MARIANA LAZARINI

ESTUDO FUNCIONAL DA PROTEÍNA ARHGAP21 EM CÉLULAS ENDOTELIAIS E DE CÂNCER DE PRÓSTATA



Campinas 2010

MARIANA LAZARINI

ESTUDO FUNCIONAL DA PROTEÍNA ARHGAP21 EM CÉLULAS ENDOTELIAIS E DE CÂNCER DE PRÓSTATA

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para Obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia Médica, Área de Concentração Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento.

Orientadora: Sara Teresinha Olalla Saad

Campinas

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8^a / 6044

L457e	Lazarini, Mariana Estudo funcional da proteína ARHGAP21 em células endoteliais e de câncer de próstata / Mariana Lazarini. Campinas, SP : [s.n.], 2010.
	Orientador: Sara Teresinha Olalla Saad Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
	1. Células endoteliais. 2. Próstata - cancer. I. Saad, Sara Teresinha Olala. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Funcional study of protein ARHGAP21 in endothelial cells and prostate cancer

Keywords: • Endothelial cell

• Prostate cancer

Titulação : Doutor em Fisiopatologia Médica Área de concentração: Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento

Banca examinadora:

Γ

Profa. Dra. Sara Teresinha Olalla Saad Prof. Dr. José Andrés Yunes Profa. Dra. Iscia Teresinha Lopes-Cendes Profa. Dra. Daniela Sanchez Bassères

Data da defesa: 29-07-2010

Banca examinadora da tese de Doutorado Mariana Lazarini

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Sara Teresinha Olalla Saad

Membros:

- 1. Prof(a). Dr(a). Sara Teresinha Olalla Saad
- 2. Prof(a). Dr(a). Iscia Teresinha Lopes Cendes
- 3. Prof(a). Dr(a). José Andrés Yunes
- 4. Prof(a). Dr(a). Daniela Sanchez Basseres
- 5. Prof(a). Dr(a). Mari Cleide Sogayar

Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

mul

Data: 29/07/2010

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Jair e Nanci, meus maiores exemplos pessoal e profissional, por todo o incentivo e apoio em todas as etapas de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Jair e Nanci, e a minha irmã Gabriela e meu sobrinho Eduardo, por estarem sempre perto, apesar de longe, me dando suporte nas minhas decisões.

À minha orientadora Profa. Dra. Sara Saad, que é certamente a melhor orientadora que eu poderia ter. Agradeço por toda a confiança depositada em mim desde o principio, seu incentivo, pela oportunidade de trabalharmos juntas e por todo o aprendizado tanto pessoal quanto profissional que eu obtive ao longo destes anos.

À minha amiga Fabíola Traina, um dos meus exemplos de vida. Agradeço pela sua ajuda e paciência em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis, que se tornaram menos difíceis por você estar por perto. Obrigada pela sua orientação, companheirismo, preocupação, carinho e amizade.

À querida Professora Dra. Mary Luci Queiroz, por ter me acolhido em seu laboratório e por todo o seu incentivo e sábios conselhos.

À Professora Dra. Anne Ridley por ter me recebido em seu laboratório e pelas muitas discussões científicas, importantes para execução deste trabalho e para minha formação.

À Professora Dra. Irene Lorand-Metze por ter disponibilizado o uso do citômetro de fluxo em seu laboratório e em especial a funcionária Fernanda, por já ter passado horas comigo na frente do equipamento.

Ao Prof. Dr. Aníbal E. Vercesi, pela disponibilidade de seu laboratório. À Dra Giovanna R. Degasperi pelo auxílio nos experimentos.

Aos Professores Dr. Sergio Verjovski Almeida e Dr. Carlos Alberto Moreira Filho, pelas oportunidades de colaboração.

À amiga confidente e parceira de doutorado, Patrícia Rodrigues, pelos muitos momentos de alegrias, angústias, medos, incertezas que partilhamos.

Ao Pedro por todo carinho, atenção, companhia e ajuda nestes últimos meses.

À Sheila Winnischofer pela ajuda e aprendizado no início do doutorado. Certamente a minha maneira de trabalhar hoje tem muito de sua influência.

Ao amigo João, pela alegria, discussões científicas e companhia durante o dia todo e na bancada até as horas mais tardes.

À minha segunda família: André, Yoko, Leno, Jacqueline e Juliana, por terem tornado minha vida mais feliz e meu trabalho mais fácil. Agradeço todo o suporte e preocupação.

À amiga Adriana Duarte pela sempre ajuda em diversos momentos e por muitas vezes me fazer companhia até mais tarde.

À querida amiga Letícia pela amizade e conselhos científicos.

À amiga Patrícia Favaro, que tem alegrado meus dias neste ultimo ano. Agradeço sua amizade, sua disponibilidade e seus ensinamentos.

À Karin Barcellos, uma pessoa maravilhosa e apoio constante para tudo. Obrigada por estar sempre perto quando eu precisei, mesmo em continentes diferentes por quase um ano.

À Patrícia Juliani por estar sempre disposta a resolver os problemas da forma mais rápida possível.

Aos alunos e funcionários do Laboratório de Biologia Molecular e Celular que acompanharam meu trabalho desde o início: as amigas Luciene, Mariana Pupa, Carol, Maria Teresa, Tereza Salles, Simone e Lena. Obrigada pela amizade e socorro em inúmeros momentos.

À todos do Laboratório de Biologia Molecular e Celular do Hemocentro por tornarem o ambiente mais alegre, em especial a Victor, Tiba, Juliana, Laure, Rogério, Daniela e Giselle.

Ao Tiba pela disponibilidade e ajuda com a tese.

A todos os alunos e funcionários atuais e que passaram pelo laboratório CFU durante este período, meus vizinhos: Cris, Aline, Samara, Gustavo, Rafael, Simone, Vanessa, Andrana, Miriam e Juliana.

À Sueli Oliveira por estar sempre ao lado e pronta para me ajudar em qualquer momento e situação.

À amiga Michelle Rocha por sua amizade, companhia, confiança e ajuda em inúmeros momentos.

Aos doutorandos Yuri Moreira e Mariana Baratti e a Dra. Patrícia Severino pela ajuda na execução e análise dos ensaios de Microarranjos de DNA.

xi

Aos meus amigos e colegas de graduação do Instituto de Biologia. Agradeço pela amizade e por aliviarem meu stress em diversas situações, em especial a Bruna, Stephanie, Alessandra, Júlia, Izabel, Mari Stanton, Billy e Egito. Agradeço também a compreensão pela minha ausência em vários momentos.

A minha amiga Paula Carteado, que veio comigo de Salvador em 2001. Obrigada pela sua amizade, por acreditar em mim, e me acompanhar em todos os momentos.

A toda a equipe do Laboratório de Biologia Celular da King's College London: Ritu, Ferran, Virginia, Bárbara, Undine, Parag, Phillipe, Francisco, Sandra, Sarah, Audrey, Nico e Rob. Agradeço pela ajuda dentro e fora do laboratório, pelos momentos de diversão e por terem tornado os seis meses de estágio inesquecíveis.

Às companheiras brasileiras e baianas moradoras da casa 13 em Londres: Tássia, Paula e Elis. Agradeço a amizade construída, o apoio, os momentos em que passeamos e as confidencias que dividimos. Obrigada por aliviarem minha saudade e tornarem meu estágio no exterior mais especial.

A toda minha família, em especial meus tios e avós por todo o amor e por torcerem e acreditarem em mim.

À Arlete e ao Leonardo pelo apóio didático durante a realização deste trabalho.

Às agências financiadoras, FAPESP, CNPq e CAPES.

Agradeço a Deus pela minha vida, pela minha saúde e de meus amigos e parentes, por todas as pessoas que já cruzaram meu caminho, por me dar sempre força e por mais esta conquista.

"Feliz é aquele que transfere o que sabe e

aprende o que ensina "

Cora Coralina

RESUMO

Importante passo para a compreensão dos processos fisiopatológicos das neoplasias é a identificação de genes diferencialmente expressos e das funções biológicas de cada proteína codificada por estes genes. *Rho GTPase activating protein 21* (ARHGAP21) é uma proteína pertencente à família RhoGAP, que interage com ARF-GTPases e com alfacatenina, modulando a dinâmica da actina associada às membranas do Golgi e à integridade das junções aderentes. O objetivo geral do presente estudo foi investigar as funções da proteína ARHGAP21 em células endoteliais e de adenocarcinoma de próstata com relação à viabilidade celular, ciclo celular, migração, adesão e expressão gênica.

Neste trabalho foi demonstrado que ARHGAP21 possui atividade RhoGAP para RhoA e RhoC. Em células HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells), foi observada uma localização nuclear e citoplasmática de ARHGAP21 e sua depleção induziu alterações no ciclo celular. Além disso, ensaios de microarranjos de DNA em HUVECs demonstraram modulação de genes como PAI-1, BNIP3, staniocalcina 1 e podocalyxin. Em linhagens celulares de adenocarcinoma de próstata (LNCaP e PC-3), também foi observada uma localização nuclear e citoplasmática de ARHGAP21. A diminuição da expressão desta proteína em células PC-3 resultou em redução da viabilidade e da migração celular em fibronectina. Com relação à viabilidade celular, a inibição de ARHGAP21 tem efeito adicional ao agente quimioterápico cisplatina. Em células LNCaP, por sua vez, foi observada uma menor adesão em matrigel e fibronectina das células submetidas à inibição da expressão de ARHGAP21, em comparação às células controle. Experimentos de microarranjos de DNA e RT-PCR quantitativo em tempo real em células de adenocarcinoma de próstata submetidas à inibição de ARHGAP21 demonstraram expressão alterada dos genes TGF-beta induced e dos genes BNIP3, staniocalcina 1 e podocalyxin, que também foram modulados nas células HUVECs com inibição da expressão de ARHGAP21.

Em conclusão, o presente estudo identificou ARHGAP21 como uma proteína com importantes funções em células endoteliais e de adenocarcinoma de próstata, através da regulação da viabilidade, adesão e migração celular. Os achados aqui descritos sugerem que ARHGAP21 pode ser uma molécula alvo para a terapia de neoplasias, provavelmente através da sua função como reguladora da atividade de RhoA e RhoC.

ABSTRACT

One step in the path towards building a comprehensive molecular portrait of human cancer is the definition of differentially expressed genes and the function of their coding proteins. Rho GTPase activating protein 21 (ARHGAP21) is a RhoGAP protein, which interacts with ARF-GTPases and alpha-catenin, controlling actin dynamics on Golgi membranes and the integrity of adherens junctions, respectively. The aim of the present study was to investigate ARHGAP21 functions on endothelial and prostate cancer cells regarding to cell viability, cell cycle, migration, adhesion and gene expression.

This study demonstrated that ARHGAP21 has RhoGAP activity for RhoA and RhoC. ARHGAP21 localized in the nucleus and cytoplasm of HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) and its depletion alteres the cell cycle phases. Furthermore, microarrays assays in HUVECs ARHGAP21 knockdown demonstrated modulation of genes such as *PAI-1, BNIP3, stanniocalcin* 1 and *podocalyxin*. In the prostate adenocarcinoma cell lines (LNCaP and PC-3), ARHGAP21 is also located in the nucleus and cytoplasm. Depletion of this protein in PC-3 cells resulted in decrease of cell viability and migration in fibronectin. Regarding to cell viability, inhibition of ARHGAP21 has an additional effect on cisplatin chemotherapeutic agent. In LNCaP cells, a lower adhesion was observed in matrigel and fibronectin of cells subjected to inhibition of ARHGAP21 expression compared to control cells. DNA microarray and quantitative RT-PCR experiments on prostate adenocarcinoma cells ARHGAP21 knockdown showed modulation of *TGF-beta induced* gene expression. The expression of *BNIP3, stanniocalcin* 1 and *podocalyxin* was also altered in HUVECs cells ARHGAP21 knockdown.

In conclusion, this study identified ARHGAP21 as a protein with important functions in endothelial cells and prostate adenocarcinoma, by regulating cell viability, adhesion and migration. The findings described here suggest that ARHGAP21 may be a molecule target for cancer therapy, probably due to its GAP activity for RhoA and RhoC.

