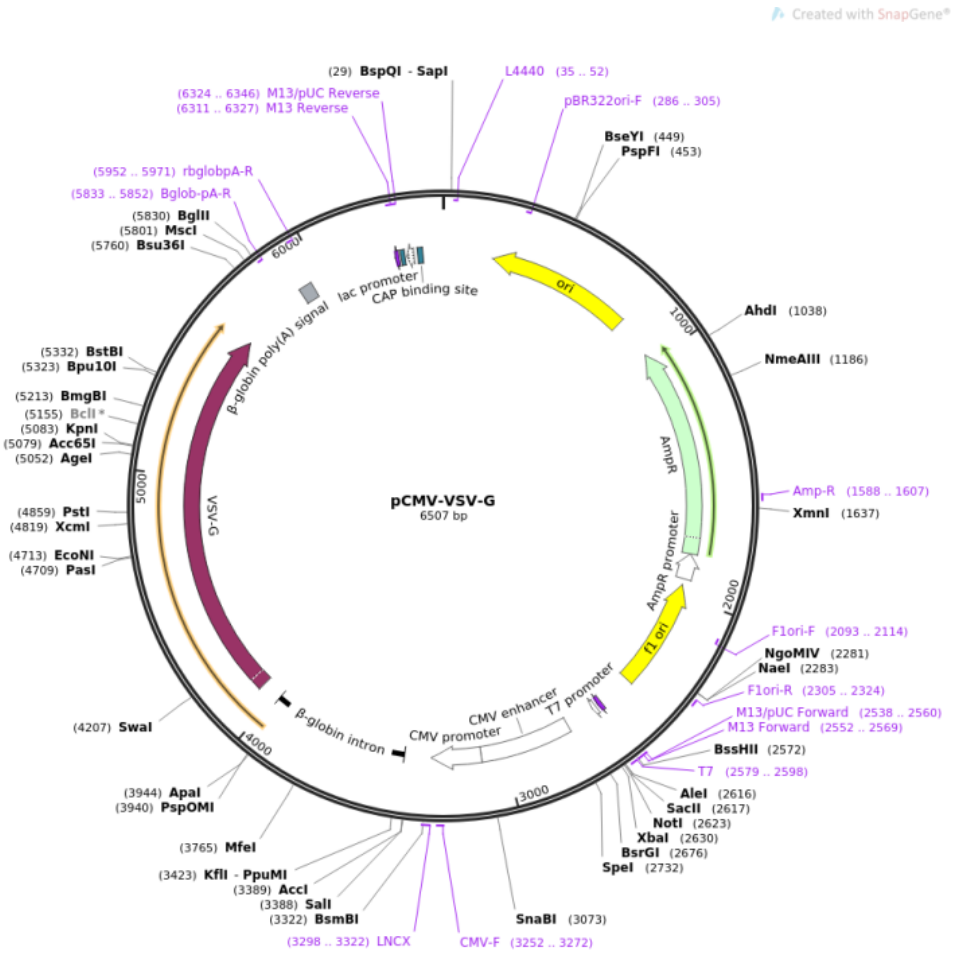

Figura 10 Plasmídeo pCMV-VSV-G

Plasmídeo que contém as sequências para a codificação de proteínas de envelope lentiviral.

Foram utilizados como controles: controle negativo (sem adição de PEI), controle com apenas PEI, e outro controle com apenas PEI, VSVG, psPAX-2. Os tubos de 1.5 mL foram homogeneizados e incubados por 15 minutos a temperatura ambiente. Essa solução foi delicadamente adicionada às células HEK293T plaqueadas. Após 48 horas, o sobrenadante contendo as partículas virais foi coletado e filtrado com filtro 0.22µm para esterilização.

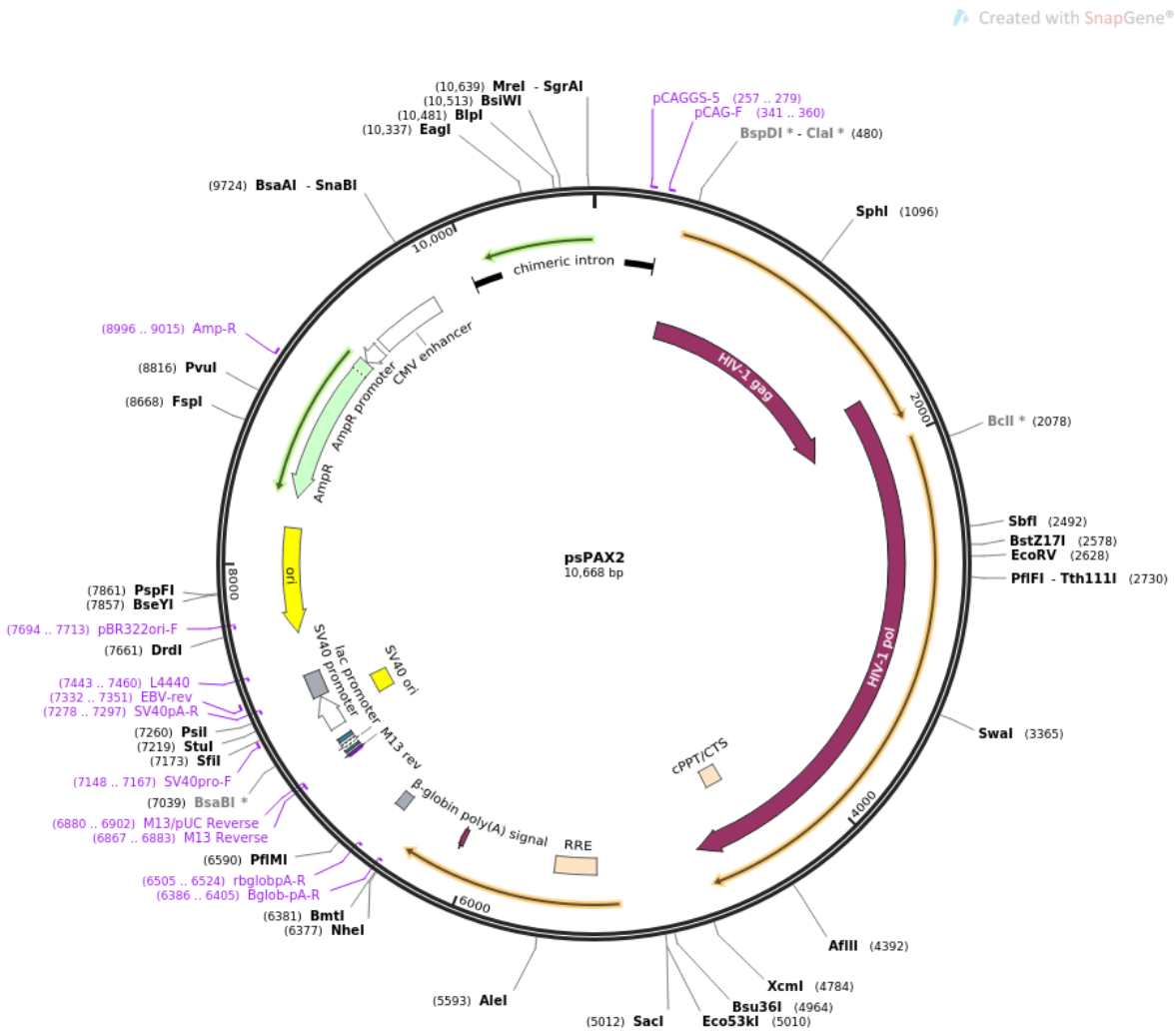

Figura 11 Plasmídeo psPAX2
Plasmídeo de empacotamento de segunda geração de partículas lentivirais.

3.7.2 Transdução de células Tm1.Luc com Lentivirus

Um total de $2x10^5$ células Tm1.Luc foi plaqueada em cada poço de placa com 6 poços, de tal modo que no momento da obtenção das partículas virais, estes poços apresentavam cerca de 80% de confluência. Foi adicionado 1mL do sobrenadante coletado às células e 3 µL de *Polybrene* (5µg/ml - Sigma-Aldrich). O restante do conteúdo viral não utilizado foi armazenado em -80°C. As células Tm1.Luc transduzidas com a partícula viral foram cultivadas por 24 horas, em estufa a 37°C, 5% CO_2. Decorridas 24 horas, foi realizado o repique das células com uma diluição de 1:10 do volume total recuperado durante o repique. Decorridas mais 24 horas, foi adicionado 1µg/mL do antibiótico Puromicina (Invitrogen). As células foram, então, mantidas por 5 dias. Após esse período, foi realizado um repique dessas células, mantendo a adição de 1µg/mL de puromicina por mais 3 consecutivos repiques e posteriormente, reduzimos a 10% a adição de puromicina, resultando na concentração de 0.1 µg/mL. Esta concentração foi mantida por mais 3 repiques até a retirada total de antibiótico de seleção.

3.7.3 Diluição limitante

Após a seleção de células transduzidas, a obtenção de clones foi realizada através da técnica de diluição limitante. Para isso, as células selecionadas foram colocadas em um tubo de 1.5 mL a 1×10^5 células/ mL. Em uma placa de 96 poços, foram adicionados 190µL de meio RPMI 5%. Ao primeiro poço, foi adicionado 10µL da solução contendo as células e aos poços consecutivos, foi realizada uma diluição seriada, sempre adicionando 10 µL provenientes do poço anterior. Assim, essa diluição foi realizada até a razão de 10-4 e a obtenção de clones foi observada no microscópio NIKON TS 100 F.

3.8 Ensaios Fenotípicos *in vitro*

3.8.1 Curva de crescimento *in vitro*

Um total de $1x10^4$ células foram plaqueadas em cada poço de placas de 6 poços. Nos dias 2,4,6,8, e 10 essas células foram desaderidas com tripsina, marcadas com Triton 0,4% e o número de células, além da viabilidade das mesmas, foi aferida com auxílio do contador automático Countess II (Thermo Fisher).

3.8.2 Proliferação com Marcador intracelular (VPD)

Utilizamos o marcador intracelular VPD450 (*BD Horizon™ Violet Proliferation Dye 450*) a fim de aferir e comparar a capacidade proliferativa das linhagens utilizadas no estudo. Para tal, $1x10^6$ células foram coletadas durante o repique das células. Essas foram lavadas duas vezes com PBS1X por 5 minutos a 500 *x* g, as células foram ressuspendidas em solução de VPD450 na concentração de 1µM e incubadas a 37°C por 15 minutos. Um total de 9 vezes o volume de marcação foi adicionado de PBS e as células foram novamente centrifugadas conforme dito anteriormente. O sobrenadante foi descartado e ao pellet foi adicionado 10 ml de meio de cultivo RPMI 5%, as células foram então novamente centrifugadas, contadas em câmera de NeuBauer e um total de $1x10^4$ células foram plaqueada em poços de placas de 6 poços. Após 24, 48 e 72 horas, as células foram desaderidas, lavadas e fixadas com PBS/PFA 1% até o momento da captura dos dados em citômetro de fluxo Fortessa II (BD), estes foram analisado com auxílio do software FlowJo 7.1, conforme Figura 12.

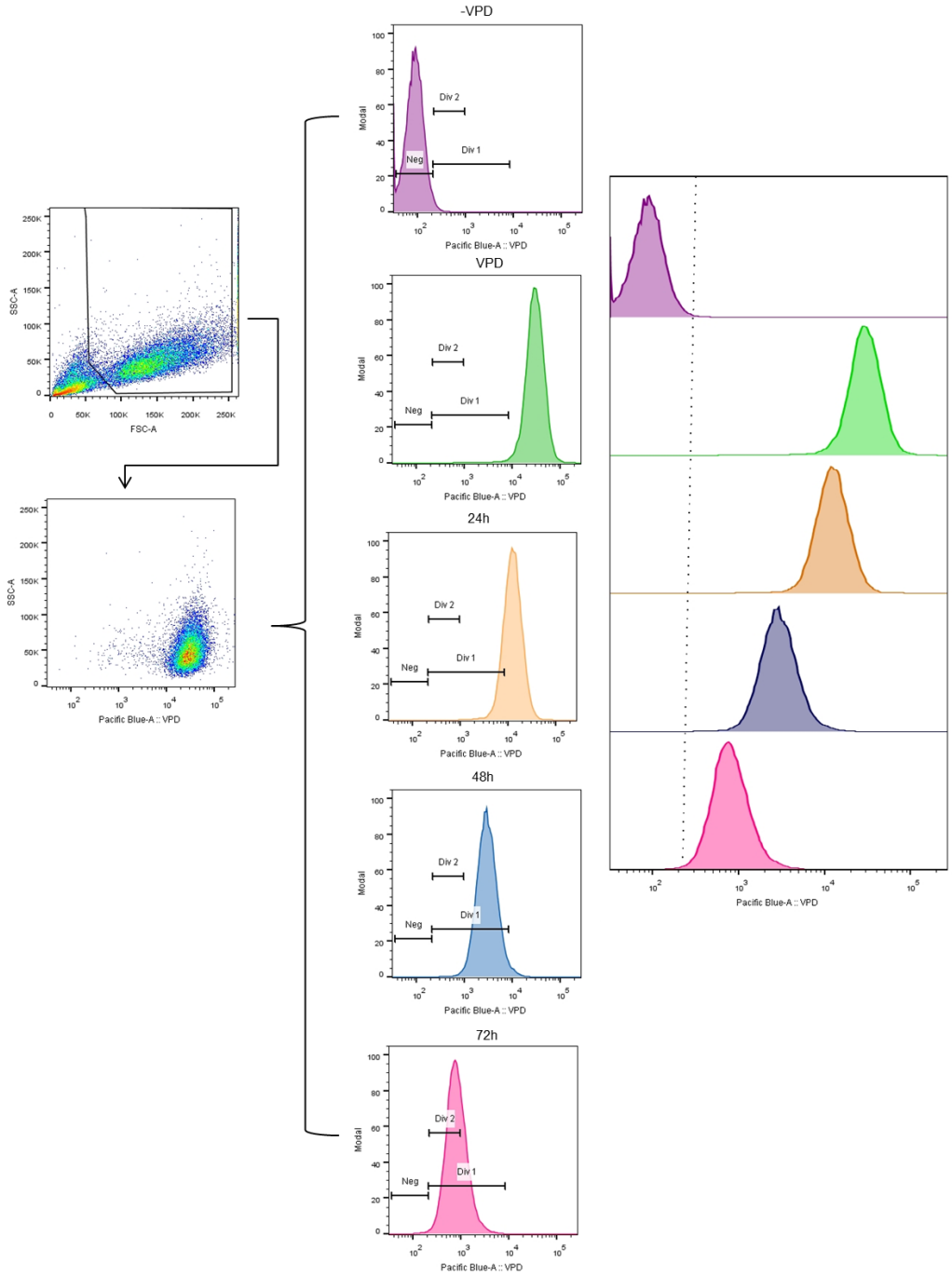

Figura 12 Estratégia de *gate* de análise da proliferação com VPD 450

Inicialmente, foi removidos debris celulares em SSC-A x FSC-A, seguido da avaliação da expressão de VPD450, no canal Pacific Blue. Essas mesmas amostras foram então apresentadas como histogramas. Em roxo, temos a fluorescência basal das células não marcadas, chamadas de -VPD; em verde as células logo após a marcação com VPD; seguidas pelo histograma das células nos tempos 24h (bege), 48h (azul) e 72h (rosa). Esses histogramas foram acoplados para facilitar a visualização da diminuição de fluorescência através do tempo, sendo que as cores e a ordem de apresentação foram mantidas iguais.

Na Figura 12 está designado as *gate*s utilizadas na quantificação de células em proliferação nos tempos analisados. Marcados como Div 1 e Div 2, elas representam o decréscimo em log_{10} da geração anterior.

3.8.3 Ensaio clonogênico

A capacidade de proliferação também foi averiguada pela capacidade das células em formarem colônias, estas compostas por no mínimo 50 células. Baseado no protocolo de Franken *et al*. (FRANKEN et al., 2006), 500, 1000 células foram plaqueadas em placas de 6 poços e cultivadas por 7 dias. Decorrido o tempo de incubação, as células foram lavadas com PBS 1X três vezes, fixadas com solução de 1:7 de ácido acético/metanol por 20 minutos e, em seguida, coradas com 0.5% de Cristal Violeta (Sigma) por 2 horas a temperatura ambiente. Decorrido o tempo para corar, os poços foram lavadas com água destilada e deixadas abertas para sua evaporação. As placas foram então scaneadas e o número de colônia foi determinado com auxílio do software Cell Counter. O número obtido foi então utilizado na determinação da eficiência de plaqueamento (PE), sendo este divido pelo número de células plaqueadas.

3.8.4 Formação de Esferoides

Para a determinação do crescimento 3D das células. Utilizamos 1% de agarose em PBS 1x para impedir a adesão das células aos poços da placas de 96wells de fundo U. Diferentes concentrações de células foram adicionadas ($5x10^3$; $2,5x10^4$; $5x10^4$; $7,5x10^4$ e 10^5) e a placa foi centrifugada por 5 minutos a 300 *x* g a temperatura ambiente, com 6 de acelaração e 2 de desaceleração. Decorridas 24 horas, metade do meio foi trocado e após 4 e 7 dias do plaqueamento, com auxílio do microscópio Axio Vert.A1 ZEISS imagens dos esferoides formados foram capturadas.

3.8.5 Ensaio de Morte Celular

Para determinar os níveis de células que foram induzidas à morte celular, nós plaqueamos $2x10^4$ células em placas de 12 *wells*. Cerca de 12 horas após o plaqueamento, as células foram lavadas e 500µl de meio completo acrescidos ou não de estaurosporina (Sigma) foram adicionados. Utilizamos cinco concentrações para a padronização dos experimentos (125nM, 250nM, 500nM, 1µM e 2µM) e nos experimentos com as células nocaute utilizamos as concentrações de 125 e 500nM.

As células tratadas, após 12 horas, tiveram seu sobrenadante coletado, foram tripsinizadas, lavadas com tampão de anexina (10mM de HEPES, 150mM NaCl, 5mM de KCl, 1 mM de $MgCl_2$ e 1.8 mM de $CaCl_2$) e centrifugadas à 500*x* g por 5 minutos. O pellet formado foi então ressuspendido em solução de 50nM de Sytox Green (Thermo Ficher) e 2µg/ml de Anexina V conjugada com *Alexa Fluor* 647 e incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente no escuro. As amostras foram coletadas pelo citometro Fortessa II (BD) com auxílio do software Diva e analisados com o auxílio do programa FlowJo. A estratégia de *gate* utilizada na determinação das porcentagens de células em processos de morte está representada abaixo (Figura 13).