LISTA DE ABREVIAÇÕES

ARHGAP21 – Rho GTPase Activating Protein 21

BNIP3 – BCL2/adenovirus E1B interacting protein 3

BSA – Albumina de Soro Bovino

cDNA - complementary DNA

DNA – Desoxiribonucleic Acid

DO – Densidade Óptica

EST – Expression Sequence Tags

E. coli – Escherichia coli

FAK – Focal Adhesion kinase

FITC – Fluorescein Isothiocyanate

 ${\rm GST-Glutathione}\ S\mbox{-transferase}$

HUVECs – Human Umbilical Vein Endothelial Cells

NCBI - National Center for Biotechnology Information

ORESTES – Open Reading frame ESTs

PDZ-PSD-95/Discs-large/ZO-1

PE – *Phycoeritrine*

PH – Pleckstrin Homology

PODXL – Podocalyxin-like

RIN – RNA Integrity Number

RhoA – Ras Homolog gene family, member A

RhoB – Ras Homolog gene family, member B

RhoC – Ras Homolog gene family, member C

Rho GAP - Rho GTPase activating protein

RNA – Ribonucleic Acid

RNAi – RNA interference

RT-PCR – Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction

SAM – Significance Analysis of Microarray

shRNA – short-hairpin RNA

SFB – Soro Fetal Bovino

STC1 – Staniocalcina 1

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Anticorpos utilizados para Western Blot	. 68
Tabela 2- Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para inibição da expressão de ARHGAP21	. 72
Tabela 3- Sequências e concentrações de iniciadores utilizados para amplificação dos genes estudados por	
RT-PCR em tempo real	. 81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Regulação da ativação/inativação de Rho GTPases. Rho GTPases ciclam entre um estado inativo (ligadas a GDP) e um estado ativo (ligadas a GTP). Este ciclo é regulado por três famílias de proteínas: RhoGEFs, RhoGAPs e RhoGDIs. As RhoGEFs fazem a ativação das Rho GTPases, enquanto as RhoGAPs sua inativação. RhoGDIs, por sua vez, podem antagonizar as ações tanto de RhoGEFs quanto de RhoGAPs. As Rho GTPases ativas interagem com proteínas efetoras, como ROCK, mDIa, Wasp e PAK, para mediar respostas celulares
Figura 2.	Alterações citoesqueléticas induzidas por Rho GTPases. (A) Fibras de estresse são induzidas por RhoA, (B) Lamelipódia é induzida por Rac1 e (C) Filopódia por Cdc42. Imagem cedida pelo grupo da profa. Anne Ridley
Figura 3.	Alinhamento das sequências de aminoácidos de RhoA, RhoB e RhoC. Resíduos de RhoB e RhoC que diferem de RhoA estão destacados em vermelho. Resíduos que podem ser alterados para modificar a função GTPase estão destacados em rosa. RhoB possui três aminoácidos adicinoais às sequencias protéicas de RhoA e RhoC. A cisteína 4 a partir da porção terminal é prenilada (destacada em azul)
Figura 4.	Árvore filogenética da família RhoGAP de fungos a humanos. Os domínios RhoGAP das 73 GAPs caracterizadas foram alinhados com o programa ClustalW e a árvore filogenética foi gerada com o programa Phylodraw. Em vermelho, <i>Homo sapiens</i> ; em azul <i>Mus musculus</i> ; em verde <i>Rattus norvegicus</i> , em rosa <i>S. Cerevisiae</i> , em amarelo <i>D. mlanogaster</i> , em turquesa, <i>C. elegans</i> ; em laranja, <i>D. discoideum</i> ; em roxo, <i>Gallus gallus</i> ; em cinza, <i>Xenopus laevis</i> . Adaptado de Tcherkezian e Lamarche-Vame, 2007
Figura 5.	Representação esquemática da localização de ARHGAP21 no cromossomo 10, do gene ARHGAP21 com éxons e íntrons e de sua estrutura protéica primária. (A) O gene que codifica ARHGAP21 está presente no braço curto do cromossomo 10. (B) Este gene possui 7185 pares de bases e é constituído por 26 éxons. (C) A proteína codificada apresenta 1958 aminoácidos e um tamanho predito de 217 kDa com três domínios: PDZ, PH e RhoGAP 57
Figura 6.	Representação esquemática dos vetores pCVM6-Neo e pcDNA3 utilizados para transfecções celulares
Figura 7.	Gel de acrilamida mostrando a pureza das proteínas utilizadas nos ensaios de Pull Down. Os domínios de ligação das proteínas efetoras Rhotekin (RBD-GST), Wasp (WBD-GST) e PAK (PAK1-GST) foram submetidas à eletroforese em gel de acrilamida 12%, que foi posteriormente corado com azul de Coomassie. As curvas de BSA ultilizadas para a quantificação protéica estão indicadas na figura. Note as bandas nos tamanhos esperados das três proteínas produzidas: RBD- GST, WBD-GST e PAK1-GST. A ausência de muitas bandas inespecíficas indica a pureza das proteínas obtidas
Figura 8.	Processo de síntese e amplificação do cRNA marcado com cianina-3 (Cy3) ou cianina-5 (Cy5). Um iniciador contendo dT e um promotor T7 polimerase foi anelado na porção polyA+ do RNA proveniente de células HUVECs controle ou siRNA. A síntese de cDNA foi realizada com a enzima transcriptase reversa e o cRNA foi sintetizado a partir da dupla fita de cDNA

- Figura 9. Processo de síntese e amplificação do cRNA biotinilado. A enzima transcriptase reversa e iniciadores randômicos foram utilizados para síntese de cDNA a partir de RNAs de células LNCaP controle e siRNA. O cRNA foi sintetizado a partir do cDNA usando a enzima T7 RNA polimerase. Um segundo ciclo de síntese de DNA foi realizado e hexâmeros randômicos foram utilizados como iniciadores para a transcrição reversa do cRNA obtido no primeiro ciclo. O DNA foi então submetido à fragmentação e à marcação com o reagente DNA labeling

- Figura 11. Titulação dos lentivírus em células HT1080, coradas com violeta cristal. A: diluição 1:2, B: diluição 1:50, C: diluição1:100, D: diluição 1:1000, E diluição 1:10000 e F: ausência de lentivírus.
- **Figura 12.** Animal submetido à inoculação de células PC-3. Camundongos BALB/c nude que receberam inoculação de células PC-3 controle ou shRNA apresentaram desenvolvimento tumoral e foram sacrificados no 28° dia após a inoculação das células, quando o tumor tornou-se incômodo para o animal.

- Figura 17. ARHGAP21 não altera as atividades de Rac1 e Cdc42 em células HEK 293T. Ensaios de GST Pull Down com os domínios de ligação a Rho GTPases das proteínas efetoras PAK1 (A) e Wasp (B) foram realizados para avaliar a atividade de Rac1 e Cdc42, respectivamente. Observe que não houve diferença nas atividades de Rac1 e Cdc42 nas células HEK 293T com super-expressão de ARHGAP21 comparadas às celulas HEK 293T transfectadas com vetor vazio. Extratos protéicos de células HEK 293T com super-expressão das formas constitutivamente ativas de Rac1-GFP e Cdc42-GFP foram utilizados para comprovar a eficiência dos ensaios...96

- Figura 22. Reprodutibilidade de dados de microarranjos de DNA (41.000 transcritos). Os experimentos de microarranjos de DNA em células HUVECs foram realizados em duplicata com RNAs provenientes de duas transfecções independentes. Em A e C estão representadas as lâminas hibridizadas com RNA das células HUVECs controle, enquanto em B e D estão representadas as lâminas hibridizadas com RNA das células siRNA ARHGAP21. No eixo x estão os valores (log) das intensidades de expressão gênica e em y (log) dos dados relativos à sua réplica técnica. Pearson > 0.95.

- Figura 25. Alteração da expressão de PAI-1, PODXL, FRZB, FGF18, SMURF2, BNIP3, STC1 e HMGA2 em células HUVECs submetidas à inibição da expressão de ARHGAP21, em comparação às células controle. Barras azul-escuras representam a alteração encontrada nos microarranjos de DNA e as barras brancas representam a alteração encontrada por RT-PCR em tempo real. Note que o aumento de expressão dos genes PAI-1, PODXL, FRZB, FGF18, SMURF2, BNIP3, STC1 e HMGA2 nas células HUVECs com inibição de expressão de

- **Figura 31.** Reprodutibilidade de dados de microarranjos de DNA (28.969 transcritos). Os experimentos de microarranjos de DNA em células LNCaPs foram realizados em duplicata. No eixo x estão os valores (log) das intensidades de expressão gênica e em y (log) dos dados relativos à sua réplica técnica. Pearson > 0,95.

- Figura 33. Alteração da expressão de PODXL, TGFBI, BNIP3 e STC1 em células LNCaP submetidas à inibição da expressão de ARHGAP21, em relação às células controle. Barras azul-escuras representam a alteração encontrada nos microarranjos de DNA e as barras em branco representam a alteração encontrada por RT-PCR em tempo real. Note que o aumento de expressão de PODXL, TGFBI, BNIP3 e STC1, observado nos ensaios de microarranjo foi confirmado por RT-PCR em tempo real.
- Figura 34. Expressão gênica de PODXL, TGFBI, BNIP3 e STC1 em células PC-3 com inibição de expressão de ARHGAP21. A expressão de cada gene em células PC-3 submetidas à inibição de ARHGAP21 (barras vermelhas) foi normalizada pela sua expressão nas células controle, como 1 (barras azuis). Note o aumento de expressão dos genes PODXL (5,6 vezes) e BNIP3 (1,45 vezes) nas células PC-3 submetidas à inibição da expressão de ARHGAP21 (siRNA

- Figura 41. A inibição de ARHGAP21 induz redução na distância percorrida de células PC-3 em fibronectina. Ensaios de migração foram realizados em células PC-3 e LNCaP controle e com inibição da expressão de ARHGAP21 (siRNA ARHGAP21) em plástico (em azul), matrigel (em vermelho) e fibronectina (em verde). As distâncias acumulada e euclidiana das células PC-3 com inibição de ARHGAP21 em fibronectina foram menores em relação ao controle. A média da distância acumulada foi 436,968 ± 177,28 e 276,31 ± 181,68 e da distância euclidiana foi 91,065 ± 56,152 e 56,823 ± 35,209 para as células controle e siRNA ARHGAP21, respectivamente (A e B). Não houve diferença nas distâncias percorridas pelas células LNCaP nos três substratos testados (C e D).

SUMÁRIO

RESUMO	xvii
ABSTRACT	xix
LISTA DE ABREVIAÇÕES	xxi
LISTA DE TABELAS	xxiii
LISTA DE FIGURAS	xxv
SUMÁRIO	xxxvii
INTRODUÇÃO	
Proteínas Rho GTPases	
A Família de proteínas RhoGAP	
A Proteína RhoGAP ARHGAP21	
OBJETIVOS	
Objetivo geral	
Objetivos específicos	
MATERIAIS E MÉTODOS	
Linhagens Celulares	
Vetores utilizados	
Métodos	
Transfecções em células HEK 293T	
Western Blot	
Produção de proteínas recombinantes	
Ensaios de Pull Down para avaliação da atividade de RhoGTPases	
Imunofluorescência e Microscopia confocal	
Transfecção com RNA de interferência	
Extração do RNA total	
Tratamento do RNA total com DNAse I	
Transcrição em cDNA	
RT-PCR em tempo real	
Verificação da integridade do RNA (bioanalyzer)	74
Microarranjos de DNA em células HUVECs	74
Análise de expressão diferencial por SAM	
Microarranjos de DNA em células LNCaP	77
Análise de de expressão diferencial pelo método Htself	
Desenho de oligos iniciadores	
Padronização da concentração dos iniciadores e curvas de eficiência	
Avaliação do ciclo celular	

Ensaio de viabilidade celular	. 84
Ensaio de adesão celular	. 84
Ensaio de migração celular randômica	. 85
Super-expressão de ARHGAP21 em células PC-3	. 85
Transdução celular através de lentivírus	. 85
Ensaio para indução tumoral in vivo	. 87
Análise Estatística	. 88
RESULTADOS	. 89
Experimentos com células HEK 293T	. 91
 Avaliação da atividade RhoGAP de ARHGAP21 em células HEK 293T através de ensaios de GS Pull Down 	ST- . 91
1.1. Super-expressão de ARHGAP21 em células HEK 293T	. 91
1.2. ARHGAP21 possui atividade RhoGAP para RhoA e RhoC, mas não para RhoB em célu HEK 293T	ılas . 92
1.3. ARHGAP21 não possui atividade RhoGAP para Rac1 e Cdc42 em células HEK 293T	. 95
1.4. Alteração fenotípica em células HEK 293T com super-expressão de ARHGAP21	. 96
2. ARHGAP21 localiza-se no núcleo e citoplasma de células HUVECs	. 97
3. Inibição da expressão de ARHGAP21 em células HUVECs	. 98
4. Expressão gênica global em células HUVECs com inibição da expressão de ARHGAP21	. 99
4.1. Análise da qualidade de RNA	. 99
4.2. Análise da reprodutibilidade das lâminas 1	100
4.3. Agrupamento funcional dos genes diferencialmente expressos em células HUVECs submetio à inibição de expressão de ARHGAP211	das 101
4.4. HEAT map dos resultados obtidos nos microarranjos de DNA com células HUVECs 1	103
 Validação dos genes encontrados nos experimentos de microarranjos de DNA com célu HUVECs por RT-PCR em tempo real 	ılas 105
5.1. Escolha dos genes1	105
5.2. A inibição de ARHGAP21 induz o aumento da expressão de PAI-1, PODXL, FRZ FGF18, SMURF2, BNIP3, STC1 e HMGA2, em células HUVECs	ZB, 105
6. A inibição de ARHGAP21 induz alteração no ciclo celular de células HUVECs 1	106
7. ARHGAP21 é expressa em linhagens celulares de adenocarcinoma de próstata 1	107
8. ARHGAP21 localiza-se no núcleo e citoplasma de células LNCaP e PC3 1	108
9. Inibição da expressão de ARHGAP21 em células LNCaP e PC-3 1	109
10. Expressão gênica global em células LNCaP com inibição da expressão de ARHGAP21 1	109
10.1. Análise da qualidade do RNA 1	109
10.2. Análise da reprodutibilidade das lâminas	110
10.3. Agrupamento funcional dos genes diferencialmente expressos em células LNCaP submetio à inibição da expressão de ARHGAP21	das 111

 Validação dos genes encontrados nos experimentos de microarranjos de DNA com células LNCaP por RT-PCR em tempo real
12. A inibição de ARHGAP21 induz o aumento da expressão de PODXL e BNIP3 em células PC-3
 Análise da expressão de PODXL, TGFBI, BNIP3 e STC1 em células LNCaP super-expressando RhoA e RhoC
14. A inibição de ARHGAP21 induz redução na viabilidade de células PC3 117
15. A inibição de ARHGAP21 induz redução na adesão de células LNCaP
16. A inibição de ARHGAP21 altera a migração de células PC-3
16.1. A inibição de ARHGAP21 induz a diminuição da velocidade de migração das células PC-3 em fibronectina
16.2.A inibição de ARHGAP21 induz a diminuição da distância percorrida pelas células PC-3 em fibronectina
16.3. A inibição de ARHGAP21 induz alteração na direcionalidade de células PC-3 em plástico 123
17. A super-expressão de ARHGAP21 induz alteração na direcionalidade de células PC-3 em plástico
 Crescimento tumoral em camundongos BALB/c nude inoculados com células PC-3 controle e shRNA
DISCUSSÃO
CONCLUSÃO
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS
ANEXOS
Anexo I
APÊNDICES

INTRODUÇÃO

Neoplasias resultam de mutações genéticas ou alterações epigenéticas no genoma das células somáticas do indivíduo (Martinez-Climent et al. 2006), as quais exercem seus efeitos através de mudanças nas funções protéicas celulares. Importante passo para a compreensão dos processos fisiopatológicos das neoplasias é a identificação de genes diferencialmente expressos e das funções biológicas de cada proteína codificada por estes genes. A análise de *Expressed Sequence Tags* (ESTs) permite que genes expressos em diferentes tecidos humanos sejam identificados de forma alternativa, fornece informações adicionais sobre os transcritos e isoformas variantes, e representa uma nova ferramenta para o estudo de genes ainda não caracterizados (Brentani et al. 2003).

O Projeto Genoma Humano do Câncer, desenvolvido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e Instituto Ludwig, realizou o seqüenciamento de ESTs de tecidos humanos neoplásicos através de uma estratégia denominada *Open Reading Frame* ESTs (ORESTES), que gerava seqüências localizadas na região central dos transcritos (Dias Neto et al. 2000). O objetivo deste Projeto Genoma foi identificar novos genes de forma a suscitar novas descobertas e hipóteses que poderiam acelerar o conhecimento necessário para melhorar o diagnóstico, tratamento e entendimento do câncer em humanos. A era pós-genoma busca as funções biológicas de cada proteína codificada pelos novos genes descritos e pretende melhorar o entendimento dos processos celulares que ocorrem em diferentes organismos.