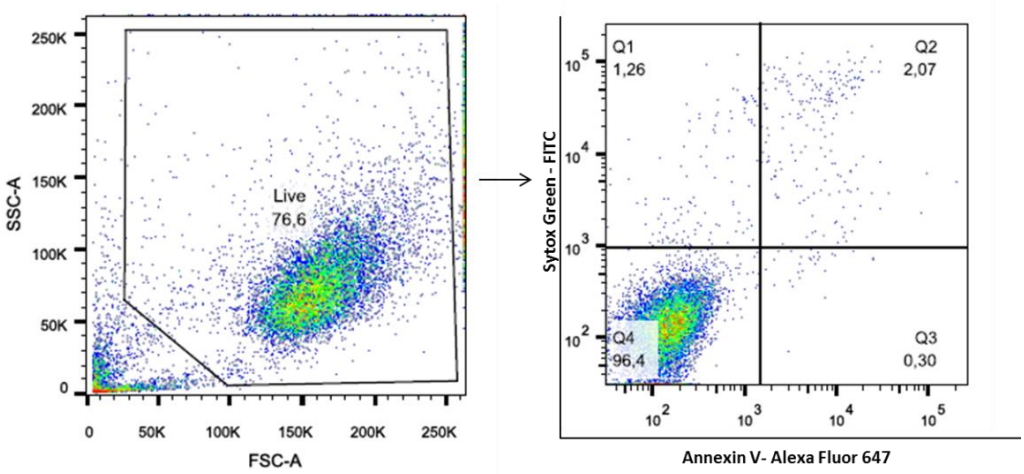

Figura 13 Estratégica de gate dos ensaios de Morte Celular

Inicialmente, foram isolados debris celulares. Em seguida, foram avaliados os níveis de marcação de Sytox Green- FITC e Anexina V – Alexa Fluor 647. O quadrante Q1 representa as células viáveis e Q2 foi utilizado na determinação de células em processo de morte celular.

3.9 Análise Fenotípica *in vivo*

3.9.1 Crescimento tumoral

Células em final de fase logarítmica de crescimento, com cerca de 80% de confluência, foram tripsinisadas e lavadas uma vez com PBS 1X. O pellet foi ressuspendido na concentração de $2{,}5x10^6$ células/ml com meio RPMI sem soro e antibiótico. A partir dessa solução, 100µl foram inoculados no flanco dorsal de camundongos fêmeas C57Bl6 entre 8 e 12 semanas de idade. O crescimento tumoral foi avaliado 7 dias após o inóculo das células e a cada dois dias com auxílio de um paquímetro manual. Nessa análise as medidas do diâmetro menor e do diâmetro maior obtidas, essas são chamadas respectivamente de “a” e “b” e foram então aplicadas à fórmula:

$$V = 0.52\ x\ a^2\ x\ b$$

O crescimento tumoral foi avaliado até os tumores atingirem um volume igual ou maior a 1.5 cm^3. Animais que apresentavam tumores com pontos necróticos também foram sacrificados.

3.10 Análises Estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software Graphpad Prism (Graphpad Software Incorporation company) utilizando One-way or Two-way ANOVA seguidos por Teste de Turkey. O “Log-Rank” foi utilizado na comparação entre as curvas de sobrevivência dos animais utilizados. Assim, valores de $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) e $p < 0.001$ (***) foram considerados estatisticamente significativos.

4. Resultados

4.1. RASSF9 em Melanoma

Como dito anteriormente, até o momento, não há dados na literatura referentes a expressão e ação de RASSF9 em melanoma. Por esse motivo, nós iniciamos nossas análises avaliando o *status* de RASSF9 em amostras de melanoma humano depositadas no TCGA com auxílio da ferramenta cBioPortal (https://www.cbioportal.org/). Nossas análises mostraram que a sequência de RASSF9 apresenta mutações em apenas 3% dos casos analisados (Figura 14-A). Além disso, RASSF9 é, em média, cerca de 1.7 vezes mais expressa em amostras de RNA-Seq em amostras de melanoma (Figura 14-A). Ao classificarmos as amostras de acordo com o descrito por Clark (CLARK et al., 1969), podemos observar na

Figura **14**-B que há um sutil aumento na média de expressão do nível I ao nível III, seguido por um decaimento progressivo nos níveis IV e V. Segundo essa classificação, os dois últimos estágios correspondem ao momento da doença em que as células tumorais podem ser encontradas nos linfonodos e em outros órgãos, como pulmão e cérebro.

Alguns trabalhos têm demonstrado que os membros da família RASSF podem ter sua expressão suprimida em tumores pela metilação de seus promotores (FALKENBERG; JOHNSTONE, 2014; SHERWOOD et al., 2010). Por esse motivo, decidimos também comparar o nível de expressão de RASSF9 com a metilação observada em seu promotor (Figura 14-C). O coeficiente de Pearson é um indicador de correlação, no qual 1 representa uma correlação positiva e direta, ou seja, o aumento de uma variável implica no aumento da segunda; -1 representa uma correlação negativa, ou inversamente proporcional, enquanto que; 0 representa uma independência das variáveis analisadas. Enquanto isso, a correlação de Spearman avalia a tendência de mudança conjunta de duas variáveis, levando em consideração possíveis taxas de mudança distintas entre elas (HAUKE; KOSSOWSKI, 2011). Em nossa análise obtivemos um valor de Pearson de -0.38 e de Spearman de -0.49 sugerindo que não há uma correlação

positiva entre o nível de expressão do mRNA de RASSF9 em amostras de melanoma e o estado de metilação do promotor desse gene.

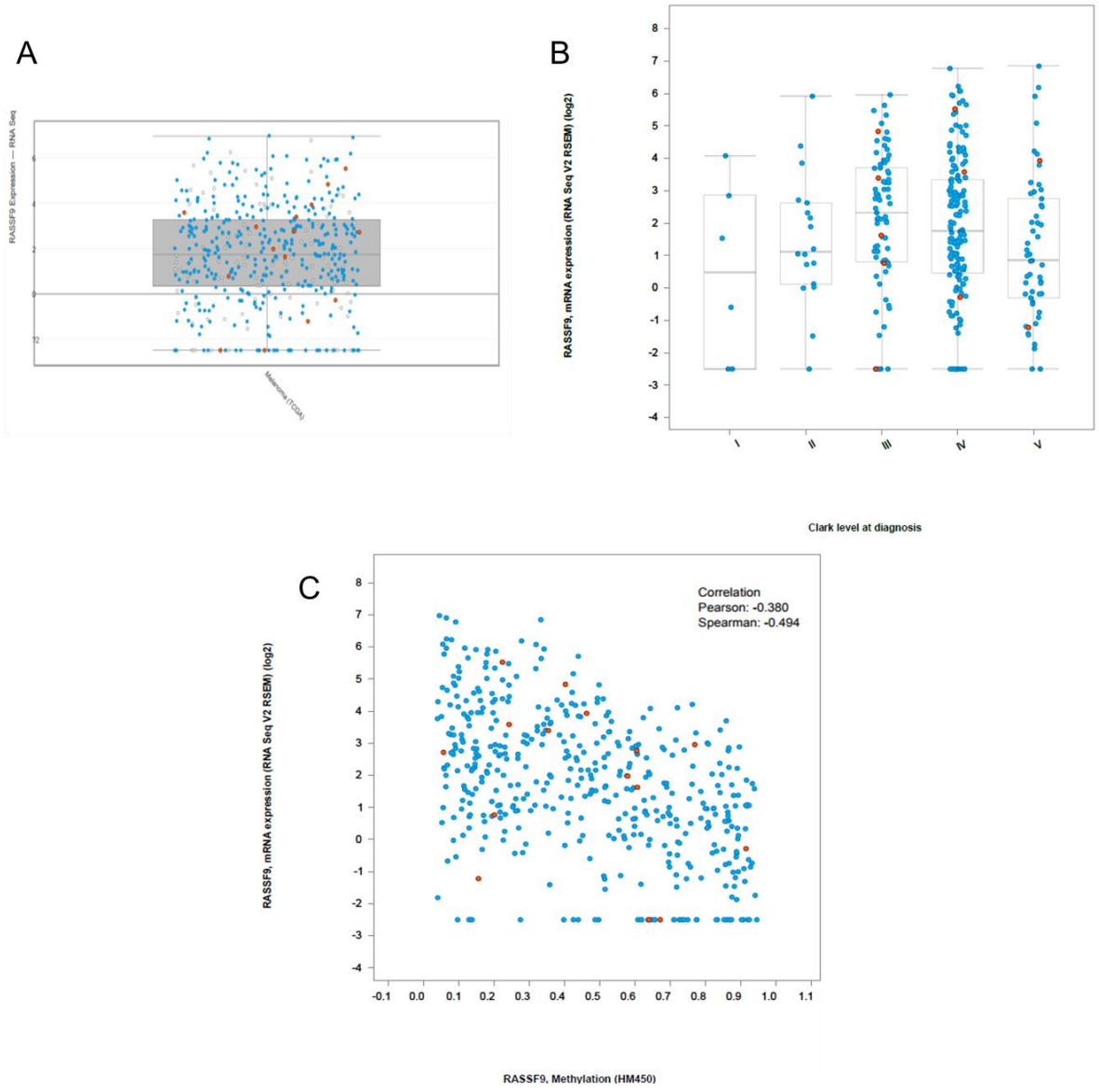

Figura 14 Análises *in silico* do *status* de RASSF9 em amostras de Melanoma humano

Os dados presentes no TCGA foram analisados com auxílio da ferramenta online cBioPortal (https://www.cbioportal.org/). Em **A**, temos o nível de expressão do mRNA de RASSF9 a partir de dados de RNA-Seq. Em vermelho estão as amostras que apresentaram mutações de sequência, estas representam apenas 3% do total das amostras analisadas. Em **B**, temos novamente o nível de expressão do mRNA de RASSF9 agora classificado de acordo com o estagiamento da amostra de melanoma analisada. Em **C**, temos a correlação entre o nível de expressão do mRNA com a metilação do promotor do gene.

Nós também analisamos o nível de expressão do mRNA de RASSF9 nas linhagens de melanoma murino não-metastáticas, B16-F0 e Tm1.Luc, e na linhagem metastática B16-F10. Similar ao observado nas análises *in silico*, o nível de expressão de RASSF9 na linhagem metastática, B16-F10, foi reduzido quando comparado com o nível de expressão das linhagens não-metastáticas (Figura 15).

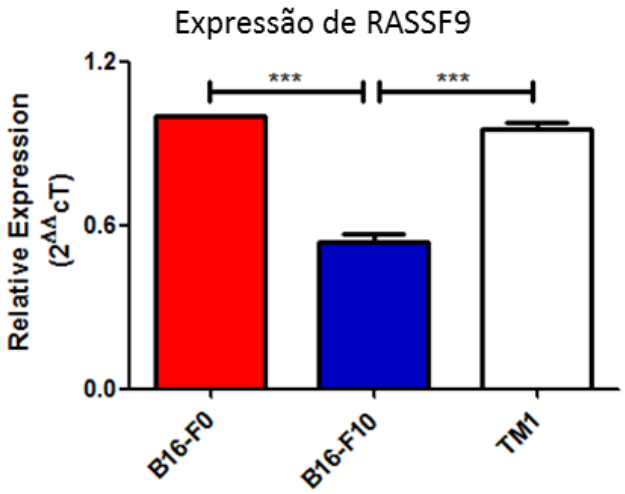

Figura 15 Expressão de RASSF9 em linhagem de Melanoma Murino
Avaliação da expressão relativa de RASSF9, em comparação com o gene *housekeeping* β-actina, por qPCR.

4.2 Geração de Linhagem RASSF9$^{-/-}$

4.2.1. Obtenção de LentiCRISPRv2 com sgRNA de RASSF9

Para a construção da linhagem de células Tm1.Luc cuja expressão de RASSF9 foi eliminada. Primeiramente, nós desenhamos os sgRNAs com auxílio de ferramentas *online.* Duas ferramentas foram utilizadas, a primeira *DNA2.0 gRNA Design Tool* (https:/dna20.com) o qual utiliza um algoritmo de predição de sítios PAM NGG e NAG utilizando uma janela de 12 pares de base *upstream* ao sítio PAM. O segundo programa, o *gRNA Design Tool* da empresa GenScrip (https://www.genscript.com), leva em consideração não apenas o *locus* de mutação, mas também a possível existência de alvos-inespecíficos. As sequencias foram então analisadas quanto a possíveis interações inespecíficas e seus *locus* foram confirmadas pelo Blast*n.*

Há diversas opções de plasmídeos disponíveis para a realização do nocaute por CRIPR/Cas9. Por optamos trabalhar com linhagens estáveis, decidimos trabalhar com o plasmídeo lentiviral LentiCRISPRv2 (Addgene) o qual foi publicado por Shalem *et al.* (SHALEM et al., 2014). Para a inserção do sgRNA de RASSF9 o plasmídeo foi clivado com BsmBI (BioLabs), conforme esquema apresentado na Figura 16 essa enzima apresenta dois sítios de restrição no *backbone* do LentiCRISPRv2 com uma distância de cerca de 2Kb entre eles.

De acordo com o esperado, após a clivagem o plasmídeo liberou um fragmento de cerca de 2Kb Figura 16 o fragmento superior foi excisado e purificado com o kit de extração de DNA a partir de gel de agarose (QIAquick Gel Extraction Kit – Quiagen). O produto purificado foi desfosforilado e ligado aos sgRNAs anelados e fosforilados.

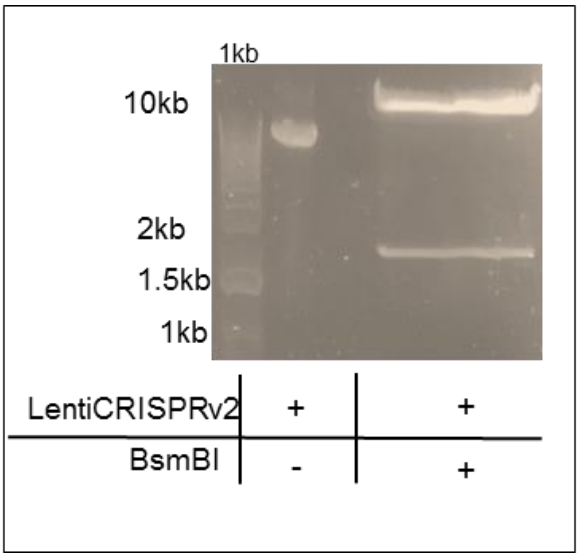

Figura 16 Clivagem do LentiCRISPRv2 com BsmBI.
Após clivagem do vetor LentiCRISPRv2 com a enzima BsmBI, as amostras foram submetidas à eletroforese de DNA e o gel, corado com brometo de etídeo. Após a confirmação da clivagem, o fragmento maior observado no gel, foi excisado e purificado de acordo com as recomendações do fabricante do kit QIAquick Gel Extraction (Quiagen).

Após a transformação de bactérias Stbl3, PCR a partir das colônias de bactérias foi utilizado na discriminação das colônias que receberam o vetor contendo o sgRNA de interesse. Tal avaliação foi permita pela utilização dos *primers* U6 *forward* e o primer rassf9 gR1 ou rassf9 gR2.Os resultados dessas PCRs com a amplificação de 4 colônias do sgRNA – 1 e 3 colônias do sgRNA- 2 podem ser observados na Figura 17, respectivamente, A e B.

As colônias positivas foram inoculadas em meio LB líquido, crescidas por cerca de 16 horas e seu DNA plasmidial foi separado de acordo com a metodologia. Seguidamente, as amostras foram encaminhadas para sequenciamento e as análises ocorreram com o programa Bioedit, função ClustalW de múltiplo alinhamento. Os resultados do sequenciamento do sgRNA-1 esta apresentado na Figura 17B, de ambos sgRNAs conseguimos a obtenção de ao menos uma amostra com sequência exata a esperada, as colônias 7 e 1, respectivamente sgRNA-1 e 2, foram selecionadas para as próximas etapas do nocaute.

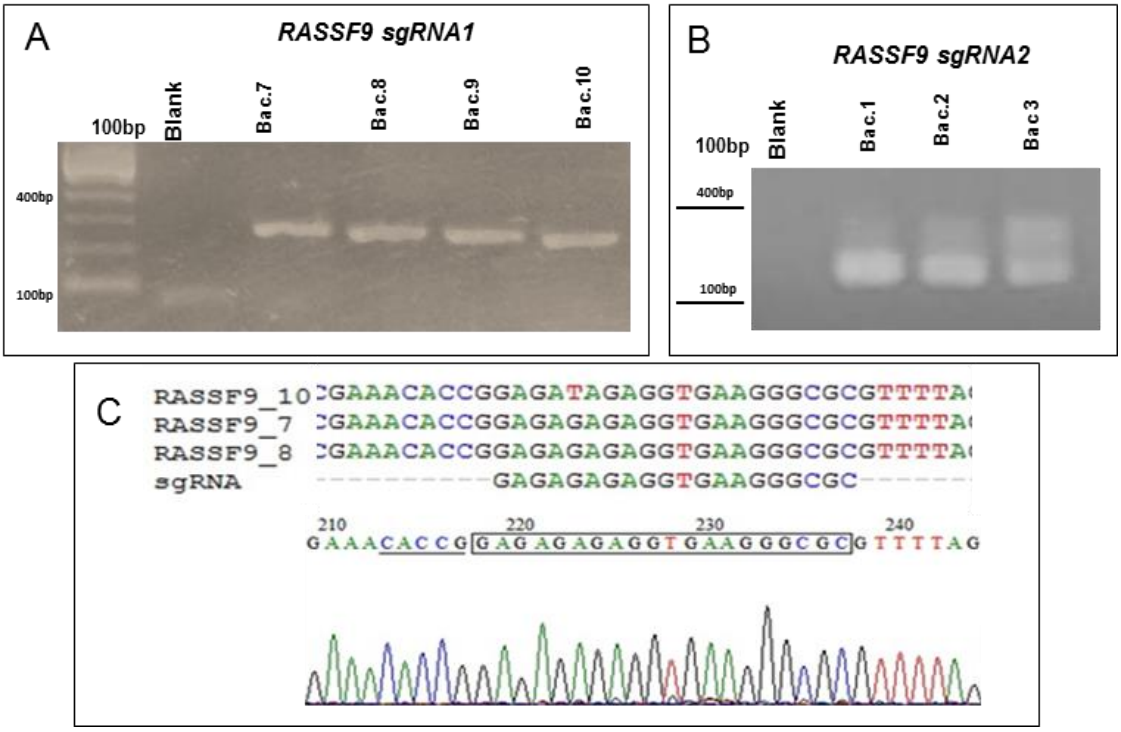

Figura 17 Confirmação da inserção de sgRNA de RASSF9 no vetor LentiCRISPRv2

Após PCR utilizando *primers* U6 *foward* e rassf9 gR1 (**A**) ou rassf9 gR2(**B**), o material foi submetido à eletroforese de DNA e corado com brometo de etídio. O DNA plasmidial foi extraído e utilizado na reação de sequenciamento. Em **B** temos o resultado do sequenciamento do sgRNA-1, na parte superior a confirmação da sequência do sgRNA em comparação com a sequência do sgRNA desenhado e na parte inferior a avaliação de qualidade da amostra pelo cromatograma.

O LentiCRISPRv2 clonado, apresentando o sgRNA específico para o gene da RASSF9, foi utilizado para a produção lentiviral. O lentivírus foi produzido em células HEK293T e o vírus carregando o plasmídeo clonado foi utilizado para transduzir as células-alvo, Tm1.Luc. Como consequência da transdução, a célula-alvo incorpora o DNA viral incluindo o vetor clonado, adquirindo portanto a maquinaria necessária à edição gênica e depleção de RASSF9.

Para tanto, precisávamos padronizar a melhor concentração de puromicina a ser adicionada às células Tm1.Luc para a seleção das células que tiveram a edição gênica. Para tanto, plaqueamos as células e as tratamos com quatro diferentes concentrações de puromicina (0,2; 0,4; 0,8 e 1µg/ml), após cinco dias, foi possível determinar que a concentração de 1µg/ml é a mais indicada para esse tipo celular Figura 18.

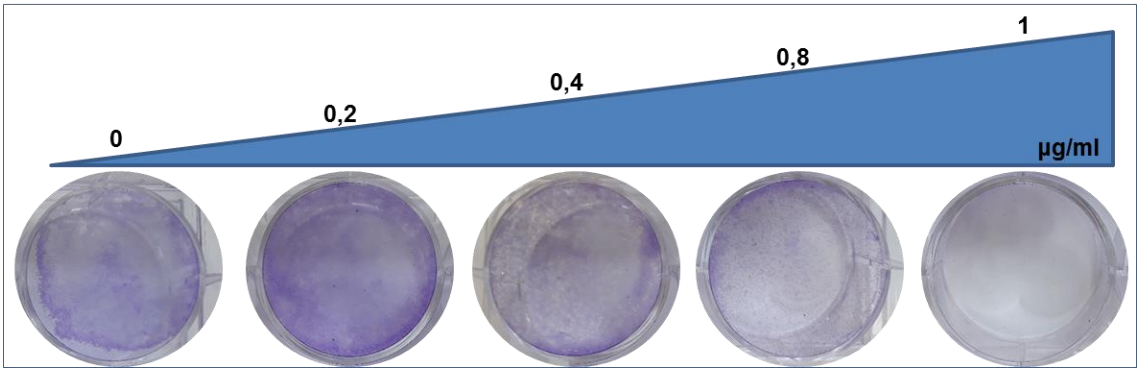

Figura 18 Padronização da concentração de puromicina em Tm1.Luc
Utilizamos quatro diferentes concentrações de puromicina às células Tm1.Luc, respectivamente, 0,2; 0,4; 0,8 e 1µg/ml, apresentados da esquerda para direita, após ao controle sem adição da droga.

Após a transdução das células HEK293T e a produção das partículas virais, o sobrenadante foi recolhido e 1ml foi adicionado às células Tm1.Luc em final de fase exponencial de crescimento. A seleção das células que incorporaram a maquinaria de edição gênica deu-se com adição de puromicina na concentração determinada por três repiques, seguidos por mais três repiques com 10 vezes menos antibiótico, 0.1µg/ml. As células foram então submetidas à diluição limitante e foram obtidos 5 clones de células com a expressão de sgRNA1 -1, dos quais, dois foram caracterizados quanto as consequências fenotípicas. Neste trabalho, não apresentaremos dados provenientes de nocaute de células utilizando o sgRNA-2.

4.2.3. Depleção de RASSF9 em células Tm1.Luc

Nós analisamos a expressão de RASSF9 por três metodologias distintas, sequenciamento da região-alvo para determinação das mutações ocorridas, *Western Blot* e imunofluorescência. Assim sendo, realizamos análise em nível de sequência de DNA e de expressão proteica.

Para a avaliação do DNA, O DNA extraído no passo 3.3.4. foi utilizado como *template* na amplificação de um segmento de DNA o qual tem em seu interior a sequência de interação com o sgRNA de RASSF9. Desenhamos *primers* a montante e a jusante à sequência-alvo do sgRNA de RASSF9, tomamos o cuidado de que a limitação da técnica de não apresentar uma boa resolução nas

primeiras cerca de 200 bases fosse respeitada por ambos os *primers*. Após a amplificação do fragmento gênico e preparo das amostras para o sequenciamento, comparamos a sequência obtida pelas linhagens clonais, conseguidas após diluição limitante, com a sequência do DNA das células não transduzidas.

Os clones foram nomeados de acordo com a sua localização na placa de diluição limitante e, na Figura 19-A, podemos ver o resultado do sequenciamento de todos eles. Elegemos dois deles, Tm1.rassf9$^{-/-}$G12 e Tm1.rassf9$^{-/-}$H11, eleitos para prosseguirmos com os experimentos.

Na Figura 19-B podemos ver que após a tradução *in silico* os clones apresentam sequências de aminoácidos diferentes da sequência de RASSF9 e entre si. Em ambos podemos observar que a mudança na janela de leitura associado com as mutações decorrentes da edição génica geraram *stop* códons prematuros. Para o clone Tm1.rassf9$^{-/-}$G12, esse fragmento é de apenas 8 aminoácidos após a região de interação com a Cas9, enquanto que para o clone Tm1.rassf9$^{-/-}$H11 esse fragmento está próximo de 80 aminoácidos.

Figura 19 Avaliação da edição gênica por sequenciamento

Em **A,** temos o resultado de sequenciamento analisado pelo *software* BioEdit, com a ferramenta ClustalW para múltiplo alinhamento. Em **B,** após a tradução *in silico* das sequências obtidas no sequenciamento, a sequência da obtida pela linhagem selvagem

foi comparada com a sequência dos dois clones utilizados nesse estudo. Em negrito está assinalado a sequência do sgRNA após a tradução.

Após confirmação das mutações dos dois clones era necessário demonstrar que há uma perda de expressão de RASSF9 a nível proteico. Para isso, realizamos duas abordagens *Western Blot* e imunofluorescência.

O plasmídeo LentiCRISPRv2 tem em sua sequência a proteína Cas9 fusionada ao epítopo *tag* Flag em sua porção C-terminal. Este epítopo apresenta cerca de 9KDa e pode ser utilizado como um marcador da expressão de sua proteína associada, neste caso, Cas9. Por esse motivo, as membranas dos extratos das células Tm1.Luc, Tm1.Luc.rassf9$^{-/-}$G12 e Tm1.Luc.rassf9$^{-/-}$H11 foram incubados com esse anticorpo e, como esperado, podemos ver na primeira linha da Figura 20 que os clones apresentam uma marcação com esse anticorpo.

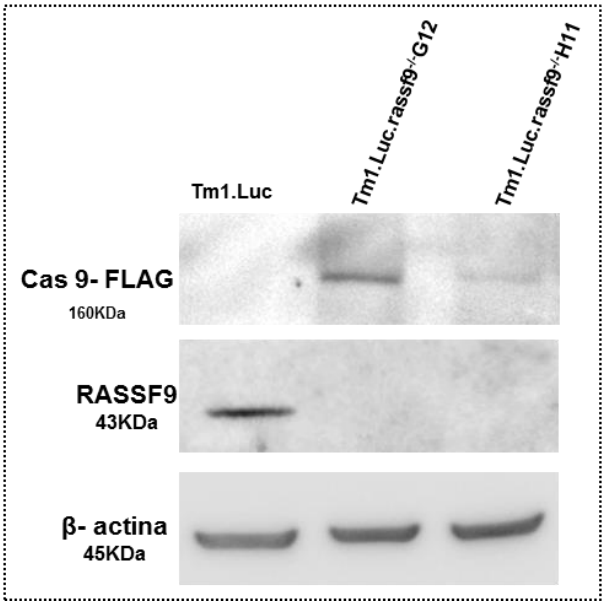

Figura 20 Avaliação da depleção de RASSF9 por Western Blot

Extratos proteicos das linhagens selvagem, Tm1.Luc (*lane 1)* e dos dois clones Tm1.Luc.rassf9$^{-/-}$G12 (lane 2) e Tm1.Luc.rassf9$^{-/-}$H11 (lane 3) foram submetidas a eletroforese, seguida por transferência à membrana de nitrocelulose, marcação com os anticorpos primários α-Flag, α-RASSF9 e α-βactina. A marcação após revelação com os três anticorpos está representada nas linhas 1, 2 e 3, respectivamente.

Ainda na Figura 20, agora na segunda linha, temos a marcação com o anticorpo α-RASSF9. Neste caso, o esperado era de que a linhagem selvagem apresentasse uma banda, demonstrando a expressão de RASSF9 por Tm1.Luc e

que as linhagens após a edição gênica perdessem essa expressão. Os nossos dados foram de acordo com o esperado, com a expressão de RASSF9 ocorrendo apenas na *lane* 1 onde foi aplicado o extrato da linhagem selvagem.

Na técnica de *Western Blot* nós utilizamos extratos proteicos desnaturados, por esse motivo, a utilização de técnicas que avaliem a expressão de RASSF9 em seu estado ativo pode ser útil na confirmação da produção de células nocaute. Com isso em mente, partimos então para os ensaios de imunofluorescência.

O primeiro passo à imunofluorescência foi a determinação da melhor diluição do anticorpo que reconhece RASSF9. Três concentrações foram 1:50, 1:100 e 1:250 do anticorpo α-RASSF9, essas diluições foram determinadas utilizando a concentração indicada pelo fabricante, além de uma superior e outra inferior. Na Figura 21, temos o resultado observado pela imunofluorescência, sendo que a primeira linha se refere à marcação das células Tm1.Luc apenas com o anticorpo secundário α-Rabbit-Alexa-546, como um controle de *background* da técnica. Na segunda, terceira e quarta temos a marcação com a diluição de 1:50, 1:100 e 1:250 do anticorpo primário de reconhecimento da proteína RASSF9. Com esses dados, optamos pela utilização da diluição 1:250 na marcação das células e confirmação da depleção de RASSF9 nos clones obtidos.

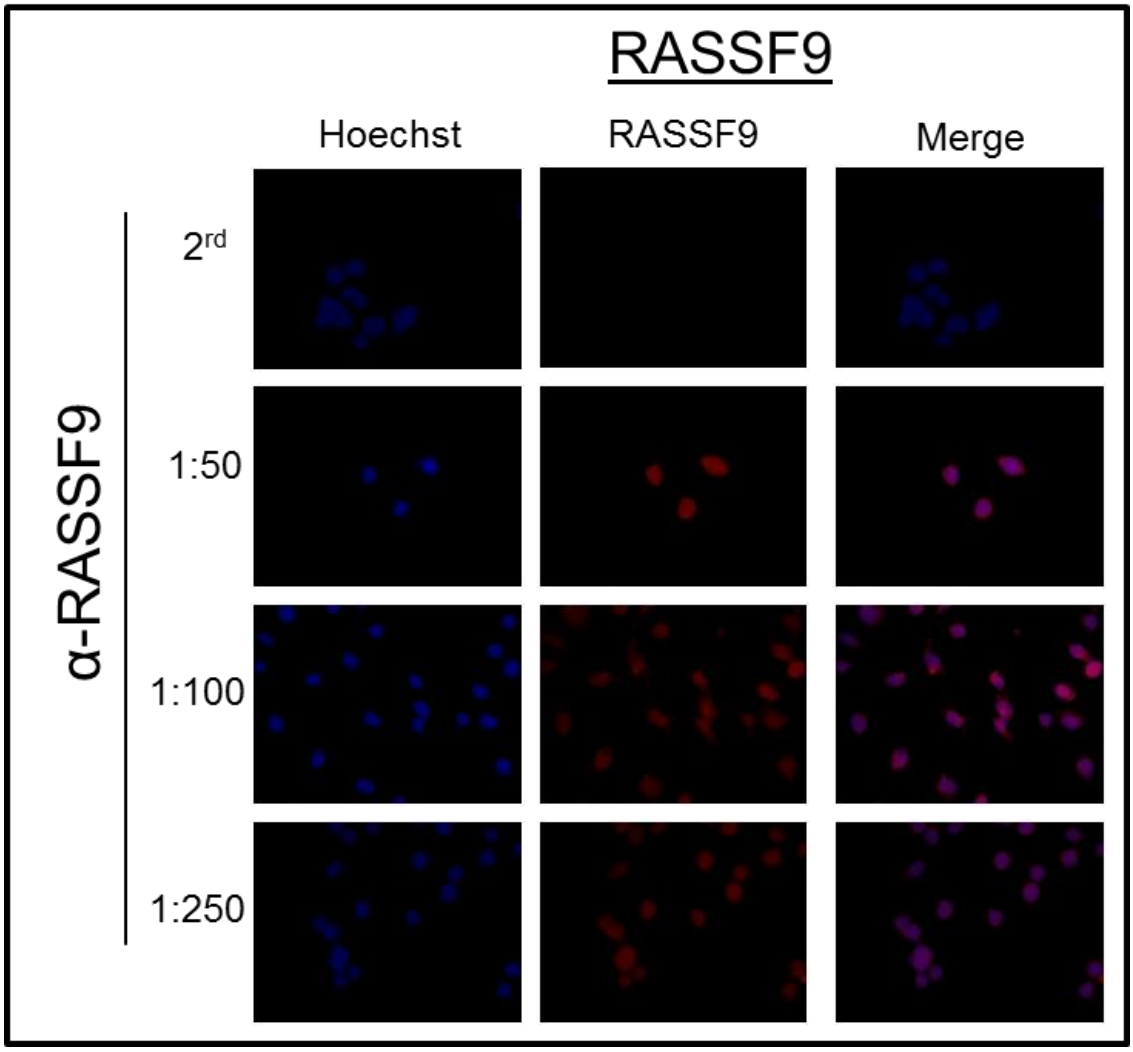

Figura 21 Padronização da concentração de α-RASSF9 em células Tm1.Luc para microscopia de fluorescência

Todas as imagens são de células Tm1.Luc conjugadas com marcação DNA com Hoechst, na primeira coluna, anticorpo secundário α-Rabbit- Alexa Fluor 456, na segunda coluna; e o merge das duas imagens na terceira coluna. Na primeira linha as células foram incubadas apenas com o secundário, as linhas abaixo são representantes da marcação das células com diferentes concentrações do anticorpo primário α-RASSF9, 1:50, 1:100 e 1:250, respectivamente representadas na segunda, terceira e quarta linha.

De acordo com o esperado e, bem como os dados de *Western Blot*, podemos observar na Figura 22, nas segunda e terceira linha, que ambos os clones não apresentam a marcação para o anticorpo. Vale ressaltar que a captura das imagens foi realizada com a mesma configuração de exposição e intensidade para as suficientes e deficientes de RASSF9.

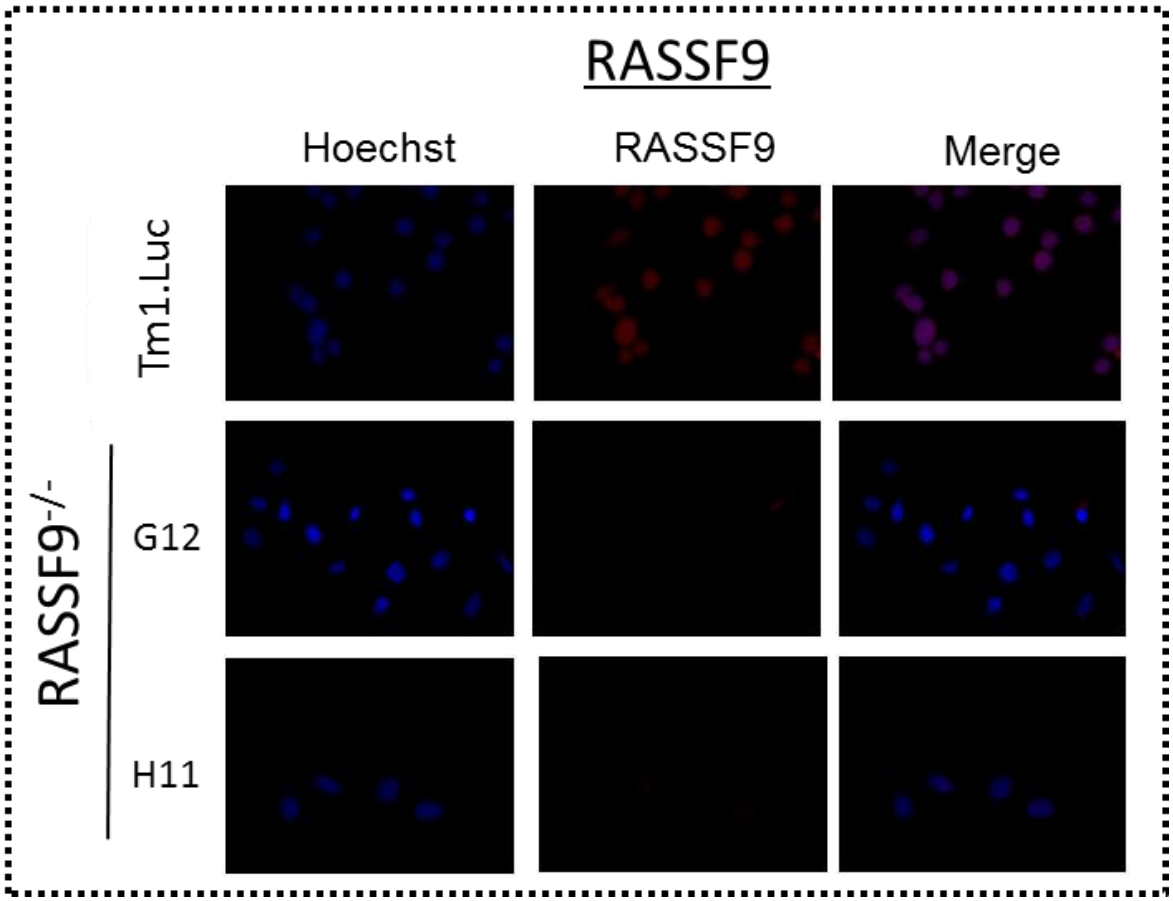

Figura 22 Verificação da deficiência de RASSF9 por microscopia de fluorescência

Marcação das células Tm1.Luc, Tm1.Luc.rassf9$^{-/-}$G12 (lane 2) e Tm1.Luc.rassf9$^{-/-}$ H11 com anticorpo α-RASSF9, respectivamente na primeira, segunda e terceira linha. O conteúdo nuclear foi marcado com Hoechst e está apresentado na primeira coluna, na segunda coluna temos a marcação com o anticorpo secundário α-Rabbit-Alexa Fluor 456, e o merge das duas imagens na terceira coluna.

4.3 Alterações Fenotípica *in vitro*

4.3.1 Crescimento Celular das linhagens RASSF9$^{-/-}$

Para a caracterização da função de RASSF9 em melanoma, após a confirmação da edição gênica, nós partimos então para a determinação do perfil de proliferação *in* por diferentes abordagens. A marcação com corante intracelular (VPD 450), a cinética de crescimento celular, a determinação da capacidade de formação de colônia e de esferoides.

O marcador VPD 450 é uma análogo do CFSE, assim como este, é substrato de esterases intracelulares que a reconhecem após sua internalização passiva. O substrato da reação é fluorescente e excitável pelo comprimento de onda violeta. Durante a divisão celular, o conteúdo citoplasmático é divido de modo igual às células-filhas e, como consequência a fluorescência emitida por elas é a metade da apresentada pela célula-mãe. Esse decaimento pode ser quantificado pela porcentagem de células com uma diminuição de fluorescência em Log_{10} (BANKS, 2011)

A marcação das células suficientes e deficientes de RASSF9 foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante e avaliamos a intensidade de fluorescência emitida decorrido os períodos de 24, 48 e 72 horas. Quando comparamos os clones, Tm1.RASSF9$^{-/-}$G12 e Tm1.RASSF9$^{-/-}$H11 não apresentaram diferenças significativas quanto ao número de células em divisão (Figura 23). Isso indica que a ausência de RASSF9 não afeta a divisão celular após a interação com o marcador de viabilidade VPD450.