Com o objetivo de estudar novas proteínas do citoesqueleto relacionadas às neoplasias, nosso laboratório selecionou genes que tinham semelhança à proteína bespectrina do citoesqueleto dos eritrócitos. Um dos genes selecionados foi inicialmente denominado *ARHGAP10* e mais tarde *ARHGAP21*, de acordo com a nomenclatura HUGO. A proteína codificada por *ARHGAP21* assemelha-se à espectrina por possuir um domínio denominado *Pleckstrin Homology* (PH) em sua seqüência. Além do domínio PH, ARHGAP21 possui mais dois domínios, um domínio PDZ (**PSD-95/D**iscs-large/**Z**O-1) e um domínio RhoGAP (*Rho GTPase activating protein*), este último responsável pela regulação das proteínas Rho GTPases. Projetos anteriores desenvolvidos em nosso laboratório estudaram a função de ARHGAP21 em cardiomiócitos e sistema nervoso. No presente estudo, investigamos a função de ARHGAP21 em células endoteliais e de adenocarcinoma de próstata.

Proteínas Rho GTPases

GTPases são proteínas que que ciclam entre dois estados conformacionais: um estado ativo (ligado a GTP) e um estado inativo, ligado a GDP. Quando estão no estado ativo, as GTPases reconhecem proteínas-alvo efetoras na membranas celulares e geram uma resposta biológica até retornarem ao estado inativo. Células de mamíferos contém centenas de GTPases. A super-família Ras de GTPases é particularmente importante pois seus membros são reguladores de muitos aspectos do comportamento celular. Esta super-família é composta por aproximadamente 60 proteínas pequenas, monoméricas, que são divididas em cinco grupos principais: Ras, Rho, Rab, Arf e Ran.

Rho GTPases constituem uma família distinta dentro da super-família Ras e são encontradas em todas as células eucarióticas. Assim como as outras GTPases, as proteínas Rho GTPases ciclam entre um estado ativo (ligado a GTP) e um estado inativo (ligado a GDP). Este ciclo é regulado por uma atividade GTPase intrínseca e também por três famílias de proteínas: as proteínas RhoGEFs, RhoGAPs e Rho GDIs. Proteínas RhoGEFs (guanine nucleotide exchange factors) levam à ativação das Rho GTPases, através da catalisação da troca de GDP para GTP (Schmidt e Hall, 2002). As proteínas RhoGAPs (GTPase activating proteins), por sua vez, estimulam a atividade GTPase intrínseca para inativação das Rho GTPases (Bernards, 2003). A terceira família é a das proteínas RhoGDIs (guanine nucleotide dissociation inhibitors), composta apenas por 3 membros ainda pouco estudados (GD1, GDI2 e GDI3), cujas funções parecem ser antagonizar as ações tanto de GEFs quanto de GAPs. Proteínas RhoGDIs podem bloquear a dissociação das Rho GTPases ao GDP, mantendo-as no estado inativo (Fukumoto et al., 1990) ou inibir a hidrólise de GTP intrínseca e catalisada por GAPs (Hart et al., 1992), sendo capazes de agir nos dois pontos do ciclo de ativação/inativação das Rho GTPases. Uma terceira habilidade das Rho GDIs é estimular a liberação das Rho GTPases das membranas celulares (Nomanbhoy, 1999), impedindo sua interação com efetores. O ciclo de ativação/inativação das Rho GTPases está representado na Figura 1.

Vinte e dois genes codificando Rho GTPases foram descritos: três isoformas de Rho (RhoA, RhoB e RhoC), três isoformas de Rac (Rac1, Rac2 e Rac3), Cdc42, RhoD, Rnd1, Rnd2, Rnd3 (ou RhoE), RhoG, TC10, TCL, RhoH, Chp, Wrch, Rif, RhoBTBT1, RhoBTBT2, Miro-1 e Miro-2 (Aspentrom et al., 2004). Os três membros mais estudados

são RhoA, Rac1 e Cdc42, pois foram os primeiros a serem reportados com importantes funções celulares relacionadas ao citoesqueleto de actina. A expressão da forma constitutivamente ativa de RhoA induz a organização dos filamentos de actina e miosina contráteis (formação de fibras de estresse) (Ridley et al, 1992). Rac1 induz a formação de protrusões de actina na superfície celular (lamelipódia) (Ridley et al, 1992) e Cdc42 induz a formação de extensões membranares também ricas em actina (filopódia) (Figura 2) (Kozma et al. 1995). Estes efeitos altamente específicos no citoesqueleto de actina apontam para uma série de vias de transdução de sinais controladas por cada Rho GTPase, levando à formação e organização dos filamentos de actina.



Figura 1. Regulação da ativação/inativação de Rho GTPases. Rho GTPases ciclam entre um estado inativo (ligadas a GDP) e um estado ativo (ligadas a GTP). Este ciclo é regulado por três famílias de proteínas: RhoGEFs, RhoGAPs e RhoGDIs. As RhoGEFs fazem a ativação das Rho GTPases, enquanto as RhoGAPs sua inativação. RhoGDIs, por sua vez, podem antagonizar as ações tanto de RhoGEFs quanto de RhoGAPs. As Rho GTPases ativas interagem com proteínas efetoras, como ROCK, mDIa, Wasp e PAK, para mediar respostas celulares.



Figura 2. Alterações citoesqueléticas induzidas por Rho GTPases. (A) Fibras de estresse são induzidas por RhoA, (B) Lamelipódia é induzida por Rac1 e (C) Filopódia por Cdc42. Imagem cedida pelo grupo da profa. Anne Ridley.

Além do ciclo de ligação a GDP/GTP, a atividade das Rho GTPases é dependente de modificações pós-translacionais chamadas prenilação, que é a adição de lipídios isoprenóides na porção C-terminal das proteínas. As reações de prenilação podem ser de dois tipos: farnesilação ou geranil-geranilação. Todas as Rho GTPases sofrem geranilgeranilação, exceto RhoD, que sofre farnesilação e RhoB, que pode ser modificada por ambos os processos (Adamson et al., 1992, Cox e Der, 1992). Os grupos farnesil ou geranil-geranil são covalentemente ligados à cisteína C-terminal de proteínas terminadas em CAAX, onde "C" é uma cisteína, "A" é um aminoácido alifático e "X" pode ser qualquer aminoácido. Estas modificações permitem a interação entre proteínas e também a associação das Rho GTPases com as membranas plasmática e intracelulares, sendo, portanto, importantes para a sua localização correta (Marshall, 1993 e Seabra, 1998). A associação de Rho GTPases com proteínas GEFs, GAPs e GDIs também dependem dos processos de prenilação (Mizuno et al., 1991, Molnár et al., 2001 e Hoffman et al. 2000). Foi demonstrado que algumas RhoGAPs aceleram a hidrólise de GTP apenas quando RhoA e Rac1 estão preniladas, sendo inativas nas formas não preniladas destas proteínas (Molnár et al., 2001). A prenilação de Rho GTPases é essencial para o crescimento celular e organização do citoesqueleto (Allal et al., 2000). Enquanto as modificações póstranslacionais ocorrem na porção C-terminal, a porção N-terminal das Rho GTPases

contém a maioria dos aminoácidos envolvidos na ligação com GTP e hidrólise, juntamente com as regiões 1 e 2 de troca de conformação entre os estados ativo e inativo (Bishop e Hall, 2000).

As Rho GTPases regulam muitas outras vias de transdução de sinais além das vias relacionadas ao citoesqueleto de actina, incluindo a via dos fatores de transcrição NFκB (fator nuclear κB) e SRF (Fator de Resposta ao Soro) (Perona et al., 1997; Hill et al., 1995) e da quinase C-Jun N-terminal (JNK) (Coso et al., 1995). Portanto, elas participam da polaridade celular, transcrição gênica, progressão do ciclo celular, dinâmica de microtúbulos, adesão célula-célula, transporte de vesículas e uma variedade de atividades enzimáticas (Van Aelst e D'Souza-Schorey 1997; Daub et al. 2001; Etienne-Manneville e Hall 2001; Braga, 1999). Esta enorme quantidade de funções está relacionada ao grande número de proteínas efetoras já identificadas (Etienne-Manneville e Hall, 2002). As proteínas efetoras interagem especificamente com as Rho-GTPases na sua forma ativa, ligadas a GTP, levando à ativação de diversas vias de sinalização que culminam na resposta celular. Mais de trinta potenciais efetores para RhoA, Rac e Cdc42 já foram identificados.

Os dois principais efetores de RhoA são ROCK (*Rho kinase* ou *ROK*) (Matsui et al., 1996) e mDia (*mammalian homolog of Drosophila diaphanous*) (Watanabe et al., 1997). A proteína mDia pertence à família das forminas e tem a função de produzir longos e finos filamentos de actina, através da polimerização e nucleação da actina (Goode et al., 2007). ROCK, por sua vez, é uma quinase capaz de fosforilar uma variedade de substratos em serina e treonina (Riento et al., 2006). Os mais conhecidos efetores tanto de Rac1 e Cdc42 são as proteínas da família de serina/treonina quinases PAKs (*p21-activated kinases*), que são capazes de se ligar às formas ativas tanto de Cdc42 quanto de Rac1.

RhoA, RhoB e RhoC

As três isoformas de Rho (RhoA, RhoB e RhoC) estão presentes em todos os vertebrados superiores e apresentam 85% de identidade na sequência de aminoácidos. Enquanto RhoA tem sido extensivamente estudada, as funções de RhoB e RhoC ainda não foram muito investigadas. A região de maior divergência entre as proteínas RhoA, RhoB e RhoC é a porção C-terminal (Figura 3), indicando possíveis diferenças nas localizações celulares (Wang et al., 2003). RhoA, RhoB e RhoC sofrem modificações pós-translacionais

por prenilação (Shao et al., 2003), mas o tamanho do grupo prenil difere entre as três proteínas Rho: enquanto RhoB pode ser prenilada tanto por um grupo farnesil quanto por um grupo geranil-geranil, RhoA e RhoC só podem ser geranil-geraniladas. Esta diferença se reflete nas localizações celulares: RhoB localiza-se principalmente nos endossomos tardios e lisossomos, e RhoA e RhoC localizam-se no citoplasma ou na membrana plasmática (Adamson et al, 1992).

As proteínas Rho têm uma função central na regulação da morfologia celular, polaridade e locomoção, através dos seus efeitos sobre a polimerização da actina, contração da acto-miosina, adesão celular e dinâmica de microtúbulos (Ridley et al., 2003). As três proteínas causam formação de fibras de estresse (Ridley, 2001). Porém, apesar da alta homologia estrutural, elas possuem diferentes funções e cada membro parece estar envolvido de forma diferente e em diferentes fases da progressão tumoral (Sahai e Marshall, 2002).



Figura 3. Alinhamento das sequências de aminoácidos de RhoA, RhoB e RhoC. Resíduos de RhoB e RhoC que diferem de RhoA estão destacados em vermelho. Resíduos que podem ser alterados para modificar a função GTPase estão destacados em rosa. RhoB possui três aminoácidos adicinoais às sequencias protéicas de RhoA e RhoC. A cisteína 4 a partir da porção terminal é prenilada (destacada em azul).

Funções de Rho GTPases na tumorigênese

Células tumorais apresentam descontrole na proliferação, perda da polaridade celular, alterações na adesão célula-célula e à matriz extracelular e aumento nas propriedades migratórias. As família das Rho GTPases pode regular todos estes processos em cultura e, portanto, estão envolvidas no controle da formação e progressão tumoral.

Mutações em Rho GTPases são raramente encontradas em tumores, porém suas expressões e atividades estão freqüentemente alteradas (Aronheim et al., 1998; Gomez del Pulgar et al., 2005; Gouw et al., 2005). A expressão de RhoA está elevada em diversas linhagens celulares tumorais, muitas delas com alto poder de metástase e defeitos no controle da mitose (Ridley, 2004). Análises de microarranjos de DNA mostraram que a expressão de RhoC pode promover metástase e é progressivamente aumentada com a agressividade tumoral (Wu et al., 2004). Foi demonstrado que RhoA na forma constitutivamente ativa possui potencial oncogênico (Zohn et al., 1998) e atua como um componente crítico na transformação induzida por Ras (Qiu et al., 1995). Além disso, RhoA promove a invasão de células de hepatoma (Yoshioka et al., 1998) e induz metástase em fibroblastos NIH 3T3 (del Peso et al., 1997). RhoC foi descrita como um regulador chave na migração e metástase de células de melanoma (Clark et al., 2000) e foi capaz de promover transformação e invasão em células epiteliais normais (van Golen et al, 2000). A proteína RhoB, por outro lado, é necessária para respostas apoptóticas induzidas por inibidores de farnesil-transferase ou agentes que provocam dano ao DNA, podendo ter uma função de supressora tumoral ou reguladora negativo na progressão do câncer (Prendergast, 2001).

Sabe-se que células tumorais apresentam alterações no ciclo celular e muitos oncogenes causam modificações no ciclo celular. Foi demonstrado que a expressão de RhoA, Cdc42 e Rac1 estimula a progressão do ciclo celular (Olson e Hall, 1995). Rac1 e Cdc42 promovem a progressão da fase G1, através do aumento de ciclina D1 (Klein et al., 2007), enquanto a atividade de RhoA parece regular negativamente os níveis dos inibidores de ciclo celular p21cip1 e p27kip1. Porém, os exatos mecanismos nos quais Rac1 e RhoA regulam o ciclo celular ainda não estão claros e parecem depender do tipo celular (Villalonga et al., 2006).

A invasão das células tumorais a tecidos adjacentes e a formação de metástase dependem das propriedades migratórias das células cancerígenas. Para as células migrarem, elas precisam alterar tanto as adesões à matriz extracelular quanto as adesões célula-célula. Rho GTPases participam na regulação da integridade destas adesões (Burridge et al., 2004). RhoA possui um papel chave na regulação das adesões à matriz extracelular na parte de trás da célula, além de induzir o aumento no número e tamanho de adesões focais em muitos tipos celulares e ser necessária para a formação de podossomos em células dentríticas e endoteliais (Ridley, 2000; Linder e Aepfelbacher, 2003). O processo de migração também é dependente do rearranjo do citoesqueleto mediado por Rho GTPases. A formação de lamelipódia mediada por Rac constitui o primeiro passo no processo de migração e experimentos mostraram que na ausência de Rac as células não conseguem migrar (Allen et al., 1998; Nobes e Hall, 1999; Knight et al., 2000). A formação de filopódia por Cdc42 é essencial para o estabelecimento da direção da migração (Allen et al., 1998; Nobes e Hall, 1999), enquanto RhoA está envolvida na geração de forças contráteis para o movimento (Ridley, 2001).

O suporte oferecido por vasos sanguíneos e a formação de novos vasos são essenciais para o desenvolvimento tumoral. Rho GTPases regulam diversos aspectos da angiogênese (Bryan et al., 2007). As proteínas Rho parecem ser alvos diretos da sinalização de VEGF e o estímulo por VEGF leva a uma rápida ativação de RhoA, Rac1 e Cdc42, que voltam aos seus estados de ativação basal num período de 5 a 30 minutos, sugerindo que estas proteínas devem ser importantes durante os estágios iniciais da angiogênese (van Nieuw Amerongen et al., 2003). A permeabilidade de células endoteliais também é regulada por Rho GTPases. O tratamento com o inibidor de ROCK parece levar à diminuição da permeabilidade de células endoteliais, através da alteração no desenvolvimento de junções GAPs e formação de fibras de estresse (Sun et al., 2006).

Rho GTPases ainda são importantes para a transição epitélio-mesenquimal, observada na maioria dos tumores agressivos. O tecido epitelial normal é caracterizado pela presença de polaridade celular e junções célula-célula especializadas. Níveis elevados de RhoE, que antagoniza a função de RhoA (Guasch et al., 1998; Nobes et al., 1998), podem promover a perda da polaridade celular e a sobreposição das células adjacentes (Hansen et al., 2000).

Conclui-se que Rho GTPases parecem estar envolvidas em diversos aspectos da tumorigênese, promovendo ou inibindo a progressão tumoral (Sahai et al., 2002). Um importante passo é analisar os mecanismos moleculares envolvidos, como a função das proteínas efetoras, modificações translacionais e moléculas regulatórias (RhoGEFs, RhoGAPs e RhoGDIs). Estes estudos são importantes para um maior entendimento das funções das Rho GTPases, assim como para a busca de novos alvos para a terapia tumoral.

A Família de proteínas RhoGAP

A primeira proteína RhoGAP foi descrita há 20 anos (Garrett et al., 1989), e desde então, mais de setenta membros foram caracterizados em eucariotos (Figura 4). No genoma humano, prevê-se a existência de 59 a 70 proteínas contendo um domínio RhoGAP e, até o momento, pouco mais da metade já foram caracterizadas (Venter et al., 2001; Peck et al., 2002; Bernards, 2003). Nosso grupo descreveu a análise filogenética de 59 proteínas contendo domínio RhoGAP e a presença da atividade GTPase e outros domínios são dois aspectos importantes no agrupamento filogenético (Brandão et al., 2006). A grande quantidade de RhoGAPs sugere que estas proteínas possuem importantes papéis na regulação das Rho GTPases. A razão para a existência de um grande número de RhoGAPs para poucas Rho GTPases ainda não foi totalmente elucidada. A princípio, pensou-se que elas poderiam atuar em locais específicos, pois algumas RhoGAPs são expressas apenas em alguns tipos de tecido. A proteína p73RhoGAP, por exemplo, é expressa apenas no endotélio vascular e está envolvida na regulação das Rho GTPases durante a angiogênese (Su et al., 2004). Porém, como a expressão da maioria das RhoGAPs é ubíqua, esta não é a explicação para o grande número de RhoGAPs. Atualmente, acredita-se que cada RhoGAP pode regular uma via de sinalização de Rho GTPase específica. Esta hipótese é bem sustentada por experimentos com fungos. Em fungos, Rga1p, Rga2p e Ben3p são GAPs exclusivas para Cdc42p, enquanto Bag7p, Sac7p e Bem2p regulam somente a atividade de Rholp. Interessantemente, cada uma parece ter um papel na modulação de aspectos específicos das funções de Cdc42p e Rho1p (Schmidt et al., 2002; Smith et al., 2002). Além disso, diversas RhoGAPs de mamíferos foram implicadas em funções biológicas específicas, como endocitose, exocitose, citocinese, migração e diferenciação celular, angiogênese, supressão tumoral e morfogênese (Tcherkezian et al., 2005).

Em geral, as Rho GAPs são proteínas grandes, com múltiplos domínios. Os domínios mais comuns são o SH3 (*Src homology domain 3*), que se ligam a peptídeos contendo prolina, e o domínio PH (*pleckstrin homology*). Algumas GAPs também possuem domínios enzimáticos, indicando que estas proteínas possuem múltiplas funções, integrando sinais de diversas vias de sinalização.

O fato de que RhoGAPs estão implicadas em patologias indica sua importância biológica. Mutações no gene GRAF, que codifica uma RhoGAP, foram associadas a

indivíduos com leucemia mielóide com deleção do braço longo do cromossomo 5 (Borkhardt et al., 2000). O gene DLC1 é freqüentemente deletado ou silenciado epigeneticamente em hepatocarcinoma (Wong et al., 2003) e o gene ARHGAP6 está localizado no segmento genômico implicado na microftalmia com síndrome linear dos defeitos da pele (Schaefer et al., 1997).



Figura 4. Árvore filogenética da família RhoGAP de fungos a humanos. Os domínios RhoGAP das 73 GAPs caracterizadas foram alinhados com o programa ClustalW e a árvore filogenética foi gerada com o programa Phylodraw. Em vermelho, *Homo sapiens*; em azul *Mus musculus*; em verde *Rattus norvegicus*, em rosa *S. Cerevisiae*, em amarelo *D. mlanogaster*, em turquesa, *C. elegans*; em laranja, *D. discoideum*; em roxo, *Gallus gallus*; em cinza, *Xenopus laevis*. Adaptado de Tcherkezian e Lamarche-Vame, 2007.

Enquanto algumas RhoGAPs podem inativar mais de uma RhoGTPase (Tcherkezian e Lamarche-Vame, 2007), outras parecem agir especificamente em apenas uma Rho GTPase, como p112RhoGAP, GMIP (*Geminteractin protein*) e ARHGAP6, que agem só sobre RhoA, enquanto chimearin, ARHGAP15 e OCRL-1 são específicas para Rac1

(Tcherkezian e Lamarche-Vame, 2007). Porém, a atividade da maioria das RhoGAPs foi testada apenas para RhoA, Cdc42 e Rac1 e seu efeito sobre as outras Rho GTPases deve ser avaliado antes de se concluir que elas agem em apenas uma Rho GTPase.

Estudos recentes sugerem que RhoGAPs são reguladas por inúmeros mecanismos, incluindo interações proteína-proteína, interações fosfolipídicas, fosforilação, translocação subcelular e degradação proteolítica. (Ahmed et al., 1993; Roof et al., 1998; Jenna et al., 2002; Su et al., 2003; Tcherkezian et al., 2005). A atividade GAP *in vitro* e *in vivo* de McgRacGAP, por exemplo, é regulada pela sua interação com PRC1 (protein regulating cytokinesis 1) durante a metáfase (Ban et al., 2004). Outro exemplo é a fosforilação em tirosina da p190 RhoGAP por Src, necessária para que ocorra sua ativação e associação a p120RasGAP (Hu e Settleman, 1997; Roof et al., 1998).

A sub-família p190 RhoGAP é composta por duas proteínas: p190-A (ou p190) e p190-B. As proteínas desta família foram encontradas em diversas espécies, de moscas a humanos (Settleman et al., 1992a; Burbelo et al., 1998; Chakravarty et al., 2000; Tikoo et al., 2000; Billuart et al., 2001). Elas contém um domínio GTPase N-terminal seguido por quatro domínios FF consecutivos (domínios com dois resíduos de prenil-alaninas conservados), um domínio RhoGAP C-terminal e diversas regiões de ligação SH3. A proteína p190-B possui atividade RhoGAP *in vitro* para Rac1, Cdc42 e RhoA, (Settleman et al.,1992b; Ridley et al., 1993; Burbelo et al., 1998). Porém, quando expressas em fibloblastos *Swiss 3T3*, p190-A atua exclusivamente sobre RhoA (Ridley et al., 1993; Haskell et al., 2001). A interação entre as proteínas p190-A e p120RasGAP regula a atividade de p190-A sobre RhoA (McGlade et al., 1993), sugerindo uma possível ligação entre a sinalização de Ras e Rho. Estudos demonstraram que p190-A também tem um papel na regulação da citocinese e que sua expressão é regulada durante o ciclo celular através de degradação por ubiquitinação (Su et al., 2003).

Membros da família p190 RhoGAP foram implicados em diversos processos biológicos, como supressores de tumor (Wang et al., 1997; Tikoo et al., 2000), migração e invasão celular (Nakahara et al., 1998; Zrihan-Licht et al., 2000; Arthur e Burridge, 2001) e morfogêneses neuronal (Brouns et al., 2000, 2001; Billuart et al., 2001). Recentemente, foi mostrado que camundongos com depleção de p190-B apresentam tamanho reduzido,

defeitos na sinalização de insulina e redução da formação de adipócitos e tecido muscular (Chakravarty et al., 2000; Sordella et al., 2003).

Considerando que um número parecido de RhoGEFs também é codificado pelo genoma humano, e que estas proteínas estão freqüentemente associadas com várias funções biológicas, o estudo das atividades de RhoGAPs será um desafio para pesquisadores por muitos anos.

A Proteína RhoGAP ARHGAP21

ARHGAP21 foi descrita pelo nosso grupo em 2002 (Basseres et al. 2002). O gene que codifica ARHGAP21 está presente no braço curto do cromossomo 10 (banda 10p12.1) e possui 26 éxons. A proteína codificada possui 1958 aminoácidos, um tamanho predito de 217 kDa e três domínios principais: PDZ, PH e RhoGAP, sendo este último o responsável pela classificação da ARHGAP21 como uma proteína ativadora de Rho GTPase (RhoGAP) (Figura 5).




Domínios PH estão envolvidos na interação da proteína com componentes de membranas e actina, e podem recrutar RhoGAPs para local celular apropriado (Yao et al., 1999). Domínios PDZ são encontrados em muitas proteínas e estão envolvidos na mediação de interações proteína-proteína. Proteínas contendo domínios PDZ geralmente se ligam na porção C-terminal das proteínas alvo (Saras e Heldin, 1996).

ARHGAP21 é amplamente expressa, com altos níveis em cérebro e músculo e experimentos de RT-PCR quantitativo em tempo real mostraram que sua expressão é aumentada durante a diferenciação de células HL-60 com ácido trans-retinóico (Basseres et al., 2002). Também foi encontrada elevada expressão de ARHGAP21 em carcinomas escamosos de cabeça e pescoço, em comparação ao tecido normal (Carles et al., 2006).

Experimentos *in vitro* demonstraram que ARHGAP21 tem atividade RhoGAP para RhoA e Cdc42 (Dubois et al., 2005; Sousa et al., 2005). A proteína ARHGAP21 foi identificada como uma nova parceira de alfa-catenina, regulando junções célula-célula. A super-expressão de ARHGAP21 ocasionou em rompimento dos filamentos de actina, aumentou os níveis de alfa-catenina e actina nas junções celulares e inibiu a entrada da bactéria *Listeria monocytogenes* (Sousa et al., 2005). ARHGAP21 também interage com ARF1-GTPase e possui um papel na regulação da estrutura e função do complexo de Golgi, através da regulação do complexo Arp2/3 e atividade de Cdc42 (Dubois et al., 2005).

Trabalhos anteriores de nosso grupo estudaram funções de ARHGAP21 em cardiomiócitos e linhagens tumorais de glioblastoma humano. Em cardiomiócitos, foi demonstrado que ARHGAP21 sofre translocação do núcleo para a membrana plasmática em após sobrecarga de pressão. Além disso, ARHGAP21 associa-se a porção C-terminal da proteína quinase de adesão focal (FAK) e a proteína quinase C zeta (PKC ζ) (Borges et al., 2008). Em linhagens de glioblastoma multiforme humano, a inibição da expressão de ARHGAP21 causou alterações na morfologia celular, aumento no potencial migratório, aumento da atividade de Cdc42, ativação da sinalização FAK \rightarrow p130_{CAS} e aumento da produção de metaloproteinase 2 (MMP2) (Bigarella et al., 2009).

Assim, diante das evidencias do envolvimento de ARHGAP21 em diversas atividades celulares, especialmente no controle do citoesqueleto de actina, adesão e migração, justifica-se o estudo de funções da ARHGAP21 tanto em neoplasias quanto no tecido normal. Para tanto, utilizamos linhagens celulares de adenocarcinoma de próstata como modelo de tumor sólido e células endoteliais como modelo de células normal, visto que os vasos sanguíneos têm importante papel no processo carcinogênico.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Investigar a função de ARHGAP21 em células endoteliais e de adenocarcinoma de próstata.

Objetivos específicos

- 1. Avaliar a atividade RhoGAP de ARHGAP21 em células HEK 293T (linhagem epitelial de rim, facilmente transfectável).
 - a. Em células endoteliais HUVECs (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*):
- 2. Observar a localização subcelular de ARHGAP21 em células HUVECs
- Avaliar o perfil de expressão gênica em células HUVECs submetidas à inibição de ARHGAP21
- 4. Avaliar o ciclo celular em células HUVECs submetidas à inibição de ARHGAP21a. Em linhagens celulares de adenocarcinoma de próstata:
- 5. Observar a expressão de ARHGAP21 em células LNCaP, DU145 e PC-3
- 6. Observar a localização subcelular de ARHGAP21 em células LNCaP e PC-3
- Avaliar o perfil de expressão gênica em células LNCaP submetidas à inibição da expressão de ARHGAP21.
- 8. Avaliar a expressão de genes encontrados nos ensaios de microarranjos de DNA em células LNCaP e PC-3 com super-expressão de RhoA, RhoB e RhoC
- Avaliar os processos de viabilidade celular, ciclo celular, adesão e migração em células LNCaP e PC-3 com inibição da expressão de ARHGAP21.

MATERIAIS E MÉTODOS

Linhagens Celulares

A linhagem celular de epitélio de rim HEK 293T e as linhagens celulares de adenocarcinoma de próstata LNCaP, DU145 e PC-3 foram adquiradas da Coleção Americana de Tipos de Cultura (ATCC), Philadelphia, USA. A linhagem de células HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) foi gentilmente cedida pelo Prof. Hugo Pequeno Monteiro (UNIFESP-SP).