A avaliação com o marcador intracelular VPD apresenta uma desvantagem de não poder ser utilizado por períodos maiores de tempo. No nosso caso mais que 72 poderia comprometer as análises, uma vez que a intensidade de fluorescência das células em proliferação poderia intercalar com as células não-marcadas (-VPD). A fim de determinar se haveria alteração em períodos mais longos e o perfil de crescimento dessas células estaria afetado pela ausência de RASSF9, nós partimos então para a cinética de crescimento celular, onde avaliamos a concentração de células e a viabilidade dessas por um período de 10 dias.

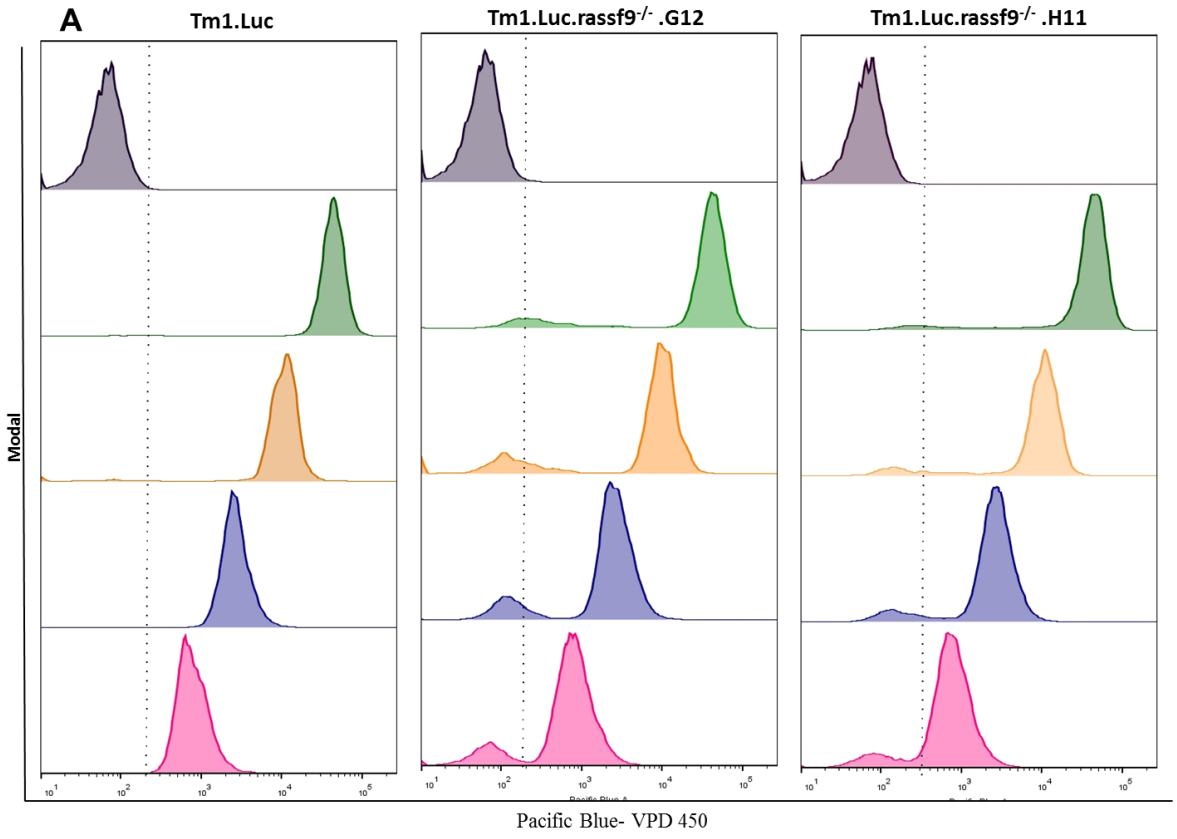

Figura 23 Comparação da proliferação das células que expressam RASSF9 com as células nocauteadas

Em **A)** temos os histogramas das células selvagens, Tm1.Luc à esquerda, no centro os histogramas referentes as marcações da linhagem Tm1.rassf9$^{-/-}$G12 e à direita, os histogramas apresentados pelas células Tm1.rassf9$^{-/-}$H11. Sendo a representação de um experimento realizado. Em **B,** as divisões foram definidas com um decréscimo de Log_{10} em comparação às células-mãe e as quantificações de células estão representadas no gráfico. As quantificações são referentes as médias apresentadas pelas células em três experimentos independentes com réplicas biológica. NS p>0,5.

Como pode ser observado na Figura 24, nos primeiros dias de análise, que correspondem aos dias 2 e 4, não houve diferença entre a taxa de crescimento observada pelas células suficientes e não suficientes de RASSF9. Entretanto, nos dias 6, 8 e 10, podemos observar um número reduzido de células nas linhagens nocaute de RASSF9. Além disso, mesmo no dia de maior número celular, não há uma confluência similar às células selvagens. O que sugere um atraso na fase exponencial de crescimento dessas células, impedindo que as mesmas apresentem números próximos dos observados pelas outras linhagens celulares Ainda na Figura 24, agora em B podemos ver que esse fenômeno, aparentemente não se dá devido a uma diferença na viabilidade celular, aqui definida com a porcentagem de células negativas para Azul de Tripan.

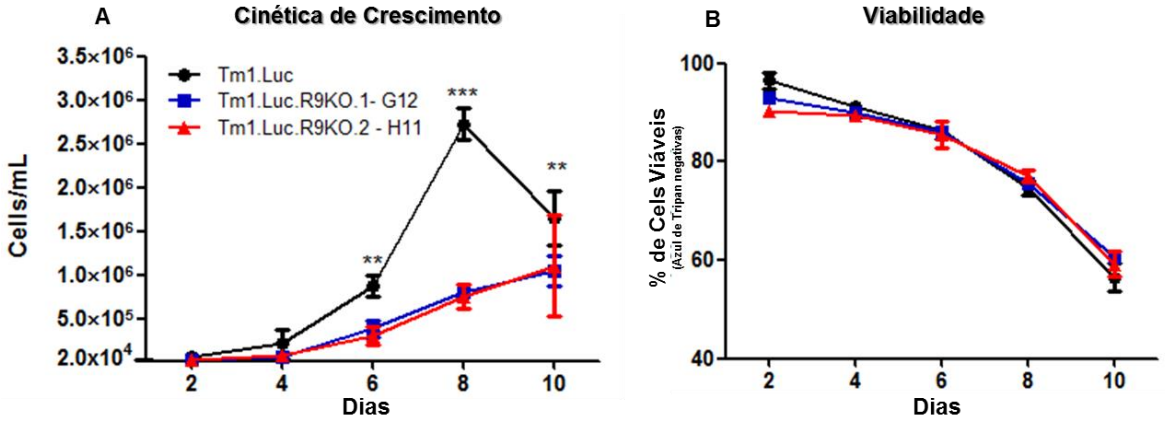

Figura 24 Cinética de Crescimento das células RASSF9$^{-/-}$

Em **A**, temos a cinética de crescimento das células selvagens, Tm1.Luc em preto, em azul temos a representação da média do número de células apresentado pela linhagem Tm1.Luc.rassf9$^{-/-}$G12 e, em vermelho, a linhagem Tm1.Luc.rassf9$^{-/-}$H11. O número de células foi obtido após tripsinização e contagem no contador automático Countess II(ThermoFisher). A discriminação das células viáveis e não-viáveis, em **B**, se deu com o uso de Azul de Tripan. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$.

Uma outra forma de avaliar a capacidade proliferativa das células é através do ensaio de formação de colônia. Neste ensaio, uma baixa densidade de células é plaqueada e, decorrido o tempo para análise os *clusters* de células um número superior a 50 são consideradas colônias. Neste ensaio, utilizamos duas

concentrações de células $5x10^2$ e 10^3 e as análises foram realizadas 7 dias após o plaqueamento. Na menor concentração $5x10^2$, apresentado na

Figura 25A, podemos observar que há uma drástica redução no número de colônias formadas pelas células nocautes de RASSF9, além disso, as colônias formadas apresentam tamanhos menores que as formadas pelas células que expressam essa proteína. A análise da eficiência de plaqueamento (

Figura 25-B), gerada a partir do número de colônias formadas dividido pelo número de células plaqueadas multiplicado por cem, que após a depleção de RASSF9 ambos os clones apresentaram uma redução de cerca de duas vezes a sua eficiência, indo de cerca de 90% na linhagem Tm1.Luc para cerca de 30% nas linhagens Tm1.Luc.rassf9$^{-/-}$G12 e Tm1.Luc.rassf9$^{-/-}$H11.

Na maior concentração, 10^3 células, também observamos uma redução no número e no tamanho das colônias formadas (

Figura **25**-A), e, como consequência, na eficiência de plaqueamento das células (

Figura **25**-C). Entretanto, nesse caso, as células apresentaram uma redução de cerca de 30% de sua eficiência, apresentando agora cerca de 60% nos dois clones. Isso sugere que a deficiência apresentada na replicação das células rassf9$^{-/-}$ possa ser dependente do número inicial de células.

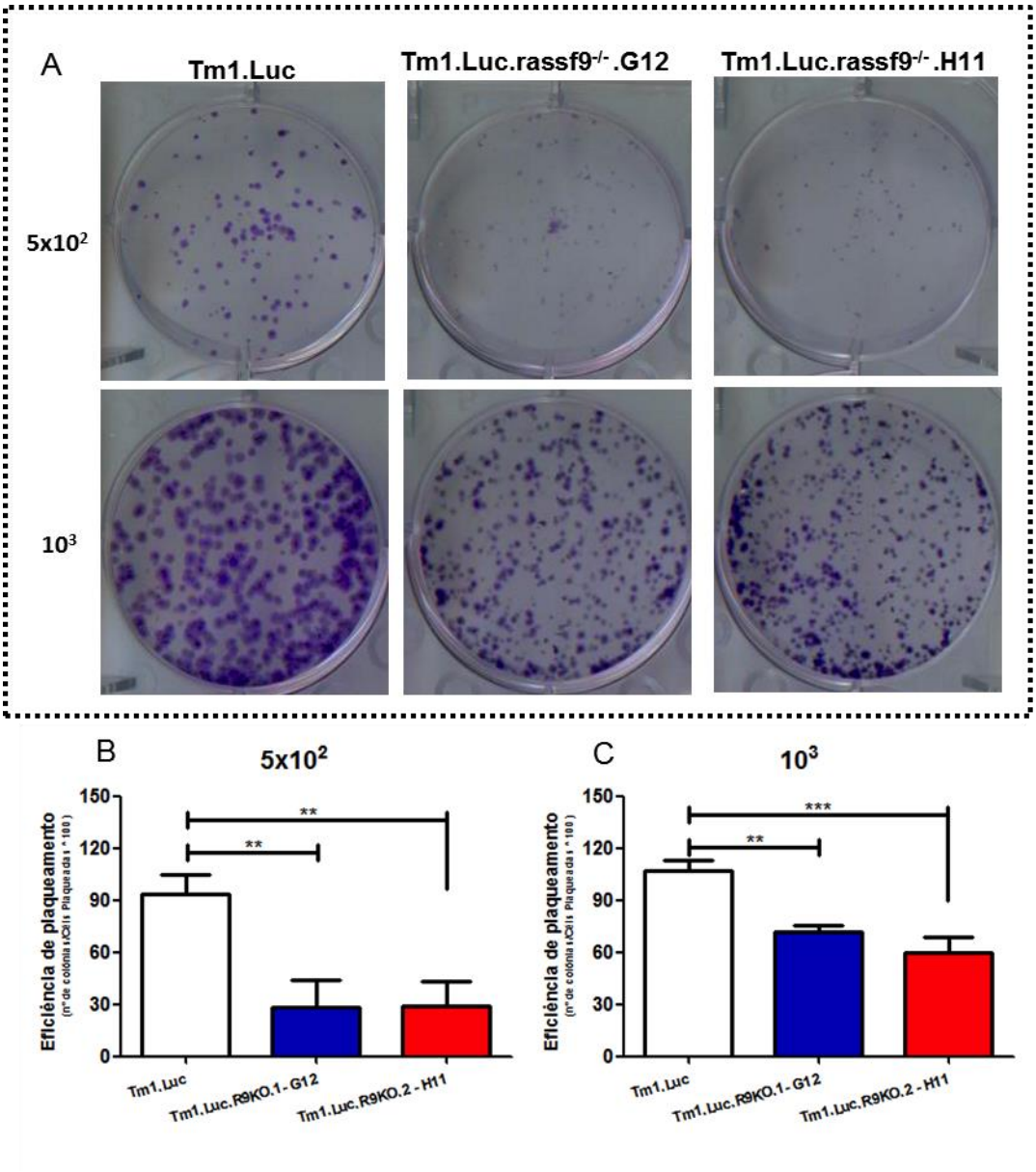

Figura 25 Capacidade de formação de colônia das células deficientes de RASSF9 após 7 dias

Em **A** temos a coloração das colônias com Cristal de Violeta, sendo que na primeira coluna estão as células Tm1.Luc e, na segunda e terceira coluna, Tm1.Luc.rassf9$^{-/-}$G12 e Tm1.Luc.rassf9$^{-/-}$H11, respectivamente. As linhas representam as duas concentrações de células analisadas 5x10^2 e 10^3. Em **B** e **C**, temos a taxa de eficiência de plaqueamento das células na menor e maior concentração, respectivamente. Os experimentos foram realizados em triplicata, sendo A uma imagem representativa de um dos experimentos, enquanto B e C representam a média de três experimentos independentes com réplicas biológicas. NS $p>0,5$, ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$.

Indagamo-nos se o crescimento em esferoides também seria afetado pelo nocaute de RASSF9, para responder essa questão, diferentes concentrações de células ($5x10^3$; $2,5x10^4$; $5x10^4$; $7,5x10^4$ e 10^5) foram plaqueadas sob um *coat* de agarose, submetidas às centrifugação com desaceleração reduzida, a fim de auxiliar na agregação das células e incubadas por 4 ou 7 dias. O primeiro ponto a ser observada nesses dados, representados nas Figura 26 e Figura 27, é que as células Tm1.Luc não formam agregados uniformes mesmo nas maiores concentrações de células e no maior tempo de incubação, 7 dias. Isso dificultou as análises dos dados de forma quantitativa, entretanto, é possível observar que após quatro dias de cultivo as células nocautes nas menores concentrações aparentam apresentar uma menor densidade de células que a linhagem Tm1.Luc ($5x10^3$; $2,5x10^4$; $5x10^4$) e que nas duas últimas concentrações ($7,5x10^4$ e 10^5) o mesmo não é observado de forma clara.

Após sete dias de cultivo dos esferoides (Figura 27), na concentração inicial de 10^5 células vemos a formação de um núcleo de maior densidade nas células deficientes de RASSF9 que não é observado nas células selvagens. Esse ponto pode ser a formação de um ponto necróptico que ocorre durante a formação do tumor e que, curiosamente não está presente na linhagem que sofreu edição gênica.

Os dados da cinética de crescimento, em associação com a formação de colônia e a formação de esferoides indicam que RASSF9 tem um papel de regulação da proliferação de células Tm1.Luc *in vivo.*

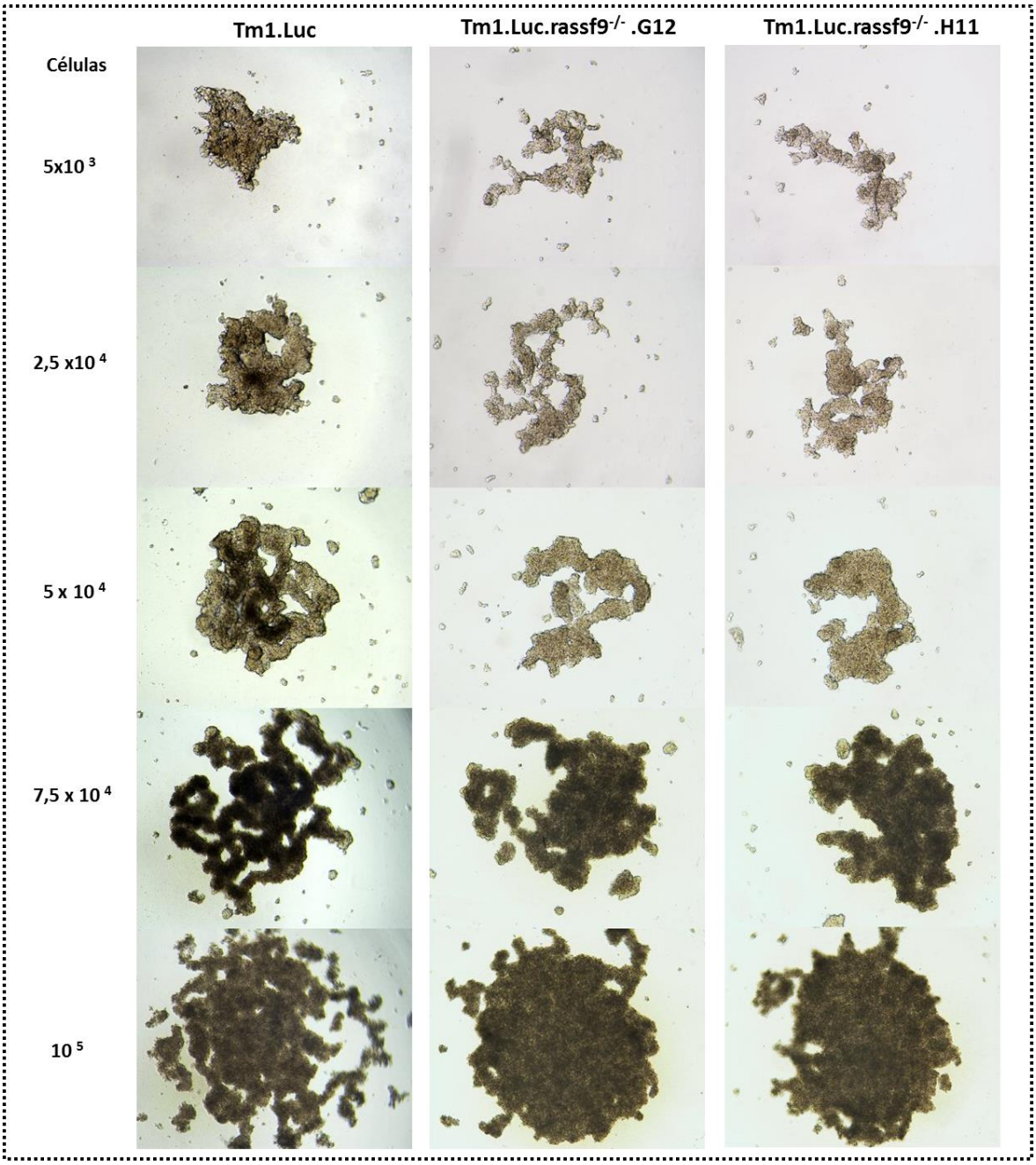

Figura 26 Formação de esferoides após 4 dias de cultivo em células nocautes de RASSF9

Nas colunas temos respectivamente, as linhagens Tm1.Luc, Tm1.Luc.rassf9$^{-/-}$G12 e Tm1.Luc.rassf9$^{-/-}$H11. Cinco concentrações de células foram utilizadas na comparação do crescimento de esferoide sendo elas, 5x10^3; 2,5x10^4; 5x10^4; 7,5x10^4 e 10^5, elas estão respectivamente representadas em cada linha.