Vetores utilizados

Os vetores utilizados nas transfecções celulares estão descritos abaixo:

- pCMV6 Neo: vetor vazio, sem inserto da proteína ARHGAP21. Este vetor confere resistência à neomicina.
- pCMV6 Neo-ARHGAP21: vetor para expressão da proteína ARHGAP21 inteira. Este vetor confere resistência à neomicina.
- pcDNA3 p190 RhoGAP B: vetor para expressão da proteína p190 RhoGAP B inteira fusionada à *FLAG*. Este vetor confere resistência à neomicina.
- pcDNA3 RhoA-GFP, pcDNA3 RhoB-GFP e pcDNA3 RhoC-GFP: vetores utilizados para expressão das proteínas RhoA, RhoB e RhoC fusionadas à GFP. Estes vetores conferem resistência à neomicina.
- pcDNA3 Rac1 Q61L GFP, pcDNA3 Cdc42 Q61L GFP: vetores para expressão das proteínas Rac1 e Cdc42 nas formas mutantes constitutivamente ativas fusionadas à GFP. A substituição da glutamina 61 pela leucina previne a inativação de Rac1 endógena ou induzida por proteínas da família GAP.
- pcDNA3 RhoC T19N GFP: vetor para expressão da proteína RhoC na forma constitutivamente inativa. A substituição da treonina 19 por asparagina cria uma conformação de ligação à GDP, tornando a Rho GTPase inativa e incapaz de interagir com as proteínas efetoras.

A representação esquemática dos vetores pCMV6 Neo e pcDNA3 está ilustrada na Figura 6.



Figura 6. Representação esquemática dos vetores pCVM6-Neo e pcDNA3 utilizados para transfecções celulares.

Métodos

Transfecções em células HEK 293T

Células HEK 293T foram semeadas em placas p100 (10⁶ células/ placa) em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Médium/Gibco, Rockville, MD*) com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, Rockville, MD). Após 12-16 horas, seguiu-se transfecção utilizando-se o reagente Fosfato de Cálcio. O meio de cultura foi substituído por DMEM 5% SBF e a cada placa foi adicionado 7µg de plasmídeo em solução contendo 450 µL de água, 30 µL de CaCl₂ 2,5M e 500 µL de solução de HEBES 2x. Quando a transfecção foi realizada com mais de um vetor, 7µg de cada plasmídeo foram utilizados. Para os ensaios de GST-Pull Down para avaliar atividade Rac1, Cdc42, RhoA e RhoB, as células foram coletadas após 24 horas de transfecção. Para os ensaios de GST-Pull Down para avaliar a atividade de RhoC, por sua vez, as células foram coletadas 48 horas após a transfecção.

Western Blot

Ao precipitado celular contendo 5 x 10^6 a 10^7 células foi acrescentado tampão de extração de proteínas contendo 100 mM Tris (pH 7.6), 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 0,1 mg Aprotinina, 35 mg PMSF/mL, 10 mM Na₃VO₄, 100 mM NaF, 10 mM Na₄P₂O₇, e 4

mM EDTA. As amostras foram homogeneizadas até que se tornassem bastante fluidas. Após 30 minutos de incubação em gelo, essas amostras passaram por um processo de centrifugação a 4ºC durante 20 minutos para remoção dos restos celulares. Para aplicação no gel de poliacrilamida, 5% de volume final de tampão de Laemmli contendo 100 mmol/L de ditiotreitol foi adicionado aos extratos protéicos e estes foram aquecidos a 100°C por 10 minutos. As amostras foram então submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 8%-SDS-PAGE em aparelho de eletroforese (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, Ca). A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana foi realizada em 90 minutos a 120 volts (constante) em aparelho miniaturizado de transferência da Bio-Rad. A ligação dos anticorpos a proteínas não-específicas foi reduzida por pré-incubação da membrana por 1 hora com tampão de bloqueio (5% leite em pó magro, 10 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl e 0,1% Tween 20) a 4°C. A membrana de nitrocelulose foi então incubada com anticorpos específicos diluídos em tampão de bloqueio (0,3% de leite em pó magro) por 12 horas a 4°C e então lavadas 3 vezes com solução basal (10 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl e 0.02% Tween 20). Os anticorpos primários utilizados estão listados na Tabela 1. O sistema de revelação usado foi o baseado em quimioluminescencia, de acordo com as instruções no kit ECLTM Western Blotting Analysis System (Amersham Pharmacia Biotech, UK). Resumidamente, as membranas foram incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário, conjugado à HRP (Horseradish peroxidase), lavadas novamente, e então submetidas ao substrado da enzima, resultando num produto luminescente, detectado por auto-radiografias em filmes Kodak XAR (Eastman Kodak, Rochester, NY). Quando necessária, a quantificação das bandas foi realizada com o programa UN-SCAN-IT gel 6.1.

Anticorpo	Fabricante e número de catálogo	Animal em que foi produzido
Anti-ARHGAP21	Santa Cruz	Coelho
Anti-p190 RhoGAP	BD transduction Laboratories	Camundongo
Anti-Rac1	Santa Cruz SC-217	Coelho
Anti-Cdc42	Cell Sigmaling 2462	Coelho
Anti-RhoA	Santa Cruz SC-179	Coelho
Anti-GFP	Santa Cruz SC-8334	Coelho
Anti-GAPDH	Santa Cruz SC-137179	Camundongo
Anti-Actina	Santa Cruz SC-1616	Carneiro

Tabela 1- Anticorpos utilizados para Western Blot

Produção de proteínas recombinantes

Experimentos de GST-Pull Down para detecção das atividades das proteínas Rho GTPases baseiam-se no princípio de que as Rho GTPases interagem com proteínas efetoras apenas quando estão ativas (ligadas a GTP). Desta forma, é possível comparar a atividade das Rho GTPases em diferentes extratos protéicos através da imunoprecipitação das Rho GTPases ativas após sua ligação com proteínas efetoras ligadas a GST.

Para avaliação da atividade das proteínas Cdc42 e Rac1, utilizamos os domínios de ligação à Rho das proteínas efetoras WASP (WBD-GST) e PAK1 (PAK1-GST), respectivamente, clonados em pGEX-KG. Para a avaliação da atividade das proteínas RhoA, RhoB e RhoC, utilizamos uma construção contendo o domínio de ligação da proteína efetora Rhotekin (TRBD-GST), também clonado em pGEX-KG. Todos os insertos estavam fusionados a GST e as construções foram gentilmente cedidas pela profa. Anne Ridley (*King's College London*, Reino Unido).

Para a produção das proteínas, bactérias *E. coli* transformadas com as construções contendo os domínios de ligação a Rho foram inoculadas em 400 mL de meio LB com 100 μ g/mL de ampicilina. Após incubação pernoite a 37°C com agitação, as culturas foram diluídas 1:10 em 2 litros de LB com ampicilina e incubadas a 37°C até a DO₆₀₀ atingir 0,8.

A expressão protéica foi então induzida por 0,5mM de isopropyl β -D-1-

thiogalactopyranoside (IPTG) por 2 horas a 30°C. Após este período, as bactérias foram coletadas por centrifugação 4000g por 15 minutos e lisadas em 40 mL de tampão de lise (10mM Tris pH 8,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) e 100 µg/mL de lisozima. O lisado bacteriano foi então clarificado por 20 minutos de centrifugação a 15000g e incubado com 50% de glutationa sefarose por uma hora a 4°C com agitação. Para observar a pureza e a quantidade de proteína purificada, as amostras de proteínas produzidas, junto com uma curva contendo diferentes quantidades de albumina de soro bovino (BSA) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12%-SDS-PAGE em aparelho de eletroforese (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, Ca) a 100 volts por um período aproximado de duas horas. Em seguida, o gel foi corado em solução de 2,5% de *Coomassie brilliant blue* R-250, 10% metanol e 10% ácido acético por um período de duas horas e depois descorado em solução de 30% metanol e 10% ácido acético com agitação por um período aproximado de 12 horas (Figura 7).



Figura 7. Gel de acrilamida mostrando a pureza das proteínas utilizadas nos ensaios de Pull Down. Os domínios de ligação das proteínas efetoras Rhotekin (RBD-GST), Wasp (WBD-GST) e PAK (PAK1-GST) foram submetidas à eletroforese em gel de acrilamida 12%, que foi posteriormente corado com azul de Coomassie. As curvas de BSA ultilizadas para a quantificação protéica estão indicadas na figura. Note as bandas nos tamanhos esperados das três proteínas produzidas: RBD-GST, WBD-GST e PAK1-GST. A ausência de muitas bandas inespecíficas indica a pureza das proteínas obtidas.

Ensaios de Pull Down para avaliação da atividade de RhoGTPases

A atividade das proteínas Rho GTPases Rac1, Cdc42 e RhoA foi determinada por ensaio de precipitação por afinidade em extratos protéicos provenientes de células HEK 293T transfectadas com vetor pCMV6 Neo-ARHGAP21 ou pCMV6 Neo (controle). O protocolo foi realizado segundo descrito anteriormente (Ren e Schwartz, 2000). Resumidamente, após 24 horas de transfecção, as células foram lisadas com tampão de lise (50mM Tris pH 7.2, 1% de Triton X-100, 0,5% de deoxicolato de sódio, 0,1% de SDS, 500mM de NaCl, 10mM MgCl₂ e inibidores de proteases). O lisado protéico foi imediatamente transferido para um tubo contendo os domínios de ligação das proteínas efetoras (GST-TRBD, GST-WBD ou GST-PAK1) e incubado a 4°C com agitação por 1 hora. Após algumas lavagens com tampão especifico, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de acrilamida 12% e, após transferência para membrana de nitrocelulose, as membranas foram então incubadas com anticorpos anti-RhoA, anti-Cdc42 ou anti-Rac1.

Para os ensaios de GST-Pull Down para verificar a atividade das proteínas RhoB e RhoC, foram utilizados extratos protéicos de células HEK 293T co-transfectadas com os vetores pCMV6 Neo-ARHGAP21 e pCDNA3 RhoB-GFP ou pCMV6 Neo-ARHGAP21 e pCDNA3 RhoC-GFP. Como controle, foram utilizados extratos protéicos provenientes de co-transfecção com os vetores pCMV6 Neo e pCDNA3 RhoB-GFP ou pCMV6 Neo e pCDNA3 RhoC-GFP. O protocolo seguiu-se da mesma forma descrita para o ensaio com as outras Rho GTPases, sendo que ao final do experimento as membranas de nitrocelulose foram incubadas com anticorpo anti-GFP.

Extratos protéicos de HEK 293T transfectadas com vetores contendo Cdc42 e Rac1 constitutivamente ativos fusionados a GFP foram usados como controle para avaliação da eficiência dos ensaios de GST-Pull Down para a atividade de Cdc42 e Rac1, respectivamente. A super-expressão de p190 RhoGAP B, por sua vez, foi utilizada como controle para verificar a eficiência dos experimentos de GST-Pull Down para atividade de RhoA, RhoB e RhoC. Para a avaliação da atividade de RhoC, extratos protéicos de células com expressão de RhoC constitutivamente inativo ligado a GFP foi também utilizado como controle da eficiência da reação.

Imunofluorescência e Microscopia confocal

As células HUVECs, LNCaP e PC-3 foram cultivadas sobre lamínulas de vidro, lavadas com PBS e fixadas com uma solução de paraformaldeído 4%. Em seguida, foram realizados o bloqueio e a permeabilização das células com uma solução com 3% de BSA e 0,6% de triton. O anticorpo primário anti-ARHGAP21 usado nas reações de imunofluorência foi gerado pelo laboratório Bethyl (Montgomery, Texas), através da imunização de coelhos com o peptídeo sintético KSDSGSLGDAKNEKE, correspondente aos resíduos 1856-1870 da sequência da proteína humana ARHGAP21. A sequência peptídica imunogênica e o uso deste anticorpo em reações de imunofluorescência já havia sido previamente padronizado em nosso laboratório. O anticorpo foi diluído a 10 µg/mL em solução 1% de BSA e incubado com as células, em câmara úmida a 4°C, durante 18 horas. Após 3 lavagens com PBS, seguiu-se a incubação com o anticorpo secundário marcado com Alexa488 (Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit antibody/Molecular Probes) por 2 horas à temperatura ambiente. As lamínulas foram novamente lavadas com PBS e montadas em lâminas utilizando-se o meio de montagem para fluorescência (ProLong® Gold com DAPI, da Molecular Probes).

As lâminas foram analisadas por escaneamento a laser em um LSM-510 montado sobre um microscópio Axioplan (Zeiss), utilizando-se a objetiva de 40x de imersão em óleo. Em todos os experimentos foram feitos controles negativos, somente com anticorpo secundário, os quais não apresentaram fluorescência.

Transfecção com RNA de interferência

Para a realização do silenciamento pós transcricional de ARHGAP21 foi utilizada uma mistura de quatro sequências de oligonucleotídeos específicas para inibição da proteína ARHGAP21 (siRNA ARHGAP21 ON-TARGETplus SMARTpool L004775-01 – Dharmacon, Lafayette, CO). As sequências se encontram na Tabela 2. O reagente foi ressuspendido a uma concentração de 50 μ M, estocado a –20°C e utilizado para transfecção de linhagens celulares a uma concentração final de 320 η M. Uma mistura de oligonucleotídeos controle (siRNA ON-TARGETplus Non-targeting Pool D-001810-10 -Dharmacon, Lafayette, CO) foi utilizada nas células controle. Resumidamente, 7 x 10⁵ células foram semeadas em placas de 10cm de diâmetro e mantidas com meio RPMI (*RPMI* *medium 1640/Gibco, Rockville, MD*) com 10% de SFB no dia precedente a transfecção. No dia do experimento, as células foram lavadas com PBS e a cada placa foi adicionado 320ηM de oligonucleotídeos com 30 µL de Lipofectamina 2000 em meio de cultura OPTIMEM (Gibco, Rockville, MD). Após 6 horas de incubação, foi adicionado às células meio de cultura completo. A coleta foi realizada após 48 horas de transfecção das células HUVEC e 72 após a transfecção das células LNCaP e PC-3.

Oligonucleotídeos siRNA	Sequências (5´ - 3´)
siRNA1 ARHGAP21-F	5'-GAAAAUAGCAGAUCGGUUAUU-3'
siRNA1 ARHGAP21-R	5'- PUAACCGAUCUGCUAUUUUCUU-3'
siRNA2 ARHGAP21-F	5'-GAUGAUAAAUGGCGAGAUUUU -3'
siRNA2 ARHGAP21-R	5'- PAAUCUCGCCAUUUAUCAUCUU-3'
siRNA3 ARHGAP21-F	5'-GGAUCUAAUUAGUCGAAGAUU -3'
siRNA3 ARHGAP21-R	5'- PUCUUCGACUAAUUAGAUCCUU-3'
siRNA4 ARHGAP21-F	5'-GCACAGAGAUGCUACCGAAUU -3'
siRNA4 ARHGAP21-R	5'- PUUCGGUAGCAUCUCUGUGCUU-3'

Tabela 2- Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para inibição da expressão de ARHGAP21.

Extração do RNA total

O RNA de células foi isolado utilizando-se o Trizol (Invitrogen, Life Technologies, USA). O Trizol é um reagente que apresenta uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina. A extração de RNA com esse reagente é uma adaptação do método desenvolvido por Chomczinki e Sacchi (Chomczynski e Sacchi 1987). Ao precipitado contendo 5×10^6 a 1×10^7 células, foi acrescentado 1 mL de Trizol e a amostra homogeneizada até que se tornasse bastante fluida. A purificação do RNA se deu segundo o protocolo do fabricante. A quantificação do RNA obtido foi realizada através da leitura da densidade óptica (DO) de uma alíquota da amostra em espectofotômetro NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer) com comprimento de onda equivalente a 260 nm, considerando que 1 DO à 260 nm equivale a 40 µg/mL de RNA. A relação entre as leituras realizadas a

260 e 280 nm foi utilizada como parâmetro na estimativa do grau de contaminação do RNA por proteínas.

Purificação do RNA total

Após extração com o reagente Trizol (Invitrogen), as amostras de RNA submetidas aos ensaios de Microarranjos de DNA foram purificadas com o kit Qiagen®, RNeasyTM Micro Kit, segundo instruções dos fabricantes.

Tratamento do RNA total com DNAse I

Com o objetivo de eliminar possivel contaminação deste material com DNA genômico, o RNA total de células foi tratado com 1 unidade/ μ L de DNAse livre de RNAse (Life Techologies), utilizando-se 1 unidade de enzima para tratar 5 μ g de RNA por 15 minutos à temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de uma solução de EDTA na concentração final de 2 mM. Subsequentemente, a enzima foi inativada por incubação de 10 minutos a 65°C.

Transcrição em cDNA

As amostras de RNA total, contendo $2\mu g$ de RNA e previamente tratadas com DNAse I, foram reversamente transcritas em cDNA (híbrido RNA-cDNA) em uma reação de volume final de 20 μ L (Life Techologies). A reação foi iniciada adicionando-se 1 μ L de oligonucleotídeo (dT) 500 μ g/mL e 1 μ L da mistura (10 mM) de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) a 2 ug de RNA previamente tratado. Essa mistura foi aquecida por 5 minutos a 65°C e, em seguida, incubada em gelo. Adicionou-se, então, 4 μ L do tampão de reação 5x, contendo 250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, e 0,1 M DTT, e também 200 unidades da enzima transcriptase reversa *SuperScript III*, que catalisa a reação de extensão da fita complementar. Essa mistura foi incubada por 50 minutos a 42°C. A seguir, foi feita a desnaturação da reação por 15 minutos a 70°C e finalmente foram adicionadas 40 unidades de Rnase H e a solução incubada por 20 minutos a 37°C. As amostras de cDNA foram quantificadas através do espectrofotômetro NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer).

RT-PCR em tempo real

Amplificação gênica em tempo real foi realizada no aparelho ABI 7500 Sequence Detector System (Applied Biosystems) utilizando-se o reagente *Power SybrGreen PCR Master Mix* (Applied Biosystems). Sessenta nanogramas de cada amostra de cDNA foram utilizados nas reações. A sequência dos iniciadores utilizados encontra-se na Tabela 2. Um controle negativo, com adição de água no lugar de cDNA, foi realizado para cada par de iniciadores. O protocolo de dissociação foi realizado no final de cada reação para verificar amplificações não específicas. Cada reação de PCR em tempo real foi realizada em triplicata. A expressão gênica de β -actina, HPRT ou GAPDH foi utilizada como controle endógeno das reações. A quantificação relativa das expressões de cada gene normalizado pelo controle endógeno foi calculada utilizando-se a fórmula 2^{-□□CT} (Livak e Schmittgen 2001).

Verificação da integridade do RNA (bioanalyzer)

Para a realização das reações do microarranjo de DNA é essencial checar a qualidade dos RNAs obtidos para evitar a obtenção de falsos resultados devido à degradação do material.

O *kit* Agilent RNA 6000 Nano foi utilizado para verificar a qualidade dos RNAs. Resumidamente, o RNA total (até 200 nanogramas) foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida dentro do chip incluído no *kit*. A corrida foi realizada dentro do equipamento Agilent 2100 Eletrophoresis Bioanalyser (Agilent Technologies) e a integridade do RNA foi então verificada com o Software 2100 Expert (Agilent), o qual fornece o eletroferograma de fluorescência dos RNAs ribossomais 18S e 28S e também um número de integridade do RNA (RIN).

Microarranjos de DNA em células HUVECs

Os experimentos de microarranjos de DNA em HUVECs foram realizados em colaboração com o professor Sérgio Verjovski-Almeida e seu aluno de doutorado Yuri B. Moreira, no Laboratório de Expressão Gênica em Eucariotos/IQ-USP.

500ng de RNA total foram submetidos à amplificação e síntese de cRNA marcados com cianina-3 (Cy3) e cianina-5 (Cy5) usando *Agilent Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification Kit PLUS, two-Color* (Agilent Technologies). Um iniciador contendo dT e um promotor T7 polimerase é anelado na porção polyA+ do

RNA. A enzima transcriptase reversa é então adicionada para a síntese da 1^a e 2^a fita de cDNA. Depois, cRNA é sintetizado a partir da fita dupla de cDNA pela enzima T7 RNA polimerase, a qual simultaneamente incorpora CTP marcado com cianina-3 ou cianina-5. A representação esquemática do processo de síntese e amplificação do cRNA marcado com cinanina-3 (Cy3) ou cianina-5 (Cy5) está ilustrado na Figura 8.

A quantidade de cRNA utilizada para marcação com Cy3 ou Cy5 foi 825ng. O cRNA provenientes de células HUVECs controle marcado com Cy3 foi hibridizado com 825ng de cRNA de HUVECs siRNA marcado com Cy5, e vice-versa, *utilizando Gene Expression Hybridization Kit* (Agilent Technologies). Desta forma, quatro amostras duplamente marcadas foram aplicadas na lâmina de microarranjo *Whole Human Genome Oligo Microarray* 4 x 44K (Agilent Technologies) com 4 compartimentos separados representando 41.000 genes ou transcritos humanos.

As lâminas de microarranjos foram submetidas a 10 rotações por minuto, em estufa à 65°C por 17 horas e em seguida lavadas utilizando tampões adequados, fornecidos pelo fabricante das lâminas. A aquisição da imagem dos microarranjos, de cada amostra, realizou-se através do Scanner GenePIX 4000B – Molecular Devices (MDS Analytical Technologies, Califórnia – USA), utilizando laser 532nm para excitar moléculas de cyanina-3 e laser 633nm para moléculas de cyanina-5. Os dados de intensidade obtidos na imagem foram extraídos usando o programa *Agilent Feature Extration* (Agilent Technologies), que também corrige os efeitos de marcação dos dois fluoróforos (Cy3 possui intensidades mais fortes que Cy5 para baixas intensidades).



Figura 8. Processo de síntese e amplificação do cRNA marcado com cianina-3 (Cy3) ou cianina-5 (Cy5). Um iniciador contendo dT e um promotor T7 polimerase foi anelado na porção polyA+ do RNA proveniente de células HUVECs controle ou siRNA. A síntese de cDNA foi realizada com a enzima transcriptase reversa e o cRNA foi sintetizado a partir da dupla fita de cDNA usando T7 RNA polimerase, a qual simultaneamente incorpora CTP marcado com cianina-3 ou cianina-5. Após a marcação, as amostras foram quantificadas, misturadas e hibridizadas nas lâminas de microarranjos de DNA. As amostras controle foram marcadas com Cy-3 e hibridizadas na lâmina junto com as amostras siRNA marcadas com Cy5 e vice-versa.

Análise de expressão diferencial por SAM

As análises dos microrranjos de DNA em HUVECs foram realizadas com o teste de significância específico para microarranjo SAM – *Significance Analysis of Microarray* (Tusher *et al.* 2001). Este teste leva em consideração, além dos valores de significância

tradicionais, como o p-valor do teste-t, o número de testes realizados – um para cada *spot*, e a probabilidade de se obter genes com valores altos de significância (ex. valor de p menor que 0,005), mas resultantes do grande número de perguntas (40000 spots x 0,005 = 200 genes), a chamada taxa de falsa descoberta (*False Discovery Rate* ou q-valor). Foram analisados os genes que se mostraram expressos em todas as lâminas e foi considerado como valor para análise a razão entre a intensidade de cada gene observada nas amostras submetidas à inibição de ARHGAP21 (siRNA) em relação a intensidade observada no controle, em escala log, ou seja: log2 (siRNA/Controle).

Os parâmetros utilizados foram: uma classe, 16 permutações e taxa de falsa descoberta (FDR) de 15%. Observamos um total de 216 genes diferentemente expressos nas amostras submetidas à inibição de ARHGAP21 em relação às amostras controles, sendo 195 genes mais expressos e 21 genes menos expressos. Considerando-se um limite de corte (*cut-off*) de *fold change* = 1,4 para os genes mais expressos e de 0,6 para os genes menos expressos, um total de 153 genes foram considerados diferencialmente expressos, sendo 138 hiperexpressos e 15 hipoexpressos nas amostras com inibição de ARHGAP21 (Apêndice I).

Microarranjos de DNA em células LNCaP

Experimentos de microarranjo de DNA em células LNCaP foram realizados em colaboração com os pesquisadores Carlos Alberto Moreira-Filho e Patrícia Severino do Instituto de Ensino e Pesquisa Albert Einstein.

O protocolo utilizado para a síntese e marcação do cDNA foi o *GeneChip Whole Transcript Sense Target Labelling Assay*. Foram utilizados 100 ng de RNA total para o início do experimento, de acordo com recomendações do fabricante. Esse protocolo inicia-se com a síntese de cDNA dupla fita utilizando-se hexâmeros randômicos contendo uma seqüência promotora de T7. Esse material é amplificado pela RNA polimerase T7 gerando muitas cópias de cRNA anti-senso. Em um segundo ciclo de síntese de cDNA, hexâmeros randômicos são utilizados como iniciadores para a transcrição reversa do cRNA obtido no primeiro ciclo. Essa etapa produz DNA de fita simples na orientação senso que será marcado com um reagente específico (*Affymetrix proprietary DNA Labeling Reagent*) covalentemente ligado à biotina pela deoxinucleotidil transferase (TdT). Para os procedimentos iniciais utilizou-se o kit *WT cDNA Synthesis and Amplification* (Affymetrix), de acordo com as instruções do fabricante. Esse kit é usado para a síntese de cDNA no primeiro e no segundo ciclo, e também para os procedimentos de amplificação linear através da transcrição *in vitro*. Uma vez realizados esses procedimentos, o DNA de fita simples gerado é fragmentado e marcado o kit GeneChip® WT Terminal Labeling (Figura 9).

O Kit *GeneChip Hybridization, Wash and Stain* (Affymetrix) foi utilizado para o preparo das soluções de hibridização e lavagem das lâminas. As amostras marcadas de cDNA provenientes de células LNCaP controle e siRNA foram hibridizadas na lâmina Human Gene 1.0 st (Affymetrix). Esta lâmina contém 28.969 genes, cada um deles representado por aproximadamente 26 sondas distribuídas ao longo do gene. Foram feitas duas lâminas para cada condição (células controle e siRNA). As lâminas foram incubadas em estufa a 45°C, sendo submetidas a 60 rotações por minuto por 17 horas e em seguida lavadas utilizando-se tampões adequados. A aquisição das imagens das lâminas foi realizada com o Scanner 3000 7G, controlado pelo Gene Chip Operating Software (GCOS).



Figura 9. Processo de síntese e amplificação do cRNA biotinilado. A enzima transcriptase reversa e iniciadores randômicos foram utilizados para síntese de cDNA a partir de RNAs de células LNCaP controle e siRNA. O cRNA foi sintetizado a partir do cDNA usando a enzima T7 RNA polimerase. Um segundo ciclo de síntese de DNA foi realizado e hexâmeros randômicos foram utilizados como iniciadores para a transcrição reversa do cRNA obtido no primeiro ciclo. O DNA foi então submetido à fragmentação e à marcação com o reagente DNA labeling (*Affymetrix*). Após a marcação, cada amostra separada foi quantificada e hibridizada em lâmina de microarranjo de DNA.

Análise de de expressão diferencial pelo método Htself

Genes diferencialmente expressos nos experimentos de microarranjos de DNA com células LNCaP foram identificados de acordo com o método HTself (Vencio e Koide, 2005). O uso deste método diminui a necessidade da realização de muitas réplicas. Neste trabalho, foram realizadas duplicatas dos experimentos de microarranjos de DNA com as células LNCaP controle e siRNA. O valor do ponto de corte (*cut-off*) foi determinado a partir da intensidade de fluorescência de todos os pontos da lâmina. Após a determinação deste valor, cada ponto é testado para avaliar se o gene é diferencialmente expresso ou não, levando-se em consideração as réplicas técnicas. De acordo com esta análise encontramos um total de 69 genes diferencialmente expressos, sendo 63 hiperexpressos e 6 hipoexpressos nas amostras LNCaP com inibição de ARHGAP21 (Apêndice II).

Desenho de oligos iniciadores

Os oligos inicidores para amplificação dos genes específicos foram desenhados com dois programas diferentes. Primeiramente, o programa *PRIMER EXPRESS* (Applied Biosystems) foi utilizado para desenhar os iniciadores com uma temperatura de anelamento de 65°C e tamanho do amplicon entre 100 e 150 pares de bases. Posteriormente, o programa Gene Runner Version 3.5 (Hastings software[®]) foi utilizado para checar a ausência de estruturas que podem ser formadas dentro do iniciador ou entre os iniciadores senso e anti-senso, como dímeros ou alças, que podem diminuir a eficiência da reação.

Com o objetivo de evitar amplificação de possível DNA contaminante presente nas amostras, os iniciadores da fita sense e anti-sense foram desenhados em éxons diferentes sempre que possível. Para a delimitação de éxons e íntrons utilizou-se o progama BLAT (http://genome.csdb.cn/cgi-bin/hgBlat).

Todos os pares de oligos iniciadores desenhados foram então analisados com o programa BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) para certificação de que eles não amplificariam produtos inespecíficos. As sequências dos iniciadores utilizados neste estudo estão listadas na tabela 3.