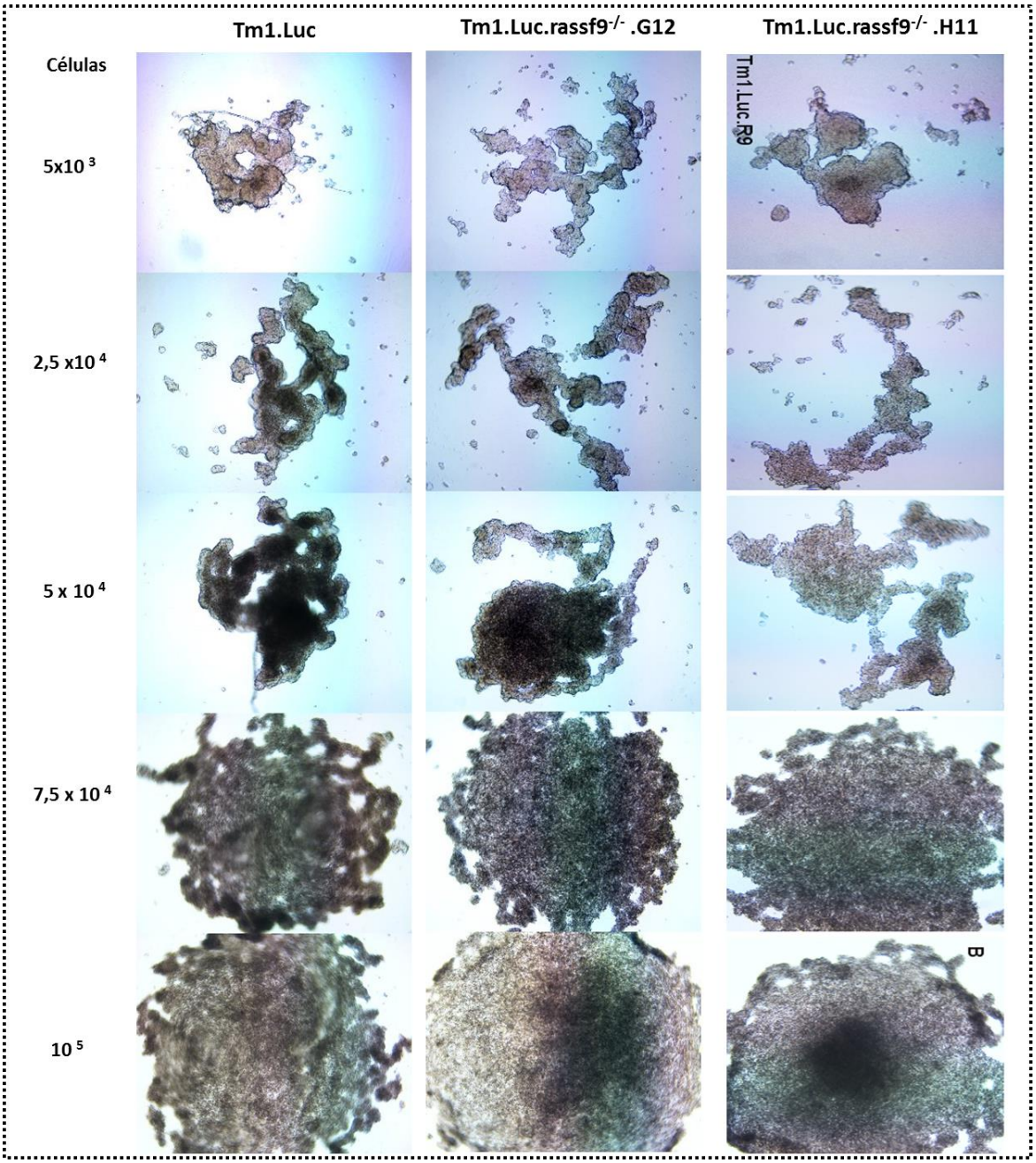

Figura 27 Formação de esferoides após 7 dias de cultivo após depleção de RASSF9

Nas colunas temos respectivamente, as linhagens Tm1.Luc, Tm1.Luc.rassf9$^{-/-}$G12 e Tm1.Luc.rassf9$^{-/-}$H11. Cinco concentrações de células foram utilizadas na comparação do crescimento de esferoide sendo elas, 5x10^3; 2,5x10^4; 5x10^4; 7,5x10^4 e 10^5, elas estão respectivamente representadas em cada linha.

4.3.5 Efeito da indução de morte com Estaurosporina

A família RASSF foi primeiramente identificada por estar associada a indução de morte celular mediada pela proteína Ras (DONNINGER et al., 2017). Nenhum trabalho até agora demonstrou esse mesmo mecanismo seja regulado por RASSF9 e, a fim de elucidar a participação de RASSF9 na indução de morte celular, nós tratamos as células Tm1.Luc e os dois clones nocautes de RASSF9 com diferentes concentrações do indutor de morte celular, estaurosporina, um inibidor de proteínas serina/treonina-quinases.

A avaliação se deu pela quantificação em citometria de fluxo da externalização de fosfatidilserina, através da interação desta com Anexina-V fusionada à Alexa Fluor-647. Este é uma dos primeiros fenômenos que ocorrem durante a apoptose. Além disso, também averiguamos a porcentagem de célula positiva para Sytox Green, um marcador de ácido nucleico fluorescente que é impermeável às membranas celulares de células viáveis, entretanto, facilmente marca o material genético de células em processos de morte celular.

Para definirmos a melhor concentração para o tratamento das células nocaute, primeiramente testamos cinco concentrações de estaurosporina (125, 250 e 50nM, além de 1 e 2µM). Como podemos observar na 28 em A e B, a menor concentração de estaurosporina já resultou em cerca de 70% de células positivas para a marcação com Anexina V e Sytox Green. As concentrações maiores da droga apresentaram porcentagens de células em processo de morte em cerca de 90%. Por não haver diferença entre as maiores concentrações e a concentração intermediária, optamos por realizar os ensaios com os clones com as concentrações de 125 e 500nM.

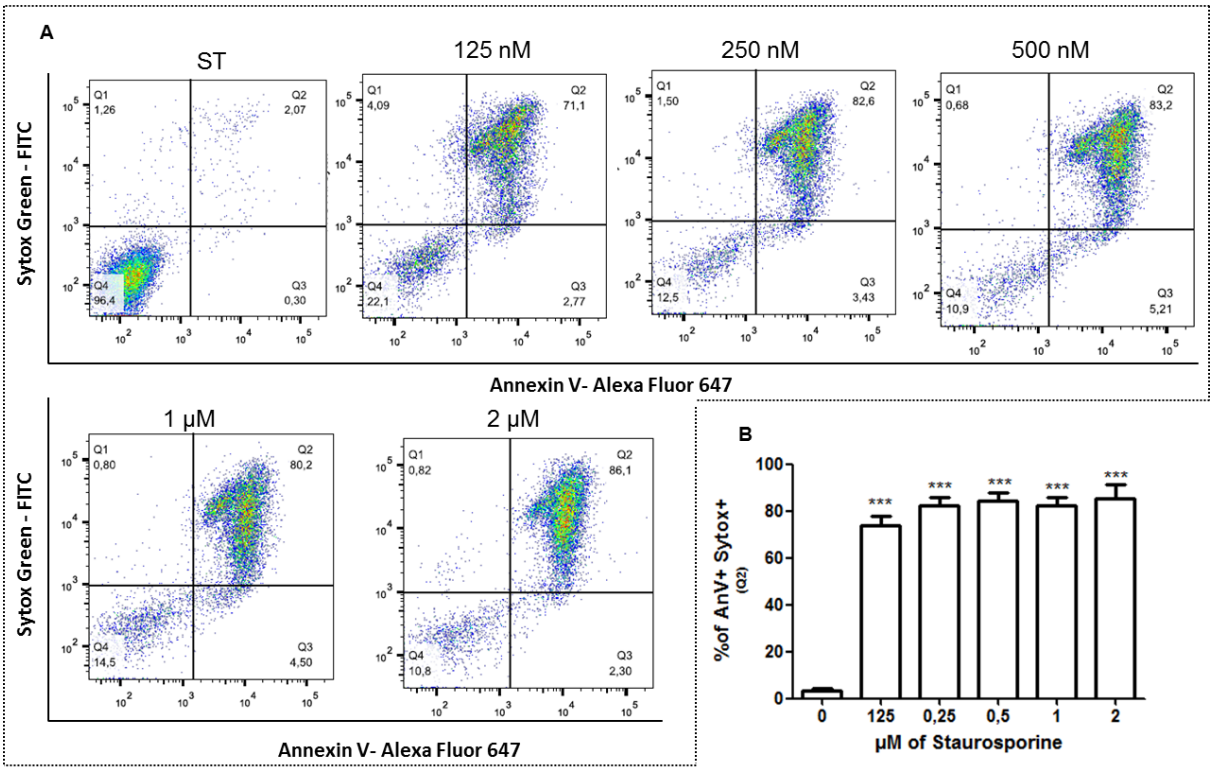

Figura 28 Padronização da concentração de Estaurosporina para os ensaios de morte celular. As células selvagem foram tratadas por 12 horas com 125, 250 e 500nM de estaurosporina, além de 1 e 2µM da mesma droga. Em A temos o *dot plot* de um experimento representativo com os níveis de marcação de Sytox Green- FITC e Anexina V – Alexa Fluor 647. O quadrante Q1 representa as células viáveis e Q2 foi utilizado na determinação de células em processo de morte celular. Os valores médios de Q2 de três experimentos independentes com três replicatas estão representados em B. ST (sem tratamento). *** p<0,001.

Após a definição das duas concentrações de droga a serem testadas, partimos então para o tratamento das células nocaute. Na Figura 299, em A na primeira coluna, podemos observar as células controle, Tm1.Luc, as quais apresentaram porcentagens de células marcadas similares aos dados obtidos na padronização do experimento. Na segunda e terceira coluna estão representadas respectivamente, Tm1.Luc.rassf9$^{-/-}$G12 e Tm1.Luc.rassf9$^{-/-}$H11. Curiosamente, a linhagem Tm1.Luc.rassf9$^{-/-}$G12 apresentou porcentagens de células positivas similares às células controle, Tm1.Luc, sendo esses dados sem diferenças estatísticas significativas entre os grupos. Enquanto isso, a linhagem Tm1.Luc.rassf9$^{-/-}$H11 apresentou uma maior resistência ao tratamento com a droga, apresentando uma redução de cerca de 20% no total de células em

processo de morte celular na menor concentração da droga e uma redução de cerca de 10% na concentração de 500nM de estaurosporina (Figura 299 A e B).

A diferença entre os resultados obtidos pelos clones Tm1.Luc.rassf9$^{-/-}$G12 e Tm1.Luc.rassf9$^{-/-}$H11 não foi investigada nesse projeto. A resposta de ambos clones na indução de morte celular por outras drogas pode contribuir na elucidação dessa questão, além de possibilitar a participação de RASSF9 no processo de morte celular.

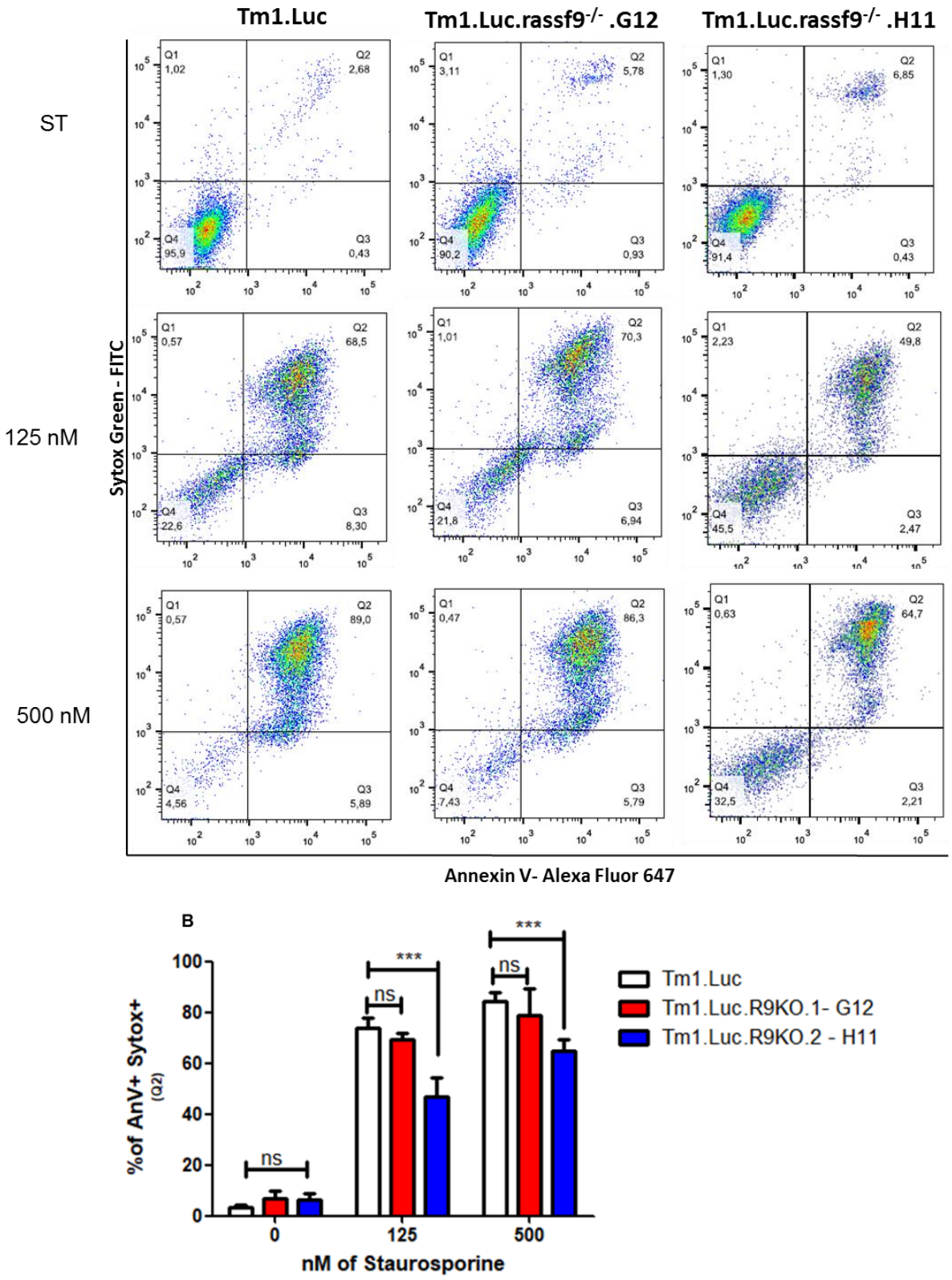

Figura 29 Tratamento das células deficientes de RASSF9 com Estaurosporina. Em A temos na primeira linha os histogramas das células que não foram tratadas com Estaurosporina, na segunda linha as células tratadas com 125nM da droga

e, na terceira, com 500 nM . Nas colunas estão as linhagens celulares Tm1.Luc, Tm1.Luc.rassf9$^{-/-}$G12 e, Tm1.Luc.rassf9$^{-/-}$H11, da esquerda para a direita. Os dados são representativos de um dos experimentos realizados. Em B temos a média da quantificação da porcentagem de células positivas para Anexina V e Sytox Green, Q2, de três experimentos independentes e em triplicata. Respectivamente as linhagens Tm1.Luc, Tm1.Luc.rassf9$^{-/-}$G12 e, Tm1.Luc.rassf9$^{-/-}$H11,representadas pelas cores branco, azul e vermelho. NS p>0,5 e *** p<0,001.

4.3.6 Alteração de vias metabólicas após a depleção de RASSF9

RASSF9 foi identificado interagindo com H-, N- e R-Ras em experimentos de *pull-down* (SÁNCHEZ-TOMÉ et al., 2015). Por isso, nós decidimos avaliar o nível de expressão de Ras na linhagem nocaute. Como observado na Figura 30-A e quantificada na Figura 30-C, houve uma drástica redução no nível de expressão de Ras na linhagem Tm1.Luc.rassf9$^{-/-}$H11. O mesmo o verificado com a expressão de representantes *downstream* da via de Ras, como Raf1 e como ERK1/2. A via Ras/Raf/MEK/ERK é responsável pela proliferação celular e sua redução pode explicar o observado nas células deficientes de RASSF9 nos experimentos de proliferação *in vitro.* Interessantemente, nossos dados indicaram níveis similares entre as células depletadas e não-depletadas de RASSF9 da expressão de AKT, mas um aumento na forma fosforilada dessa proteína. O inibidor de apoptose, XIAP também foi quantificado e não apresentou diferenças significativas entre as células suficientes e deficientes de RASSF9.

Em suma, esses dados podem contribuir no entendimento das consequências moleculares que levaram às alterações fenotípicas de redução da capacidade proliferativa das células Tm1.Luc.rassf9$^{-/-}$H11. Ainda é necessário repetir esse experimento com a linhagem Tm1.Luc.rassf9$^{-/-}$G12 para confirmarmos que as alterações observadas podem ser correlacionadas à ausência de RASSF9.