Gene	Seqüência Primer	Concentração utilizada
ARHGAP21-F ARHGAP21-R	5'-ATGCACTGTACACTCGCTTCGA-3' 5'- CAACGACGCCAGCAAAAAC-3'	300nM
GAPDH-F GAPDH-R	5'- ACCCACTCCTCCACCTTTGA-3' 5'- CTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT-3'	150nM
HPRT-F HPRT-R	5'- GAACGTCTTGCTCGAGATGTGA-3' 5'- TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAT-3'	150nM
ABL-F ABL-R	5'- TGGAGATAACACTCTAAGCATAACTAAA-3' 5'- GATGTAGTTGCTTGGGACCCA-3'	300nM
PAI-1-F PAI-1-R	5'- AAAGGCAACATGACCAGGCT-3' 5'- CGGTCATTCCCAGGTTCTCTA-3'	400nM
HMGA2-F HMGA2-R	5'- CACTTCAGCCCAGGGACAAC-3' 5'- CTCTTGTTTTTGCTGCCTTTG-3'	300nM
FRZB –F FRZB –R	5'- GGGCTATGAAGATGAGGAACGT-3' 5'- TTTACCGAGTCGATCCTTCCA-3'	300 nM
FGF18-F FGF18-R	5'- AATTCTACCTGTGCATGAACCG-3' 5'- CGATGAACACACACTCCTTGCT-3'	400 nM
SMURF2-F SMURF2-R	5'- TAAATCGGCAGAACCAATTGA-3' 5'- CTCGCTTGTACCTTGGGACTG-3'	400 nM
PODXL-F PODXL-R	5'- ATACGGCTGGCATCTGTTCC-3' 5'- TCCTTCAGCCGCTCGTACA-3'	300 nM
BNIP3-F BNIP3-R	5'-ATATGGGATTGGTCAAGTCGG-3' 5'- CGCTCGTGTTCCTCATGCT-3'	300nM
STC1-F STC1-R	5'- GTCCAGCTGCCCAATCACTT-3' 5'-AGGCTGTCTCTGATTGTGCTGA-3'	300 nM
TRAF1-F TRAF1-R	5'- CTATAAGCCCAGGAAGCCGT -3' 5'- TTGAAGGAGCAGCCGACAC -3'	300 nM
ELK3-F ELK3-R	5'- TTCACCGCACAGACACCAAA -3' 5'- ACTAAGGCTGCTCCAGAAATGTAT -3'	400 nM
NEK7-F NEK7-R	5'- ACACATGCATTCTCGAAGAGTCA -3' 5'- CGGCCAAGCCCAAGATCT -3'	300 nM
IGFBP2-F IGFBP2-R	5'- CACAGAAACCGCCGTTGTC-3' 5'- GCCCGCTTAGCTTCTCCAT-3'	400 nM
TGFBI-F TGFBI-R	5'- ATGAGCTGAAACACGGCATG-3' 5'- CCGGGCACAGTTCACAGTTAC-3'	300 nM

Tabela 3- Sequências e concentrações de iniciadores utilizados para amplificaçãodos genes estudados por RT-PCR em tempo real.

Padronização da concentração dos iniciadores e curvas de eficiência

Para realizar a verificação da concentração ideal de cada par de iniciadores foi realizada uma curva de concentrações de 150 nM, 300 nM, 400 nM, 600 nM e 800 nM, com o objetivo de obter o menor Ct com o maior sinal fluorescente. As concentrações escolhidas encontam-se na Tabela 3.

A eficiência de amplificação é obtida através da fórmula $10^{(-1/\text{slope})}$, onde *slope* é derivado da inclinação da curva e deve estar em torno de -3,32. Quando aplicado a fórmula de eficiência, o valor de $10^{(-1/\text{slope})}$ tem que ser próximo de 2, o que significa que a cada ciclo de amplificação o material genômico está sendo duplicado e isso equivale a 100% de eficiência (Meijerink *et al.*, 2001). Para observação da eficiência foi realizada curva de diluição na ordem de 1:10 com 6 pontos. Cada curva foi realizada em duplicata e a concentração inicial da amostra foi de 240 ng. Apenas os iniciadores considerados com ótima eficiência foram utilizados nas reações de PCR em tempo real. Na Figura 10 estão exemplificadas as curvas de eficiência para os genes *ARHGAP21*, *HPRT*, *PAI-1* e *BNIP3*.



Figura 10. Curvas de eficiência dos iniciadores desenhados para amplificação dos genes ARHGAP21, ABL, PAI-1 e BNIP3. A partir do *slope* obtido (-3,32), a eficiência destes iniciadores foi aproximadamente 100%. Estas curvas de eficiência foram realizadas para todos os iniciadores utilizados neste trabalho.

Avaliação do ciclo celular

A avaliação do ciclo celular foi realizada segundo protocolo descrito em Celis et al., 1998. As células foram coletadas e após centrifugação foram fixadas em etanol 70% e armazenadas em geladeira por um período mínimo de quatro horas. Após nova centrifugação, as amostras foram ressuspendidas em tampão específico para marcação do ciclo celular (0,1% triton, 10mg/mL idodeto de propídeo, 0,1mg/mL RNAse A), incubadas a 37°C por 15 minutos e submetidas a leitura em citômetro de fluxo. A marcação de cada condição (Controle e siRNA) foi feita em duplicata e a leitura foi realizada por citometria de fluxo e a análise com o programa ModFit.

Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi mensurada com o reagente 3-(4.5-dimethylthiazol-2-yl)-2.5diphenyltetrazolium bromide (MTT), (Sigma®). Possíveis diferenças na viabilidade celular podem ser em decorrência da diminuição da taxa de proliferação ou do aumento de morte celular. Resumidamente, 3 x 10^3 células controle ou com inibição da expressão de ARHGAP21 foram distribuídas em placas de 96 poços em meio RPMI 10% SBF. No dia seguinte, o meio foi trocado para RPMI contendo diferentes concentrações de SFB (10%, 5%, 1%. 0,1% e 0%). Parte das células cultivadas em meio RPMI 10% SBF foram tratadas com 25, 35 e 50 μ M de cisplatina. Foram realizados três experimentos independentes e cada condição foi testada seis vezes em cada experimento. Após 48 horas, adicionou-se 10 μ L do corante MTT (5 mg/mL) e as células foram novamente incubadas por mais 4 h. Em seguida, adicionou-se 100 μ L de uma solução de isopropanol 90% e ácido clorídrico 0,1N para solubilização dos cristais de formazan. As placas foram agitadas durante 5 minutos e a absorbância correspondente a cada amostra foi medida no leitor de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) a um comprimento de onda de 570 nm.

Ensaio de adesão celular

Ensaios de adesão celular foram realizados em placas de 96 poços de acordo com protocolo sugerido por Humphries, 2008. Resumidamente, 2,5 x 10^4 células controle ou com inibição de expressão de ARHGAP21 foram distribuídas nos poços diretamente em plástico ou previamente revestidos com fibronectina (10 e 20 µg/mL) ou matrigel (100 µg/mL) e então deixadas na estufa 37°C 5% CO₂ por um perído de cinco minutos. As placas foram então lavadas com PBS para remoção das células que não aderiram e as células aderidas foram fixadas com paraformoldeído 4% e coradas com solução de violeta cristal 1% por um período de 12 horas. Após este período, as placas foram lavadas cinco vezes com água destilada e o corante foi solubilizado com solução de ácido acético 10%. A absorbância de cada poço foi mensurada com espectofotômetro *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* a um comprimento de onda de 570 nm.

Ensaio de migração celular randômica

Ensaios de motilidade celular randômica foram realizados no laboratório da professora Anne Ridley da King's College London (Reino Unido) com o uso do microscópio *time lapse*, de acordo com protocolo pré-estabelecido por este laboratório. Os ensaios foram realizados em placas de cultura de 24 poços com células LNCaP e PC-3 submetidas à inibição de expressão de ARHGAP21 e células PC-3 com super-expressão desta proteína. Após 24 horas de transfecção, 10.000 células foram cultivadas em três diferentes condições: em plástico, 20 µg/mL de fibronectina ou 100 µg/mL matrigel. No dia seguinte, o meio das células foi trocado e a porcentagem de soro reduzida para 1%. As células foram então fotografadas a cada 5 minutos com o uso do microscópio *time lapse* por um período total de 14 horas. As fotos foram montadas com o programa MetaMorph. O movimento celular durante este período foi rastreado com o *plugin Manual Tracking* do programa ImageJ. Os cálculos de velocidade, distância percorrida e direcionalidade foram realizados com o *plugin Chemotaxis Tool*, também do programa ImageJ. Foram rastreadas um total de 100 células de cada condição.

Super-expressão de ARHGAP21 em células PC-3

A super-expressão de ARHGAP21 em células PC-3 foi realizada com *kit Cell Line Nucleofector V*, segundo as instruções do fabricante. Resumidamente, 10^6 células foram centrifugadas, ressuspendidas em 100μ L de *cell line nucleofector solution V* e transferidas para uma cubeta de eletroporação. Foram adicionados às células 5µg de plasmídeo pCMV6 Neo ou pCMV6 Neo-ARHGAP21 e elas foram eletroporadas no aparelho Nucleofector (Lonza) usando o programa T-013. As células foram imediatamente transferidas para placas de 6 poços contendo meio de cultura RPMI 10% SFB. Após 48 horas, a eficiência da transfecção foi avaliada por ensaios de RT-PCR em tempo real e western blot.

Transdução celular através de lentivírus

A linhagem PC-3 foi escolhida para a realização da inibição estável da expressão de ARHGAP21 para realização de ensaios de crescimento tumoral *in vivo*. Para inibição estável de ARHGAP21 foi utilizado um vetor lentiviral para a transdução do shRNA com a sequência de silenciamento específica para ARHGAP21 (senso: 5`GATCCCGTATTCGGC

CATGGAAACATTCAAGAGATGTTTCCATGGCCGAATACTTTTTTGGAAA3' e anti-senso: 5' AGCTTTTCCAAAAAAGTATTCGGCCATGGAAACATCTCTTGAATGT TTCCATGGCCGAATACGG 3'). O *kit* BLOCK-iT Lentiviral RNAi Expression System (Invitrogen) foi utilizado para a produção de vetores de lentivírus para a transferência do short hairpin RNA (shRNA) em células de mamífero. ShRNA é uma classe artificial de RNA que leva ao silenciamento gênico através da interação com componentes celulares comuns das vias de iRNA e miRNA. O sistema BLOCK-iT contém o vetor U6 RNAi para a produção do clone expressando a sequência de dupla fita do shRNA de interesse. A produção do vetor foi feita de acordo com as instruções do fabricante. O nível de biosegurança 2 é o sugerido para trabalhar com esses vetores, de acordo com o NIH (National Institutes of Health). Os lentivírus foram titulados na linhagem celular HT1080, que após 15 dias de seleção foi corada com violeta cristal e as colônias foram contadas nas diferentes diluições do lentivírus (Figura 11), gerando o MOI (número de partículas lentivirais por célula; *multiplcity of infection*).

Após a titulação, as células PC-3 foram transduzidas com um MOI equivalente a 2. Resumidamente, 2 x 10^5 células foram cultivadas em placas de 6 poços em meio RPMI 10% SFB. No dia seguinte, adicionou-se as partículas virais e 3µg/mL de volume final do reagente polybrene. A construção possui gene de resistência à blasticidina. A concentração da blasticidina utilizada para células PC-3 foi 10μ g/mL. Nesta concentração, todas as células sem transfecção morreram em um período de sete dias, enquanto as células transfectadas com lentivírus puderam ser selecionadas. Após seleção por 15 dias com blasticidina, as células foram coletadas e submetidas à investigação da expressão de ARHGAP21 por RT-PCR em tempo real e western blot.



Figura 11. Titulação dos lentivírus em células HT1080, coradas com violeta cristal. A: diluição 1:2, B: diluição 1:50, C: diluição1:100, D: diluição 1:1000, E diluição 1:10000 e F: ausência de lentivírus.

Ensaio para indução tumoral in vivo

Camundongos BALB/c nude fêmeas de 5 a 6 semanas de idade foram obtidos do Centro Multidiciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratórios (CEMIB) da UNICAMP. Um total de 10^6 células PC-3 controle ou shRNA ressuspendidas em 400µL de PBS foram inoculadas de forma subcutânea na parte dorsal dos animais. A partir do 9° dia após a injeção das células tumorais (quando os tumores ficaram palpáveis), os animais foram pesados e as dimensões tumorais foram medidas. Os diâmetros do tumor foram convertidos em volume (V) através da fórmula (V=W² x L x 0,52), onde W e L representam os valores do menor e maior diâmetro do tumor. O volume foi analisado em uma curva contra o tempo. Os animais foram sacrificados quando o tumor tornou-se ulcerativo ou incômodo para o animal (Figura 12).



Figura 12. Animal submetido à inoculação de células PC-3. Camundongos BALB/c nude que receberam inoculação de células PC-3 controle ou shRNA apresentaram desenvolvimento tumoral e foram sacrificados no 28º dia após a inoculação das células, quando o tumor tornou-se incômodo para o animal.

Análise Estatística

A comparação dos valores provenientes dos ensaios de viabilidade, ciclo celular, adesão e migração foi realizada através do teste estatístico de *Student T*. Valor de $P \le 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo. Foram realizados três experimentos independentes para cada ensaio.

RESULTADOS

Experimentos com células HEK 293T

Os experimentos de GST-Pull Down para avaliação da atividade RhoGAP de ARHGAP21 foram realizados em células HEK 293T com super-expressão de ARHGAP21 pois estas células são facilmente transfectáveis. Células HEK 293T apresentam baixa expressão basal de ARHGAP21, o que as torna adequadas para a realização de experimentos de super-expressão. Os experimentos de GST-Pull Down para avaliar as atividades de RhoA e Cdc42 também foram realizados nas células HUVECs e LNCaPs submetidas à inibição da expressão de ARHGAP21. Não foi possível detectar a atividade de RhoA nestas duas linhagens através dos ensaios de GST-Pull Down, apesar de ter sido detectada sua expressão, indicando que existe atividade de RhoA nestas duas linhagens. A atividade de Cdc42, por sua vez, foi detectada, mas não foi modulada em células HUVECs e LNCaP submetidas à inibição de ARHGAP21 (Apêndice IV).

1. Avaliação da atividade RhoGAP de ARHGAP21 em células HEK 293T através de ensaios de GST-Pull Down

1.1. Super-expressão de ARHGAP21 em células HEK 293T

Ensaios de GST-Pull Down foram realizados em células HEK 293T transfectadas com o vetor pCMV6 Neo-ARHGAP21 ou com vetor pCMV6 Neo (vetor vazio). Como controle para efetividade do experimento, ensaios de GST-Pull Down para a detecção das atividades de RhoA, RhoB e RhoC também foram realizados em extratos protéicos de HEK 293T submetidas à super-expressão da proteína p190 RhoGAP, pois já foi descrito que esta proteína regula as atividades de RhoA, RhoB e RhoC (Wang et al., 2003). Resultados de Western Blot com extratos protéicos provenientes das células controle e com super-expressão de ARHGAP21 mostraram aumento de expressão protéica de uma banda no tamanho de 250 kDa. Um aumento na expressão protéica de uma banda no tamanho de 190 kDa foi observado nas células com super-expressão da proteína p190 RhoGAP. A expressão da proteína GAPDH demonstrou que foram aplicadas as mesmas quantidades de extratos protéicos no gel de poliacrilamida (Figura 13).