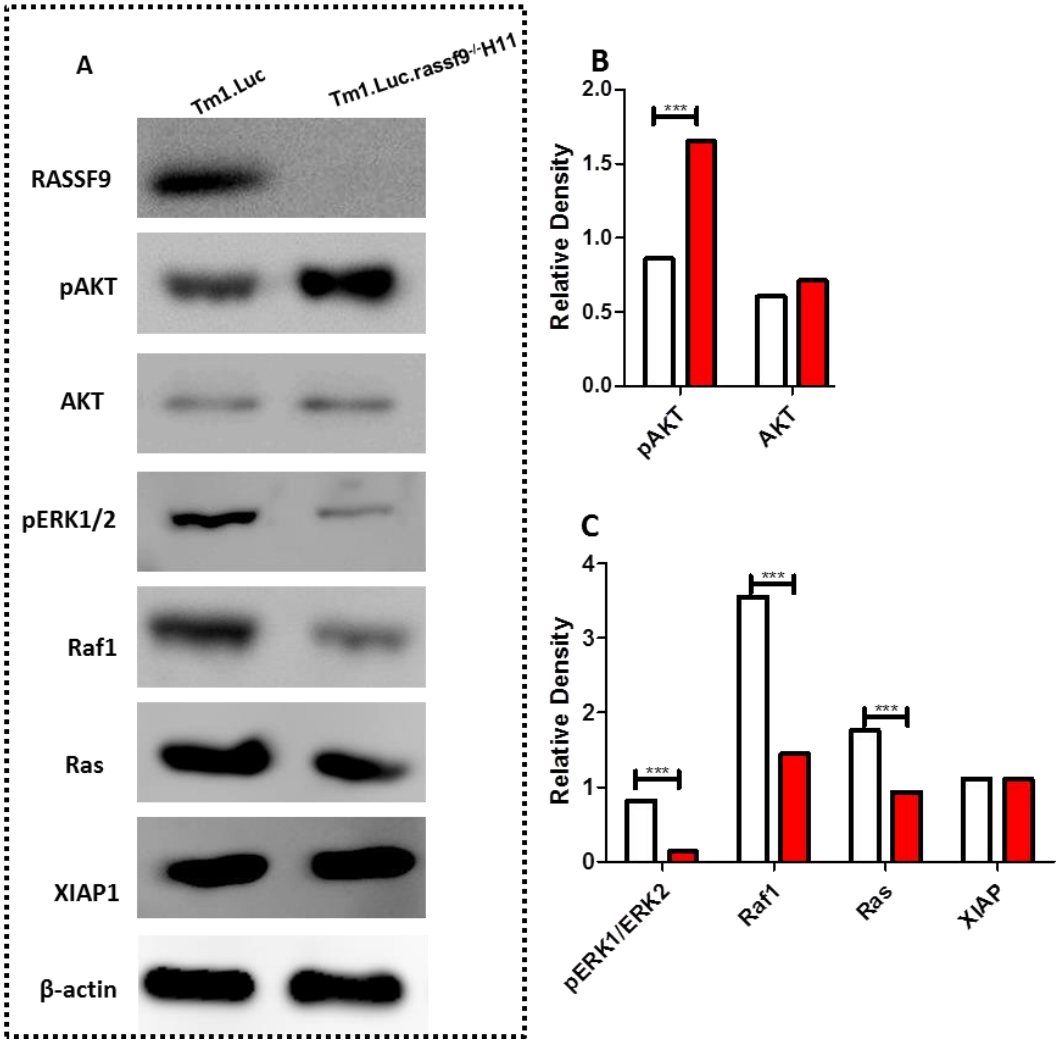

Figura 30 Avaliação do nível de expressão de proteínas chave de vias metabólicas

Em **A,** *Western Blot* de diferentes proteínas-chave em vias metabólicas, na primeira *lane* da linhagem selvagem Tm1.Luc e na segunda, da linhagem Tm1.Luc.*rassf9*$^{-/-}$H11. Em **B** e **C** a expressão relativa dessas proteínas em relação à β-actina.

4.4 Alterações de Crescimento *in vivo*

Além de avaliar as alterações decorrentes da depleção de RASSF9 *in vitro*, decidimos avaliar a cinética de crescimento dessas células *in vivo.* Para isso, $2.5x10^5$ células foram inoculadas no flanco de animais C57Bl6 e após o surgimento de um tumor palpável, as medidas dos diâmetros desses tumores foram obtidas com auxílio de um paquímetro. Quando os tumores apresentavam volumes iguais ou superior a $1.5cm^3$ os animais foram sacrificados, a mesma medida foi tomada se os tumores apresentassem pontos necróticos.

Com $2.5x10^5$ células, a linhagem Tm1.Luc apresentou a formação de tumores entre os dias 7 e 11 após a inoculação, com crescimento até $1.5cm^3$ em cerca de 10 dias (Figura 31- A e B, em preto). Com as linhagens Tm1.Luc.rassf9$^{-/-}$ G12 e Tm1.Luc.rassf9$^{-/-}$H11 observamos um atraso aparecimento de tumores palpáveis, sendo que estes apareceram entre os dias 15 e 17 (Figura 31 – A e B, em azul e vermelho), após o surgimento os tumores atingiram o volume de $1.5cm^3$ com cerca de 10 dias, similar ao observado pelas células controle.

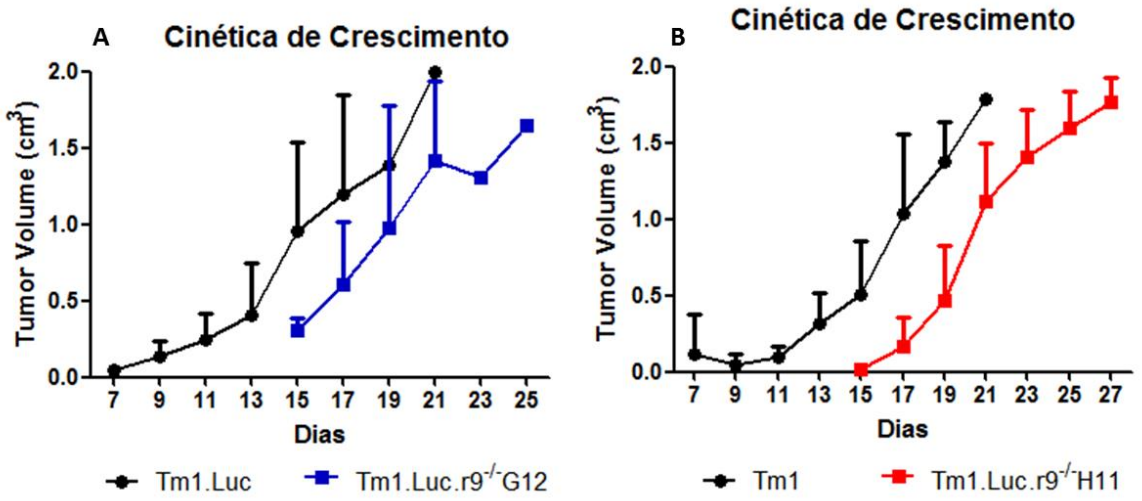

Figura 31: Curva de Crescimento das linhagens depletadas de RASSF9 *in vivo.* $2.5x10^5$ células das linhagens Tm1.Luc, Tm1.Luc.rassf9$^{-/-}$G12 e, Tm1.Luc.rassf9$^{-/-}$ H11 foram inoculadas no flanco posterior de animais C57Bl6 e os gráficos representam as medidas de volume observado após a formação de tumores palpáveis. Em A temos a cinética de crescimento da linhagem Tm1.Luc, Tm1.Luc.rassf9$^{-/-}$G12, em preto e azul, respectivamente e, em B, as linhagens Tm1.Luc e Tm1.Luc.rassf9$^{-/-}$H11 em preto e vermelho. A curva de crescimento com a linhagem Tm1.Luc.rassf9$^{-/-}$G12 em comparação com a linhagem Tm1.Luc foi realizado em simplificata técnica com 6 animais inoculados

de cada linhagem. Enquanto que os dados apresentados em B, da linhagem Tm1.Luc.rassf9$^{-/-}$H11 em comparação com a linhagem Tm1.Luc são dados representativos de três experimentos independentes com 5 animais inoculados de cada tipo celular.

Em consequência dessa alteração no tempo de aparecimento dos tumores palpáveis, houve também um aumento na curva de sobrevivência dos animais que receberam as linhagens deficientes de RASSF9 (Figura 32 – A e B). Esse aumento foi de 4 dias que corresponde ao menor período de atraso de crescimento apresentado pelas células nocaute. Isso indica que, bem como *in vitro*, RASSF9 apresenta funções na regulação da proliferação de células Tm1.Luc *in vivo.*

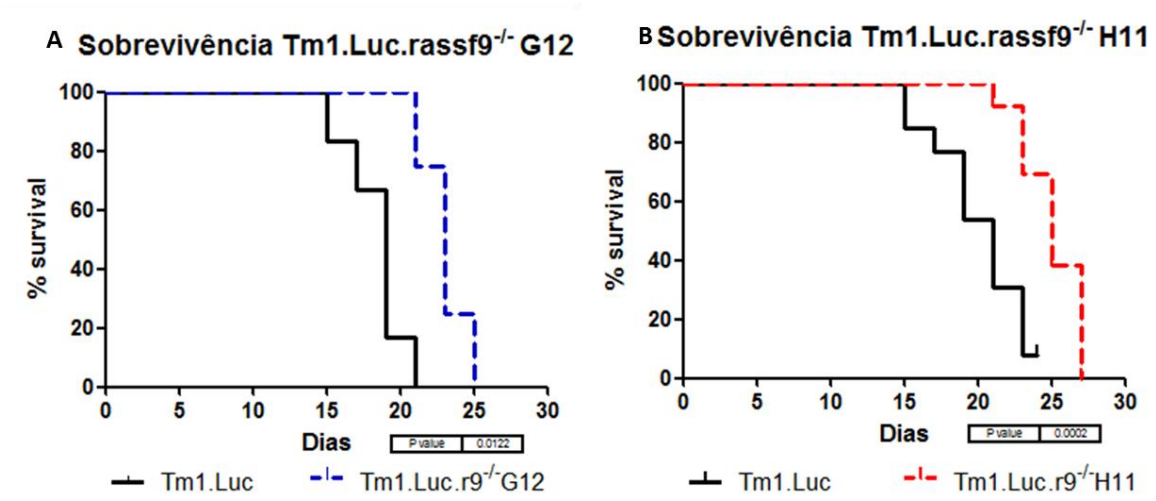

Figura 32: Curva de Sobrevida dos animais inoculado com as células nocaute. Determinação do perfil de sobrevivência dos animais após o inoculo com as linhagens tumorais, em A, a comparação de Tm1.Luc e Tm1.Luc.rassf9$^{-/-}$G12, enquanto que em B, a comparação de Tm1.Luc com Tm1.Luc.rassf9$^{-/-}$H11. Os dados apresentados com a linhagem Tm1.Luc.rassf9$^{-/-}$G12 em comparação com a linhagem Tm1.Luc foi realizado em unicata técnica com 6 animais inoculados de cada linhagem. Enquanto que os dados apresentados em B, da linhagem Tm1.Luc.rassf9$^{-/-}$H11 em comparação com a linhagem Tm1.Luc são dados representativos de três experimentos independentes com 5 animais inoculados de cada tipo celular.

5. Discussão

O desenvolvimento de câncer coloretal hereditário do tipo X (FCCTX - *Familial colorectal cancer type X)* é um dos critérios para o diagnóstico da Síndrome de Lynch, uma desordem genética proveniente de mutações nos genes das proteínas relacionadas ao reparo do DNA. Em cerca de 40% dos casos dessa síndrome não há alterações nesses genes, entretanto é observada a formação de tumores. Em busca de identificar quais regiões cromossômicas havia alterações que pudessem explicar os casos de FCCTX em um grupo de família de Amsterdam, Sánchez-Tomé e colaboradores (SÁNCHEZ-TOMÉ et al., 2015), identificaram que o *locus* de RASSF9 e este gene como um dos principais genes capazes de regular o processo de carcinogênese de FCCTX. Curiosamente, não foi observada nenhuma mutação no gene de RASSF9 neste estudo, em nossas análises com amostras de melanoma depositadas no TCGA observamos que apenas 3% apresentam mutações de sequência gênica

Figura **14**.

Os dados de RNA-Seq demonstraram que RASSF9 está, em média, 1.7 vezes mais expresso em melanoma (

Figura **14**) e que após separar as amostras de acordo com a estadiamento de Clark (1969) há um aumento discreto nos níveis de expressão em estadios intermediários II e III, e volta a diminuir em estadios IV e V (

Figura **14**4). O estadio IV está relacionado com a invasão da derme reticular, a camada mais profunda da derme, a qual é formada por tecido conjuntivo denso não modelado. Nela são encontrados capilares sanguíneos que auxiliam na evasão das células tumorais a outros órgãos e tecidos do organismo (H. et al., 2012; JOSÉ CARNEIRO ; LUIZ C. JUNQUEIRA, 2012).

Nós também comparamos o nível de expressão em linhagens não metastáticas (Tm1.Luc e B16-F0) com a expressão de linhagem metastática (B16-F10), nós observamos níveis similares entre as linhagens não metastáticas e uma redução na linhagem metastática (Figura 155). Esses dados são similares ao

observado com RASSF8 por Wang e colaboradores (WANG et al., 2015b), onde o nível de expressão desse gene em linhagens de melanócitos humanos foi de cerca de 20 vezes maior que em linhagens altamente metastáticas de melanoma humano. A diminuição da expressão de RASSF8 se dá pela metilação das ilhas CpGs presentes no promotor desse gene. Utilizando os dados disponíveis do TCGA, os autores viram uma correlação inversamente proporcional entre os níveis de expressão de RASSF8 e o perfil de hipermetilação do promotor do gene, ou seja, quanto maior o número de metilação do promotor, menor a expressão gênica. Esses dados foram confirmados *in vitro* com o tratamento das células com agente demetilante seguido por determinação dos níveis de expressão de RASSF8 após o tratamento.

A hipermetilação do promotor é o mecanismo de supressão da expressão de RASSF6 em melanoma e é a principal forma de regulação da expressão descrita até agora desses genes em vários tipos de tumor (MEZZANOTTE et al., 2014; VOLODKO et al., 2014). Entretanto, RASSF9 é o único membro da família a não apresentar as ilhas CpGs clássicas (RICHTER et al., 2015) e, ao observamos a correlação entre expressão de mRNA de RASSF9 e com o nível de hipermetilação de seu promotor, obtivemos tanto para Pearson quanto para Spearman correlações não lineares entre esses parâmetros. Esses dados sugerem que, em melanoma, a regulação da expressão de RASSF9 não se dá por hipermetilação do promotor.

RASSF8 e RASSF6 foram identificados como supressores tumorais em melanoma (AKBANI et al., 2015; MEZZANOTTE et al., 2014), nossos dados sugerem que RASSF9 pode apresentar função similar, entretanto indicam uma necessidade de maiores análises. A utilização de outras linhagens de melanoma, com diferentes níveis de agressividade e a determinação do nível de expressão de RASSF9 nesse quadro. Além de ensaios com o tratamento das linhagens tumorais com agentes demetilantes como 5-azacitidina e posterior determinação dos níveis de expressão de RASSF9.

Para definirmos a função de RASSF9 nós optamos pela utilização de genética reversa para o nocaute gênico. Existem diferentes técnicas para realizar

esse tipo de alteração genômica. A utilização de endonucleases sitio específicas como as *zinc-finger nucleases* (ZFNs) ou *transcription activator–like effector nucleases* (TALENs) são abordagens que garantem um reconhecimento da sequência-alvo com grande especificidade. Ambas as abordagens geram quebras na dupla-fita de DNA (DSBs- *DNA double-stranded breaks*) em um determinado locus, as quais são reparadas por dois sistemas principais de reparo do DNA da própria célula. Existem dois mecanismos descritos: a junções de terminações não-homólogas (NHEJ - *Non-homologous end-joining*) e o reparo direcionado por homologia (HDR - *Homology directed repair*), em ambos os sistemas é recorrente a alteração nas sequências-alvo originadas por inserções e/ou deleções de bases. Entretanto, nocaute por TALEN ou ZFN apresenta algumas dificuldades técnicas, por exemplo, é necessária a construção de novas proteínas quando se quer o nocaute de outra sequência, o que torna ambas as técnicas caras. (GAJ, 2014; MAEDER; GERSBACH, 2016; OSBORN et al., 2016).

Recentemente, o sistema CRISPR/Cas9 acabou se tornando uma alternativa barata e eficiente para realizar nocaute gênico em diversos animais de estudo incluindo células de mamíferos. Brevemente, o sistema CRISPR/Cas9 foi primeiramente identificado como uma forma de imunidade adaptativa de bactérias e *Archea.* O locus CRISPR (*Clustered Regulary Interspaced Short Palindromic* Repeats) é constituído por sequências repetitivas curtas intercaladas por sequências exógenas capturadas de bacteriófagos ou vetores invasores. Após o processo de aquisição e incorporação de sequências, entra a fase de vigilância, nesta as sequências são transcritas e, frente uma nova infecção, acaba pareando com a sequência invasora e ativa a fase de interferência. Nessa ultima fase, as proteínas Cas (*CRISPR Associated*) são ativadas e clivam o DNA invasor, protegendo a bactéria ou *Archea* de uma nova infecção. (BHAYA; DAVISON; BARRANGOU, 2011; DOUDNA; CHARPENTIER, 2014; MALI; ESVELT; CHURCH, 2013).

A transposição desse mecanismo para a pesquisa levou em consideração o que já se sabe sobre a utilização de endonucleases para genética reversa. Além disso, a descoberta de que é necessário apenas três elementos: a sequência PAM

(*Protospacer Adjacent Motif*) uma sequência de três nucleotídeos (NGG) posterior à sequência-alvo necessário para a correta interação da enzima com o DNA; a endonuclease Cas9, utilizada por ser a única Cas que apresenta o sítio de reconhecimento e de clivagem na mesma sequência; e, por fim, o sgRNA (*small guide RNA*), uma sequência de 20 nucleotídeos que define a sequência-alvo que será clivado pela Cas9. Após a clivagem, o mecanismo de reparo é ativado e gera alteração na sequência de DNA, alterando a janela de leitura e/ou adicionando um stop códon ao RNA mensageiro (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014; SONG, 2017). A utilização de CRISPR/Cas9 em diferentes modelos de estudo vem sendo realizado com sucesso. Em melanoma, por exemplo, Shalen e colaboradores (SHALEM et al., 2014) realizaram um *screening* com uma biblioteca de sgRNA a fim de identificar os genes envolvidos na resistência à vemurafenib. Além disso, Yin e colaboradores (YIN et al., 2014) utilizaram CRISPR/Cas9 na reversão da mutação de uma doença no fígado de camundongos.

Neste trabalho, nós utilizamos a ferramenta CRISPR/Cas9 no nocaute de RASSF9 após a construção do vetor com a inserção do sgRNA específico de RASSF9 (Figura 16,Figura 17) obtivemos linhagens de melanoma Tm1.Luc com depleção da expressão desse gene. Confirmamos a edição gênica e depleção de RASSF9 a nível de DNA (Figura 19), demonstrando a formação de INDELs que alteraram a janela de leitura e introduziram um *stop códon* à sequência das proteínas geradas pelos dois clones Tm1.RASSF9$^{-/-}$G12 e Tm1.RASSF9$^{-/-}$H11 .

Além disso, analisamos a nível proteico a presença ou ausência de RASSF9 nos dois clones selecionados. Na Figura 20 temos o Western que confirma a ausência da expressão da proteína RASSF9. Como a proteína Cas9 tem cerca de 160KDa tivemos alguns problemas na transferência do gel para a membrana, por uma limitação da técnica de transferência utilizada, a *semi dry*. Tentamos a transferência com sistema úmido e a 4°C por 16 horas, entretanto o nível de expressão do *tag* se manteve baixo. Isso pode ter ocorrido pelo número de vírus que entraram nas células e, por consequência uma taxa de expressão baixa de Cas9 ou ainda por problemas no reconhecimento do promotor presente, o EF-1α. No western Blot avaliamos a presença da proteína desnaturada,

enquanto que na imunofluorescência (Figura 22), podemos observar que os dois clones selecionados, Tm1.RASSF9$^{-/-}$G12 e Tm1.RASSF9$^{-/-}$H11, também não apresentam formas ativas da proteína.

Afim de analisar as consequências da depleção de RASSF9, partimos, após essas confirmações para ensaios de *in vitro* e *in vivo.* Analisamos a proliferação, *in vitro*, a resistência à indução de morte por estaurosporina, o *status* de diferentes proteínas centrais em vias de sinalizações clássicas e relacionadas com a função de outros membros da família RASSF. Ainda avaliamos as consequências no crescimento tumoral *in vivo* decorrentes da ausência de RASSF9.

Avaliamos a capacidade de replicação das células por diferentes metodologias, na incorporação com corante de viabilidade VPD450 (Figura 233) não observamos diferenças nas células deficientes e suficientes de RASSF9. Entretanto, ao analisarmos a cinética de crescimento das células (Figura 244) observamos que a partir do dia 6 há uma redução significativa no número de células que foram submetidas à edição gênica, essas células também não foram capazes de atingirem número similar às células cuja expressão de RASSF9 se apresenta inalterada. Aparentemente, essa redução não está relacionada a alteração na viabilidade das células definida por marcação com azul de Trypan (Figura 24).A participação de RASSF9 na proliferação de Tm1.Luc também foi avaliada pelo ensaio clonogênico com variação no número inicial de células ($5x10^2$ e 10^3 células). Verificamos uma drástica redução na capacidade de formação de colônias pelas células nocautes de RASSF9 nas duas concentrações iniciais analisadas (

Figura 25), além do número reduzido de colônias observadas, houve também uma redução no número de células por colônia.

Vários estudos recentes vêm enfatizando a relevância do uso de culturas 3D. Os esferoides mimetizam de forma mais eficiente o microambiente tumoral, a resposta a rogas e as vias de sinalizações atuantes na formação de tumores sólidos que as células em monocamadas (EWALD, 2017; RAVI et al., 2015; RIEDL et al., 2017). Nós testamos um protocolo de formação de esferoides no qual as células foram plaqueadas em agarose 1% e submetidas a centrifugação para

auxiliar na agregação e formação dos esferoides e as imagens foram coletadas após 4 e 7 dias de incubação (Figura 266 e Figura 277). Mesmo sem a formação de esferoides que nos permitisse a quantificação e comparação entre as amostras, podemos ver que nas menores concentrações de célula, há uma maior densidade de células nos esferoides formados pelas células que expressam RASSF9. Enquanto que nas maiores concentrações ($7,5x10^4$ e10^5) aparentemente há uma maior concentração de células nos esferoides das células nocautes de RASSF9. No dia 10, ainda podemos observar a formação de um ponto central que é característico de formação de ponto necrótico (RAVI et al., 2015).

Esses dados indicam em conjunto indicam que RASSF9 está envolvida na proliferação de Tm1.Luc, o que corrobora com o já descrito na literatura sobre a função dessa proteína. Foi visto que RASSF9 interage com o complexo ASPP1 (*apoptosis stimulating proteins of p53*) e ASPP2 durante a segregação comossomal. Ambas são consideradas supressores tumorais e, como tal, apresentam níveis reduzidos de expressão em vários tipos de tumor. ASPP2 é capaz de se ligar ao complexo PAR, que está relacionado a polarização celular e a divisões assimétricas (HAURI et al., 2013; MECHTLER; KNOBLICH, 2003; ZHANG et al., [s.d.]).

Divisões assimétricas ocorrem em diversos organismos, *D. melanogaster* é essencial durante a formação do órgão sensorial precursor (SOP- *sensory organ precursor*) e em mamíferos é um processo celular essencial na formação da pele. O homólogo de RASSF9 em *D. melanogaster,* MERU, apresenta cerca de 30% de similaridade com a proteína de humanos e foi vista como um regulador chave na polarização e na divisão assimétrica que ocorre durante a formação do SOP (BANERJEE et al., 2017).

Durante a embriogênese de mamíferos a formação da pele se dá por células-tronco presentes na camada basal, nelas ocorre uma divisão assimétrica com organização do fuso mitótico numa posição perpendicular à da membrana basal. Essa divisão dá origem a células que ainda apresentam um potencial proliferativo e onde há ciclos de divisão lateral, em sua maioria. A diminuição da capacidade proliferativa ocorre de modo paralelo a diferenciação das células das

camadas superiores. Assim, após a formação do órgão, são as células da camada próxima à membrana casal responsáveis pela renovação do tecido, a qual ocorre com divisões assimétricas (DEGREGORI et al., 2005; JIA et al., 2016; MANUSCRIPT, 2006).

O descontrole das divisões assimétricas está associado as lesões de pele presentes em psoríases e diferentes vias metabólicas estão atuando no controle desse fenômeno (JIA et al., 2016). PDK1 (*Phosphoinositide-dependent kinase-1*) é uma serina-treonina quinase e foi vista como um elemento crucial no processo de divisão assimétrica. Sua atividade é dependente da ativação de PI3K a partir de receptores de fatores de crescimento ou de adesão celular e seus alvos são AKT, PKC (*protein kinase C*) e aPCK (*Atypical protein kinase C*), sendo que essa última também está presente no complexo Par, comentado anteriormente. Na divisão assimétrica, a ação de PDK1 culmina na ativação da via Notch importante também na diferenciação dos queratinócitos (DAINICHI et al., 2016).

RASSF9 aparece como um fator crucial na diferenciação de queratinócitos de murinos. Em estudo com modelo nocaute, Lee e colaboradores (2011) demonstraram que os animais cuja expressão de RASSF9 foi suprimida apresentaram hiperplasia e células indiferenciadas na pele. Além disso, os animais apresentaram sinais de envelhecimento precoce e uma redução na taxa de sobrevivência. Na pele dos animais nocautes houve uma redução nos níveis de expressão de CKI1 (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1*) uma proteína que auxilia no controle da progressão do ciclo celular da fase G_1 para a fase S.

Após a inoculação de $2{,}5x10^5$ células no flanco posterior de animais C57Bl6 e acompanhamento do crescimento dos tumores palpáveis (Figura 31) nós observamos um atraso no crescimento dos tumores originados da inoculação de células depletadas de RASSF9. Apesar desse atraso, não foi diferenças significativas no perfil de crescimento dos tumores, com estes alcançando cerca de $1{,}5cm^3$ após cerca de 10 dias de seu aparecimento. O atraso no aparecimento dos tumores nocautes de RASSF9 resultou em um aumento na sobrevida dos animais (Figura 322). Esses dados sugerem que RASSF9 apresenta funções na proliferação *in vivo* e *in vitro* de melanoma. A resposta inflamatória e células em

apoptose são fatores relevantes no estabelecimento tumoral (BACHI et al., 2012; CORREA et al., 2005), entretanto nós não avaliamos esses ponto para entendermos o motivo que acarretou no atraso do aparecimento dos tumores nocautes de RASSF9 nos animais analisados. A utilização de diferentes concentrações de células inoculadas pode afetar o perfil de crescimento e a formação de metástases de células de câncer de mama (GREGÓRIO et al., 2016). A utilização de outras concentrações iniciais de células e análises histológicas dos tumores formados poderá elucidar por qual mecanismo RASSF9 contribui na formação e no estabelecimento de melanoma.

As proteínas quinases são responsáveis pela transferência de um ATP (*adenosine triphosphate*) à seu alvo, mediando a transdução de sinal e permitindo o controle de diversos fenômenos celulares, como a progressão no ciclo celular, organização do citoesqueleto, diferenciação, apoptose e divisão celular (MALUMBRES, 2014). Drogas que atuam no bloqueio da atividade dessas proteína acarretam na morte celular, como é o caso da estaurosporina, é um inibidor não específico de serino/treonina quinases que induz apoptose em diferentes tipos celulares. O mecanismo pelo qual essa morte celular ocorre não está claro e pode variar de acordo com o tipo celular, a concentração da droga e o tempo de incubação. Podendo a morte ser induzida através do aumento de cálcio citosólico ou pela ativação de moléculas centrais no processo de apoptose. A estaurosporina foi isolada a partir de *Streptomyces* e vem sendo amplamente utilizadas em terapias antitumorais e no controle de algumas pestes e parasitas (DESHMUKH; JOHNSON, 2000; ŌMURA; ASAMI; CRUMP, 2018).

Neste trabalho nós tratamos as células com estaurosporina em duas concentrações (125 e 500nM) e avaliamos a porcentagem de células positivas para Anexina V e Sytox Green (Figura 29). Nossos dados mostraram diferenças na porcentagens de células em processo de morte celular entre os dois clones nocautes gerados, Tm1.rassf9$^{-/-}$G12 e Tm1.RASSF9$^{-/-}$H11, com o primeiro apresentando dados similares às células Tm1.Luc e o segundo apresentando uma resistência a indução de morte após o tratamento com estaurosporina. Olive e colaboradores(2018) trazem uma prova de conceito e sugerem que a diluição

clonal seja realizada anteriormente a edição gênica e repetida logo após a edição gênica. Como comentado, a linhagem utilizada passou por uma diluição clonal durante o trabalho de mestrado da aluna Priscilla Carvalho (dados não publicados), neste trabalho, foi adicionado a linhagem Tm1 a expressão de luciferase. Pretendemos analisar mais clones gerados a partir do mesmo sgRNA e clones obtidos após a transdução das células com o segundo sgRNA, isso deverá elucidar qual clone apresenta a real consequência da ausência da expressão de RASSF9 em Tm1.Luc após o tratamento com estaurosporina.

RASSF9 interagindo com a proteína Ras (CHAN; KATAN, 2013; RODRIGUEZ-VICIANA; SABATIER; MCCORMICK, 2004), mediante esta informação decidimos avaliar o nível de expressão de Ras após o nocaute de RASSF9 (Figura 30). Houve uma redução de cerca de 50% do nível de expressão de Ras após nocaute de RASSF9 no clone Tm1.RASSF9$^{-/-}$H11. O nível de expressão de Raf-1, também conhecida como CRAF, também foi diminuída nas células nocautes. Como comentado anteriormente, RASSF1A interage com Mst2, a qual, Kilili e colaboradores (2010) observaram que a supressão aumenta a fosforilação de um sítio inibitório de Raf-1, como consequência, diminuendo a ativação de ERK e reduzindo a proliferação celular.

ERK, um dos principais substratos de RAF está hiperativado nos casos de melanoma que apresentam variantes de Ras mutadas (AKBANI et al., 2015) sua ativação pela via Ras está relacionada a formação de hepatocarcinoma (DELIRE; STÄRKEL, 2015). Além disso, é uma molécula que pode apresentar funções anti-apoptóticas por sua capacidade de ativar a via Hippo, a qual é regulada pelas proteínas RASSF (OCEANDY et al., 2019).

A via Ras/Raf/MEK/ERK é responsável pela regulação da sobrevivência e proliferação das células (YAJIMA et al., 2012) e sua supressão pode explicar a redução na proliferação observada pelas células RASSF9 deficientes. Interessantemente, nossos dados mostraram níveis similares de AKT total e um aumento da forma fosforilada dessa proteína nas células RASSF9$^{-/-}$. A via PI3K-AKT está envolvida com a proliferação celular e pode se conectar com a via Ras/Raf/MEK/ERK em vários pontos. O primeiro é através da ativação de Ras via

ativação de PI3K, ou ainda, AKT pode fosforilar sítios inibitórios de RAF1(CASTELLANO; DOWNWARD, 2011). Não podemos assumir que a diminuição da expressão se RAF1 está por uma supressão via AKT e mais analises precisam ser feitas para melhor entendermos o significado deste resultado. Curiosamente, em um trabalho recente, demonstrou que a supressão de RASSF9 em câncer de mama induzia a proliferação, o oposto do que ocorreu no nosso trabalho, entretanto também foi observado um aumento da ativação de AKT (LI et al., 2018).

Nós também analisamos o nível de expressão de XIAP, uma proteína que inibe a apoptose por sua interação com caspase-3, -7 e -9(AS; LIGASE; CELLULAR, 2011). Não houve alterações significativas no nível de expressão dessa proteína entre as células suficientes e deficientes de RASSF9. Nós iremos analisar outros membros da família IAP para avaliar sua interação com RASSF9.

Membros da família RASSF foram identificados regulando várias vias em câncer e em células não transformadas. NFκB, por exemplo, é regulada por RASSF8 durante a progressão de melanoma (WANG et al., 2015b) e RASSF7 regula a via Ras/Raf/MEK/ERK pela associação com o complexo DISC-1 durante a astrogênese (WANG et al., 2016). Enquanto RASSF9 foi descrita participando da regulação da via Hippo.

Mesmo que a descrição de RASSF9 não seja recente, há poucas informações sobre a ação dessa proteína e suas interações. Aqui trouxemos algumas possibilidades de funções e parceiros em melanoma, o que abre a possibilidade para uma melhor compreensão a respeito da importância de RASSF9 em melanoma.

6. Conclusão

Neste trabalho nós mostramos a construção de uma linhagem de melanoma murino não-metastático nocaute para RASSF9, através da técnica CRISPR/Cas9. Essas linhagens modificadas demonstraram alterações em sua capacidade proliferativa *in vitro* e *in vivo*. Apresentamos indícios que essas modificações possam ser em decorrência de uma supressão da via Ras/Raf/MEK/ERK.

7. Referências

AKBANI, R. et al. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. **Cell**, v. 161, n. 7, p. 1681–1696, 2015.

ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell 6e**. [s.l: s.n.]. v. 6

ALEXANDER, R. A. UC Berkeley UC Berkeley Electronic Theses and Dissertations. **UC Berkeley Electronic Theses and Dissertations**, p. 133, 2012.

ASCIERTO, P. A. et al. The role of BRAF V600 mutation in melanoma. **Journal of translational medicine**, v. 10, p. 85, 2012.

AZOURY, S. C.; LANGE, J. R. **Epidemiology, Risk Factors, Prevention, and Early Detection of MelanomaSurgical Clinics of North America**, 2014.

BALCH, C. M. et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. **Journal of Clinical Oncology**, 2009.

BANKS, H. T. Modeling of Cell Proliferation with Flow Cytometry Data from CFSE-based Assays. **PPT file**, [s.d.].

BARABAS, K. et al. Cisplatin: A review of toxicities and therapeutic applications. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 6, n. 1, p. 1–18, 2008.

BARNOUD, T.; DONNINGER, H.; CLARK, G. J. Ras Regulates Rb via NORE1A *. v. 291, n. 6, p. 3114–3123, 2016.

BENNETT, D. C. Genetics of melanoma progression: The rise and fall of cell senescence. **Pigment Cell and Melanoma Research**, v. 29, n. 2, p. 122–140, 2016.

BHAYA, D.; DAVISON, M.; BARRANGOU, R. CRISPR-Cas Systems in Bacteria and Archaea: Versatile Small RNAs for Adaptive Defense and Regulation. **Annual Review of Genetics**, v. 45, n. 1, p. 273–297, 2011.

BITRA, A. et al. Rassf proteins as modulators of Mst1 kinase activity. **Scientific Reports**, v. 7, n. February, p. 1–11, 2017.

BOS, J. L. From Ras to Rap and back, a journey of 35 years. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 8, n. 2, 2018.

BOURNET, B. et al. KRAS G12D Mutation Subtype Is A Prognostic Factor for Advanced Pancreatic Adenocarcinoma. **Clinical and Translational Gastroenterology**, 2016.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.

BRESLOW, A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. **Annals of surgery**, 1970.

BULMAN, A.; NEAGU, M.; CONSTANTIN, C. Immunomics in Skin Cancer - Improvement in Diagnosis, Prognosis and Therapy Monitoring. **Current Proteomics**, 2013.

CALVISI, D. F. et al. NORE1A tumor suppressor candidate modulates p21CIP1 via p53. **Cancer Research**, 2009.

CHAN, J. J.; KATAN, M. PLCe{open} and the RASSF family in tumour suppression and other functions. **Advances in Biological Regulation**, v. 53, n. 3, p. 258–279, 2013.

CHEN, J. et al. H-Ras regulation of TRAIL death receptor mediated apoptosis. v. 5, n. 13, p. 14–18, 2014.

CHEN, L.; JOHNSON, R. C.; MILGRAM, S. L. P-CIP1, a novel protein that interacts with the cytosolic domain of peptidylglycine ??-amidating

monooxygenase, is associated with endosomes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 50, p. 33524–33532, 1998.

CHUMMUN, S.; MCLEAN, N. R. **The management of malignant skin cancersSurgery (United Kingdom)**, 2017.

CLARK, W. H. et al. The Histogenesis and Biologic Behavior of Primary Human Malignant Melanomas of the Skin. **Cancer Research**, 1969.

COX, A. D.; DER, C. J. Ras history. **Small GTPases**, v. 1, n. 1, p. 2–27, 2010.

DAINICHI, T. et al. HHS Public Access. v. 15, n. 8, p. 1615–1623, 2016.

DALLOL, A. et al. Involvement of the RASSF1A tumor suppressor gene in controlling cell migration. **Cancer Research**, v. 65, n. 17, p. 7653–7659, 2005.

DAMMANN, R. et al. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21 . 3. v. 25, n. july, p. 315–319, 2000.

DEGREGORI, J. et al. Mail Stop 8101 Asymmetric Cell Division in Skin Development : A New Look at an Old Observation. p. 2003–2005, 2005.

DELIRE, B.; STÄRKEL, P. The Ras/MAPK pathway and hepatocarcinoma: Pathogenesis and therapeutic implications. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 45, n. 6, p. 609–623, 2015.

DENIS, G. V et al. Bcl-2 , via Its BH4 Domain , Blocks Apoptotic Signaling Mediated by Mitochondrial Ras *. v. 278, n. 8, p. 5775–5785, 2003.

DESHMUKH, M.; JOHNSON, E. M. Staurosporine-induced neuronal death: Multiple mechanisms and methodological implications. **Cell Death and Differentiation**, v. 7, n. 3, p. 250–261, 2000.

DONNINGER, H. et al. Ras signaling through RASSF proteins. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 58, p. 86–95, 2016.

DONNINGER, H. et al. Ras signaling through RASSF proteins. p. 86–95, 2017.

DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**, v. 346, n. 6213, p. 1258096–1258096, 2014.

ECKFELD, K. et al. RASSF4/AD037 is a potential Ras effector/tumor suppressor of the RASSF family. **Cancer Research**, v. 64, n. 23, p. 8688–8693, 2004.

ENGIN, H. B. et al. Modeling of RAS complexes supports roles in cancer for less studied partners. v. 10, n. Suppl 1, p. 1–15, 2017.

EWALD, A. J. 3D cell biology – the expanding frontier. **Journal of Cell Science**, v. 130, n. 1, p. 1–1, 2017.

FALKENBERG, K. J.; JOHNSTONE, R. W. Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, n. 9, p. 673–691, 2014.

FALVELLA, F. S. et al. Identification of RASSF8 as a candidate lung tumor suppressor gene. p. 3934–3938, 2006.

FERNÁNDEZ-MEDARDE, A.; SANTOS, E. Ras in cancer and developmental diseases. **Genes and Cancer**, v. 2, n. 3, p. 344–358, 2011.

FRANKEN, N. A. P. et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315–2319, 2006.

FUKATSU, A. et al. RASSF3 downregulation increases malignant

phenotypes of non-small cell lung cancer. **Lung Cancer**, 2014.

GAJ, T. ZFN, TALEN and CRISPR/Cas based methods for genome engineering. **2013**, v. 31, n. 7, p. 397–405, 2014.

GALLUZZI, L. et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. **Oncogene**, v. 31, n. 15, p. 1869–1883, 2012.

GHOSH, P.; CHIN, L. **Genetics and genomics of melanomaExpert Review of Dermatology**, 2009.

GOLDSTEIN, B. G.; GOLDSTEIN, A. O. **Diagnosis and management of malignant melanomaAmerican Family Physician**, 2001.

GORDON, M.; BAKSH, S. Rassf1a. **Small GTPases**, v. 2, n. 3, p. 148–157, 2011.

GREGÓRIO, A. C. et al. Inoculated cell density as a determinant factor of the growth dynamics and metastatic efficiency of a breast cancer murine model. **PLoS ONE**, v. 11, n. 11, p. 1–19, 2016.

GULSEN, T. et al. Truncated RASSF7 promotes centrosomal defects and cell death. **Developmental Biology**, v. 409, n. 2, p. 502–517, 2016.

GUO, J. et al. RASSF10 suppresses colorectal cancer growth by activating P53 signaling and sensitizes colorectal cancer cell to docetaxel. v. 6, n. 6, [s.d.].

H., T. et al. Melanoma: From mutations to medicine. **Genes and Development**, v. 26, n. 11, p. 1131–1155, 2012.

HAUKE, J.; KOSSOWSKI, T. Comparison of Values of Pearson's and Spearman's Correlation Coefficients on the Same Sets of Data. **Quaestiones Geographicae**, 2011.

HAURI, S. et al. Interaction proteome of human Hippo signaling: Modular

control of the co-activator YAP1. **Molecular Systems Biology**, v. 9, n. 1, p. 1–16, 2013.

HENNIG, A. et al. Ras activation revisited: Role of GEF and GAP systems. **Biological Chemistry**, v. 396, n. 8, p. 831–848, 2015.

HILL, V. K. et al. Epigenetic inactivation of the RASSF10 candidate tumor suppressor gene is a frequent and an early event in gliomagenesis. **Oncogene**, v. 30, n. 8, p. 978–989, 2010.

HUTCHINSON, F.; CANCER, S.; ALLIANCE, C. Treatment of Metastatic Melanoma : An Overview - Cancer Network Treatment of Metastatic Melanoma : An Overview Treatment of Metastatic Melanoma : An Overview - Cancer Network. **Network**, v. 23, n. 6, p. 1–7, 2010.

IGLESIAS GÃ^{3}MEZ, J. C.; MOSQUERA ORGUEIRA, A. An Integrative Analysis of Meningioma Tumors Reveals the Determinant Genes and Pathways of Malignant Transformation. **Frontiers in Oncology**, v. 4, n. June, p. 1–12, 2014.

IKEDA, M. et al. Ras-association domain family protein 6 induces apoptosis via both caspase-dependent and caspase-independent pathways. **Experimental Cell Research**, 2007.

ITZEN, A.; GOODY, R. S. Seminars in Cell & Developmental Biology GTPases involved in vesicular trafficking : Structures and mechanisms. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 22, n. 1, p. 48–56, 2011.

IWASA, H. et al. The RASSF6 tumor suppressor protein regulates apoptosis and the cell cycle via MDM2 protein and p53 protein. **Journal of Biological Chemistry**, 2013.

IWASA, H.; HOSSAIN, S.; HATA, Y. Tumor suppressor C - RASSF proteins. **Cellular and Molecular Life Sciences**, n. 0123456789, 2018.

IWASA, H.; JIANG, X.; HATA, Y. RASSF6; the putative tumor suppressor of the RASSF family. **Cancers**, v. 7, n. 4, p. 2415–2426, 2015.

J. SAMBROOK, D.W. RUSSELL. **Molecular cloning : a laboratory manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.** [s.l: s.n.].

JACQUEMART, I. C.; SPRINGS, A. E. B.; CHEN, W. Y. Rassf3 is responsible in part for resistance to mammary tumor development in neu transgenic mice. **International Journal of Oncology**, v. 34, n. 2, p. 517–528, 2009.

JIA, H. et al. Asymmetric stem-cell division ensures sustained keratinocyte hyperproliferation in psoriatic skin lesions. p. 359–368, 2016.

JIN, Y. et al. RASSF10 suppresses hepatocellular carcinoma growth by activating P53 signaling and methylation of RASSF10 is a docetaxel resistant marker. v. 6, n. May, 2015.

JOSÉ CARNEIRO ; LUIZ C. JUNQUEIRA. **Biologia celular e molecularGuanabara Koogan**, 2012.

KADER, F.; GHAI, M.; MAHARAJ, L. The e ff ects of DNA methylation on human psychology. v. 346, n. November 2017, p. 47–65, 2018.

KHOKHLATCHEV, A. et al. Identification of a Novel Ras-Regulated Proapoptotic Pathway. v. 12, n. 02, p. 253–265, 2002.

KILILI, G. K.; KYRIAKIS, J. M. Mammalian ste20-like kinase (Mst2) indirectly

supports Raf-1/ERK pathway activity via maintenance of protein phosphatase-2A catalytic subunit levels and consequent suppression of inhibitory Raf-1 phosphorylation. **Journal of Biological Chemistry**, 2010.

KITA, R.; FRASER, H. B. Local Adaptation of Sun-Exposure-Dependent Gene Expression Regulation in Human Skin. **PLoS Genetics**, v. 12, n. 10, p. 1–18, 2016.

KITAJIMA, S.; THUMMALAPALLI, R.; BARBIE, D. A. **Inflammation as a driver and vulnerability of KRAS mediated oncogenesisSeminars in Cell and Developmental Biology**, 2016.

KOTURENKIENE, A. et al. Kinetic characterization of apoptotic Ras signaling through Nore1-MST1 complex formation. v. 398, p. 701–707, 2017.

KUDO, T. et al. The RASSF3 Candidate Tumor Suppressor Induces Apoptosis and G 1 – S Cell-Cycle Arrest via p53. p. 2901–2912, 2012.

KUMARASWAMY, A. et al. The non-enzymatic RAS effector RASSF7 inhibits oncogenic c-Myc function. n. 4, p. 1–24, 2018.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 1970.

LAVOIE, H.; THERRIEN, M. Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 16, n. 5, p. 281–298, 2015.

LEE, C. M. et al. A novel role of RASSF9 in maintaining epidermal homeostasis. **PLoS ONE**, v. 6, n. 3, 2011.

LI, B. et al. MicroRNA-1254 exerts oncogenic effects by directly targeting RASSF9 in human breast cancer. **International Journal of Oncology**, v. 53, n. 5, p. 2145–2156, 2018.

LI, S. et al. The Emerging Roles of RASSF5 in Human Malignancy. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 3, p. 314–322, 2017.

LI, W.; MELTON, D. W. Cisplatin regulates the MAPK kinase pathway to induce increased expression of DNA repair gene ERCC1 and increase melanoma chemoresistance. **Oncogene**, v. 31, n. 19, p. 2412–2422, 2012.

LI, X. et al. RASSF7 and RASSF8 proteins are predictive factors for development and metastasis in malignant thyroid neoplasms. **Journal of cancer research and therapeutics**, v. 9 Suppl, p. S173-7, 2013.

LI, Z. et al. RASSF10 is an epigenetically silenced tumor suppressor in gastric cancer. p. 1661–1668, 2014.

LOCK, F. E. et al. The RASSF8 candidate tumor suppressor inhibits cell growth and regulates the Wnt and NF-κB signaling pathways. **Oncogene**, v. 29, n. 30, p. 4307–4316, 2010.

MACKENZIE ROSS, A. D. et al. Senescence evasion in melanoma progression: Uncoupling of DNA-damage signaling from p53 activation and p21 expression. **Pigment Cell and Melanoma Research**, v. 26, n. 2, p. 226–235, 2013.

MAEDER, M. L.; GERSBACH, C. A. Genome-editing Technologies for Gene and Cell Therapy. **Molecular Therapy**, v. 24, n. 3, p. 430–446, 2016.

MALI, P.; ESVELT, K. M.; CHURCH, G. M. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. **Nature Methods**, v. 10, n. 10, p. 957–963, 2013.

MALUMBRES, M. Cyclin-dependent kinases. **Genome Biology**, v. 15, n. 6, p. 122, 2014.

MANUSCRIPT, A. differentiation of mammalian skin. v. 437, n. 7056, p.

275–280, 2006.

MANUSCRIPT, A. NIH Public Access. v. 11, n. 11, p. 761–774, 2013.

MCARTHUR, G. A.; RIBAS, A. Targeting oncogenic drivers and the immune system in melanoma. **Journal of Clinical Oncology**, 2013.

MECHTLER, K.; KNOBLICH, J. A. The Par complex directs asymmetric cell division by phosphorylating the cytoskeletal protein Lgl. v. 422, n. March, 2003.

MERLINO, G. et al. The state of melanoma: challenges and opportunities. **Pigment Cell and Melanoma Research**, v. 29, n. 4, p. 404–416, 2016.

MEZZANOTTE, J. J. et al. RASSF6 exhibits promoter hypermethylation in metastatic melanoma and inhibits invasion in melanoma cells. **Epigenetics**, v. 9, n. 11, p. 1496–1503, 2014.

MILLER, R. P. et al. **Mechanisms of cisplatin nephrotoxicityToxins**, 2010.

OBA-SHINJO, S. M. et al. Melanocyte Transformation Associated with Substrate Adhesion Impediment. **Neoplasia**, v. 8, n. 3, p. 231–241, 2006.

OCEANDY, D. et al. The Cross-Talk Between the TNF- α and RASSF-Hippo Signalling Pathways. 2019.

OH, H. J. et al. Role of the Tumor Suppressor RASSF1A in Mst1-Mediated Apoptosis. v. 1, n. 5, p. 2562–2570, 2006.

OLIVE, J. F. et al. Accounting for tumor heterogeneity when using CRISPR-Cas9 for cancer progression and drug sensitivity studies. p. 1–23, 2018.

ŌMURA, S.; ASAMI, Y.; CRUMP, A. Staurosporine: new lease of life for parent compound of today's novel and highly successful anti-cancer drugs. **Journal of Antibiotics**, v. 71, n. 8, p. 688–701, 2018.

OSBORN, M. J. et al. Evaluation of TCR Gene Editing Achieved by TALENs, CRISPR/Cas9, and megaTAL Nucleases. **Molecular Therapy**, v. 24, n. 3, p. 570–581, 2016.

OVERMEYER, J. H.; MALTESE, W. A. Death pathways triggered by activated Ras in cancer cells. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, v. 16, n. 12, p. 1693–713, 2011.

PARK, J. et al. Tumor Suppressor Ras Association Domain Family 5 (RASSF5 / NORE1) Mediates Death Receptor Ligand-induced. v. 285, n. 45, p. 35029–35038, 2010.

PARKER, J. A.; MATTOS, C. The K-Ras, N-Ras, and H-ras isoforms: Unique conformational preferences and implications for targeting oncogenic mutants. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 8, n. 8, 2018.

PHYSIOLOGY, C. RASSF10 is Epigenetically Inactivated and Suppresses Cell Proliferation and Induces Cell Apoptosis by Activating the p53 Signalling Pathway in Papillary Thyroid Carcinoma Cancer. v. 7, p. 1229–1239, 2017.

RAJAGOPAL, C. et al. Secretory granule to the nucleus. Role of a multiple phosphorylated intrinsically unstructured domain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 38, p. 25723–25734, 2009.

RAVI, M. et al. 3D cell culture systems: Advantages and applications. **Journal of Cellular Physiology**, v. 230, n. 1, p. 16–26, 2015.

RECINO, A. et al. Human RASSF7 regulates the microtubule cytoskeleton and is required for spindle formation , Aurora B activation and chromosomal congression during mitosis. v. 213, p. 207–213, 2010.

RICHTER, A. M. et al. Promoter methylation status of Ras-association

domain family members in pheochromocytoma. **Frontiers in Endocrinology**, v. 6, n. FEB, p. 1–7, 2015.

RICHTER, A. M.; WALESCH, S. K.; DAMMANN, R. H. Aberrant Promoter Methylation of the Tumour Suppressor RASSF10 and Its Growth Inhibitory Function in Breast Cancer. p. 1–12, 2016.

RICHTER, A. M.; WALESCH, S. K.; WU, P. The tumor suppressor RASSF10 is upregulated upon contact inhibition and frequently epigenetically silenced in cancer. n. May, p. 1–11, 2012.

RIEDL, A. et al. Comparison of cancer cells in 2D vs 3D culture reveals differences in AKT–mTOR–S6K signaling and drug responses. **Journal of Cell Science**, v. 130, n. 1, p. 203–218, 2017.

RODRIGUEZ-VICIANA, P.; SABATIER, C.; MCCORMICK, F. Signaling Specificity by Ras Family GTPases Is Determined by the Full Spectrum of Effectors They Regulate. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 11, p. 4943–4954, 2004.

SÁNCHEZ-SANZ, G. et al. MST2-RASSF protein-protein interactions through SARAH domains. **Briefings in Bioinformatics**, v. 17, n. 4, p. 593–602, 2016.

SÁNCHEZ-TOMÉ, E. et al. Genome-wide linkage analysis and tumoral characterization reveal heterogeneity in familial colorectal cancer type X. **Journal of Gastroenterology**, v. 50, n. 6, p. 657–666, 2015.

SCHADENDORF, D. et al. Melanoma. **Nature Reviews Disease Primers**, n. April, p. 15003, 2015.

SCHADENDORF, D.; KOCHS, C.; LIVINGSTONE, E. Handbook of

Cutaneous Melanoma. p. 13–28, 2013.

SCHAGDARSURENGIN, U. et al. Frequent epigenetic inactivation of RASSF2 in thyroid cancer and functional consequences. **Molecular Cancer**, 2010.

SCHMIDT, M. L. et al. RASSF1A De fi ciency Enhances RAS-Driven Lung Tumorigenesis. v. 1, n. 10, p. 2614–2624, 2018.

SHALEM, O. et al. Genome-Scale CRISPR-Cas9 Knockout Screening in Human Cells. **Science**, v. 343, n. 6166, p. 84–87, 2014.

SHALOAM, D.; TCHOUNWOU, P. B. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. **European Journal of Pharmacology**, v. 740, p. 364–378, 2014.

SHERWOOD, V. et al. RASSF7 Is a Member of a New Family of RAS Association Domain – containing Proteins and Is Required for Completing Mitosis. v. 19, n. April, p. 1772–1782, 2008.

SHERWOOD, V. et al. The N-terminal RASSF family: a new group of Ras-association-domaincontaining proteins, with emerging links to cancer formation. **Biochemical Journal**, v. 425, n. 2, p. 303–311, 2010.

SHI, Z.; JIAO, S.; ZHOU, Z. REVIEW STRIPAK complexes in cell signaling and cancer. v. 35, n. 35, p. 4549–4557, 2016.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2017. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, n. 1, p. 7–30, 2017.

SIMANSHU, D. K. et al. HHS Public Access. v. 170, n. 1, p. 17–33, 2018.

SMEDT, E. DE et al. Loss of RASSF4 Expression in Multiple Myeloma Promotes RAS-Driven Malignant Progression. p. 1155–1169, 2018.

SONG, M. The CRISPR/Cas9 system: Their delivery, in vivo and ex vivo

applications and clinical development by startups. **Biotechnology Progress**, 2017.

SONG, Q. et al. Co-expression analysis of differentially expressed genes in hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma. **Molecular Medicine Reports**, v. 11, n. 1, p. 21–28, 2015.

TÍMÁR, J. et al. Genetic progression of malignant melanoma. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 35, n. 1, p. 93–107, 2016.

TOMMASI, S. et al. Tumor susceptibility of Rassf1a knockout mice. **Cancer Research**, 2005.

TSAO, H. et al. Early detection of melanoma: Reviewing the ABCDEs American Academy of Dermatology Ad Hoc Task Force for the ABCDEs of Melanoma. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 72, n. 4, p. 717–723, 2015.

UNDERHILL-DAY, N.; HILL, V.; LATIF, F. N-terminal RASSF family (RASSF7-RASSF10): A mini review. **Epigenetics**, v. 6, n. 3, p. 284–292, 2011.

VAVVAS, D. et al. Identification of Nore1 as a potential Ras effector. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 10, p. 5439–5442, 1998.

VOLODKO, N. et al. RASSF tumor suppressor gene family: Biological functions and regulation. **FEBS Letters**, v. 588, n. 16, p. 2671–2684, 2014.

VORA, N. Melanoma and BRAF. v. 600, p. 6–9, 2014.

VOS, M. D. et al. Ras uses the novel tumor suppressor RASSF1 as an effector to mediate apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 46, p. 35669–35672, 2000.

VOS, M. D. et al. RASSF2 is a novel K-Ras-specific effector and potential

tumor suppressor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 30, p. 28045–28051, 2003.

WANG, F. et al. RASSF10 is an epigenetically inactivated tumor suppressor and independent prognostic factor in hepatocellular carcinoma. v. 7, n. 4, 2015a.

WANG, J. et al. RASSF8 regulates progression of cutaneous melanoma through nuclear factor-κb. **Oncotarget**, v. 6, n. 30, p. 30165–77, 2015b.

WANG, S. et al. DISC1 regulates astrogenesis in the embryonic brain via modulation of RAS/MEK/ERK signaling through RASSF7. **Development**, v. 143, n. 15, p. 2732–2740, 2016.

WU, Q. et al. Differentiation-Associated MicroRNA Alterations in Mouse Heart-Derived Sca-1+CD31- and Sca-1+CD31+ Cells. **Stem Cells International**, v. 2016, 2016.

XUE, W. et al. The value of serum RASSF10 hypermethylation as a diagnostic and prognostic tool for gastric cancer. 2016.

YE, H. L. et al. Low RASSF6 expression in pancreatic ductal adenocarcinoma is associated with poor survival. **World Journal of Gastroenterology**, 2015.

YIN, H. et al. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 6, p. 551–553, 2014.

YOUNESIAN, S. et al. DNA hypermethylation of tumor suppressor genes RASSF6 and RASSF10 as independent prognostic factors in adult acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia Research**, 2017.

ZHANG, P. et al. ASPP1 / 2-PP1 complexes are required for chromosome segregation and kinetochore-microtubule attachments. v. 6, n. 39, [s.d.].

ZHENG, X. et al. The coiled-coil domain of oncogene RASSF 7 inhibits hippo signaling and promotes non-small cell lung cancer. v. 8, n. 45, p. 78734–78748, 2017.

ZHOU, R. et al. RASSF6 downregulation promotes the epithelial-mesenchymal transition and predicts poor prognosis in colorectal cancer. **Oncotarget**, 2017.

ZHOU, Y. et al. Ras and the Plasma Membrane: A Complicated Relationship. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 8, n. 10, p. 1–14, 2018.