Figura 13. Super-expressão das proteínas ARHGAP21 e p190 RhoGAP em células HEK 293T. Os extratos protéicos provenientes de células HEK 293T com super-expressão de ARHGAP21 e p190 RhoGAP foram submetidos à ensaio de Western Blot em gel de poliacrilamida 8%. Extratos protéicos de células transfectadas com vetor vazio foram utilizados como controle. Note um aumento na expressão das bandas nos tamanhos esperados de 250 kDa e 190 kDa, quando as membranas de nitrocelulose foram incubadas com anticorpos específicos para detecção de ARHGAP21 e p190 RhoGAP, respectivamente. A expressão da proteína GAPDH demonstra que foram aplicadas as mesmas quantidades de extratos protéicos no gel de poliacrilamida.

1.2. ARHGAP21 possui atividade RhoGAP para RhoA e RhoC, mas não para RhoB em células HEK 293T

Os estudos de GST-Pull Down para detecção da atividade de RhoA revelaram uma diminuição da atividade desta proteína em células HEK 293T com super-expressão de ARHGAP21 em comparação às células controle (transfectadas com o vetor vazio). Extratos protéicos provenientes de células com super-expressão de p190 RhoGAP foram utilizados para confirmar a efetividade dos experimentos (Figura 14).



Figura 14. ARHGAP21 diminui a atividade de RhoA em células HEK 293T. Ensaios de GST-Pull Down com o domínio de ligação a Rho da proteína efetora Rhotekin (TRBD-GST) foram realizados para avaliar a atividade de RhoA. Note a diminuição na atividade de RhoA nas células com super-expressão de ARHGAP21 comparadas às células transfectadas com vetor vazio (controle). Células HEK 293T com super-expressão de p190 RhoGAP foram utilizadas como controle da eficiência do ensaio.

A princípio, não foi possível detectar a atividade das proteínas RhoB e RhoC nas células HEK 293T. Desta forma, com o objetivo de aumentar a atividade destas duas proteínas, foram realizadas co-transfecções dos vetores pCDNA3 RhoB-GFP ou pCDNA3 RhoC-GFP, juntamente com os vetores pCMV6 Neo-ARHGAP21 ou pCMV6 Neo (vetor vazio). Nestes casos, um anticorpo específico para a detecção da proteína GFP foi utilizado no ensaio de Western Blot.

A atividade de RhoB não foi alterada nas células HEK 293T com super-expressão de ARHGAP21 em relação às células controle. A diminuição da atividade de RhoB em células HEK 293T com super-expressão de p190 RhoGAP comprovaram a eficiência do ensaio (Figura 15).





A atividade de RhoC, por sua vez, foi reduzida nas células HEK 293T com superexpressão de ARHGAP21 em relação às células controle. Como controle da eficiência dos ensaios, foi realizada a avaliação da atividade de RhoC em células HEK 293T com superexpressão de p190 RhoGAP ou com expressão de RhoC na forma constitutivamente inativa (Figura 16).



Figura 16. ARHGAP21 diminui a atividade de RhoC em células HEK 293T. Ensaios de GST-Pull Down com o domínio de ligação a Rho da proteína efetora Rhotekin (TRBD-GST) foram realizados para avaliar a atividade de RhoC em células HEK 293T co-transfectadas com vetores para super-expressão das proteínas ARHGAP21 e RhoC. Observe que a atividade de RhoC nas células com super-expressão de ARHGAP21 foi menor que nas células transfectadas com vetor vazio. Extratos protéicos de HEK 293T com super-expressão das proteínas p190 RhoGAP ou RhoC na forma constitutiamente inativa (RhoC inativo) foram utilizados para avaliar a efetividade dos ensaios.

1.3. ARHGAP21 não possui atividade RhoGAP para Rac1 e Cdc42 em células HEK 293T

Ensaios de GST-Pull Down revelaram que não houve diferenças nas atividades de Rac1 e Cdc42 nas células HEK 293T com super-expressão de ARHGAP21 comparadas às células HEK 293T controle. A efetividade dos experimentos foi comprovada pelo aumento das atividades de Rac1 e Cdc42 nas células transfectadas com os vetores para expressão das formas constitutivamente ativas destas duas proteínas (Figura 17).



Figura 17. ARHGAP21 não altera as atividades de Rac1 e Cdc42 em células HEK 293T. Ensaios de GST Pull Down com os domínios de ligação a Rho GTPases das proteínas efetoras PAK1 (A) e Wasp (B) foram realizados para avaliar a atividade de Rac1 e Cdc42, respectivamente. Observe que não houve diferença nas atividades de Rac1 e Cdc42 nas células HEK 293T com super-expressão de ARHGAP21 comparadas às celulas HEK 293T transfectadas com vetor vazio. Extratos protéicos de células HEK 293T com super-expressão das formas constitutivamente ativas de Rac1-GFP e Cdc42-GFP foram utilizados para comprovar a eficiência dos ensaios.

1.4. Alteração fenotípica em células HEK 293T com super-expressão de ARHGAP21

Células HEK 293T com super-expressão de ARHGAP21 apresentaram diferenças morfológicas quando comparadas às células HEK 293T controle. Após a super-expressão de ARHGAP21, as células apresentaram um aspecto mais arredondado e com algumas protrusões, enquanto as células controle mantiveram sua morfologia epitelial. Interessantemente, este fenótipo foi semelhante ao fenótipo observado após a super-expressão de p190 RhoGAP (Figura 18).



Figura 18. Alteração fenotípica em células HEK 293T com super-expressão de ARHGAP21. As células com super-expressão de ARHGAP21 ficaram mais redondas e apresentaram algumas protrusões (seta), quando comparadas às células controle, que mantiveram a morfologia epitelial. Este fenótipo foi semelhante ao fenótipo observado em HEK 293T com super-expressão de p190 RhoGAP.

A seguir, descreveremos os resultados obtidos com células endoteliais HUVECs

2. ARHGAP21 localiza-se no núcleo e citoplasma de células HUVECs

O estudo por imunofluorescência e microscopia confocal revelou que a proteína ARHGAP21 está presente no núcleo e citoplasma de células HUVECs (Figura 19).


Figura 19. ARHGAP21 localiza-se no núcleo e citoplasma de células HUVECs. A localização celular de ARHGAP21 foi investigada em células HUVECs com o anticorpo anti-ARHGAP21 conjugado com Alexa 488 (fluorescência verde). DAPI foi utilizado para visualização do núcleo (fluorescência azul). A reação de imunofluorescência foi visualizada em microscópio confocal a laser (Zeiss LM510). Note que a sobreposição das duas imagens indica a localização nuclear e citoplasmática de ARHGAP21.

3. Inibição da expressão de ARHGAP21 em células HUVECs

Através de ensaios de PCR em tempo real e western blot, verificamos a efetividade da transfecção com *siRNA ARHGAP21 ON-TARGETplus* em células HUVECs (siRNA ARHGAP21). Em comparação às células transfectadas com *siRNA ON-TARGETplus Non-targeting Pool* (controle), houve diminuição na expressão de ARHGAP21 de aproximadamente 80% por PCR em tempo real e 70% por western blot nas células siRNA ARHGAP21 (Figura 20).



Figura 20. Inibição da expressão de ARHGAP21 em células HUVECs. Experimentos de RT-PCR em tempo real (A) e Western Blot (B) foram utilizados para se testar a eficiência do método de inibição da expressão de ARHGAP21 através do uso de siRNA. Observe a diminuição da expressão gênica e protéica nas células submetidas à inibição da expressão de ARHGAP21 (siRNA ARHGAP21) em comparação às células controle. Os valores de expressão gênica foram normalizados pelo controle, considerado como 1.

4. Expressão gênica global em células HUVECs com inibição da expressão de ARHGAP21

Uma abordagem usual na busca da função de novos genes é o seu silenciamento seguido da averiguação de possíveis alterações gênicas associadas à ausência de sua expressão, através das técnicas de microarranjos de DNA. A seguir descreveremos os resultados obtidos com os ensaios de microarranjos de DNA em células HUVECs.

4.1. Análise da qualidade de RNA

Os ensaios de microarranjos de DNA em HUVECs foram realizados com RNAs obtidos a partir de duas transfecções independentes. Através da análise com *o Software 2100 Express*, o *RNA Integrity Number* (RIN) dos RNAs foram superiores a 9, sendo que 7

é o valor considerado como *cut-off* para determinar a qualidade do RNA em experimentos de microarranjos de DNA (Figura 21).



Figura 21. Eletroferograma demonstrando os picos de RNA ribossomais 18S e 28S das amostras de RNA de duas transfecções independentes em células HUVECs (1 e 2). As quatro amostras obtiveram o número de integridade do RNA (RIN) maior que 7, que indicam boa qualidade para utilização nos experimentos de microarranjos de DNA.

4.2. Análise da reprodutibilidade das lâminas

Cada amostra foi utilizada em duplicata e a reprodutibilidade das lâminas está ilustrada na Figura 22. Níveis de *background* e controles de hibridização estavam dentro do limite aceitável.



Figura 22. Reprodutibilidade de dados de microarranjos de DNA (41.000 transcritos). Os experimentos de microarranjos de DNA em células HUVECs foram realizados em duplicata com RNAs provenientes de duas transfecções independentes. Em A e C estão representadas as lâminas hibridizadas com RNA das células HUVECs controle, enquanto em B e D estão representadas as lâminas hibridizadas com RNA das células com RNA das células siRNA ARHGAP21. No eixo x estão os valores (log) das intensidades de expressão gênica e em y (log) dos dados relativos à sua réplica técnica. Pearson > 0.95.

4.3. Agrupamento funcional dos genes diferencialmente expressos em células HUVECs submetidas à inibição de expressão de ARHGAP21

Considerando-se um limite de corte (*cut-off*) de *fold change* = 1,4 para os genes mais expressos e de 0,6 para os genes menos expressos, a análise pelo SAM revelou 153 genes diferencialmente expressos, sendo 138 mais expressos e 15 menos expressos nas células HUVECs com inibição de expressão de ARHGAP21 comparadas às células controle (Apêndice I).

Esses genes foram agrupados de acordo com suas funções celulares. Há diversos programas disponíveis para fazer este agrupamento, alguns são curados, porém nenhum deles substitui o bom senso do pesquisador, que pode averiguar também as informações

recentemente divulgadas sobre determinada proteína e assim fazer conclusões e relações de acordo com seu próprio estudo e conhecimento prévio. Desta forma, as informações referentes a todos os genes modulados nos ensaios de microarranjos foram pesquisadas de acordo com a base de dados do *ncbi (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)* e *ensembl (http://www.ensembl.org/idex.html)*.

O agrupamento realizado com os resultados dos microarranjos de DNA em HUVECs pode ser visualizado na Figura 23.



Figura 23. Agrupamento de genes modulados nos ensaios de microarranjos de DNA em HUVECs. Através da análise realizada com o SAM, foi observado um total de 138 genes mais expressos e 15 genes menos expressos nas células HUVECs com inibição da expressão de ARHGAP21 em comparação às células controle. Para uma melhor comprensão das possíveis funções de ARHGAP21, estes genes foram agrupados de acordo com suas principais funções. Um maior número de genes estava relacionado às funções de fatores de transcrição (18 genes), adesão/migração (13 genes) e proliferação/ciclo celular (11 genes). Alguns genes foram incluídos em mais de um grupo, por possuírem mais de uma função, enquanto os genes com função ainda desconhecida não estão representados no gráfico.

4.4 HEAT map dos resultados obtidos nos microarranjos de DNA com células HUVECs

Com o objetivo de se obter uma melhor visualização dos genes diferencialmente expressos, os resultados de microarranjo de DNA em HUVECs foram analisados em um gráfico *Heat Map* com o uso do programa SAM, utilizando-se uma taxa de falsa descoberta de 10%. Os genes cuja expressão nas amostras submetidas à inibição de ARHGAP21 foi aumentada estão representados em vermelho, enquanto os genes diminuídos estão representados em verde. Foi realizado agrupamento de acordo com a expressão (Figura 24). Nas duas primeiras colunas estão representados os resultados da duplicata dos ensaios de microarranjo de DNA encontrados em uma transfecção (Controle 1 X siRNA 1) e nas duas últimas colunas estão representados os genes diferencialmente expressos encontrados na segunda transfecção (Controle 2 X siRNA 2).



Figura 24. *Heat map* dos genes diferencialmente expressos em células HUVECs submetidas à inibição da expressão de ARHGAP21, em comparação às células controle. Os genes cuja expressão nas amostras submetidas à inibição de ARHGAP21 foi aumentada estão representados em vermelho, enquanto os genes diminuídos estão representados em verde. Os ensaios de microarranjos foram realizados em duplicata com amostras provenientes de duas transfecções. Nas duas primeiras colunas estão representados os resultados dos ensaios de microarranjo de DNA encontrados em uma transfecção (Controle 1 X siRNA 1) e nas duas últimas colunas estão representados os genes diferencialmente expressos encontrados na segunda transfecção (Controle 2 X siRNA 2). Foi realizado agrupamento de acordo com a expressão de cada gene.

5. Validação dos genes encontrados nos experimentos de microarranjos de DNA com células HUVECs por RT-PCR em tempo real

5.1. Escolha dos genes

Observamos em nossos experimentos com células HEK 293T que a proteína ARHGAP21 regula negativamente as atividades de RhoA e RhoC. Além disso, descobertas recentes têm evidenciado funções de ARHGAP21 na adesão e migração celular. Nosso grupo recentemente descreveu a interação de ARHGAP21 com a proteina tirosina quinase de adesão focal (FAK), em cardiomiócitos (Borges et al., 2008). Outros resultados obtidos em nosso laboratório sugerem o envolvimento de ARHGAP21 no processo de migração e invasão celular: a inibição de ARHGAP21 em linhagem de gliobastoma humano T98G resultou no aumento do percentual migratório e secreção de metaloprotease-2 (Bigarella et al., 2009). Estes dados, bem como o *fold change* de cada gene observado nos ensaios de microarranjos de DNA, foram importantes na escolha dos genes modulados nos ensaios de microarranjos para a validação por PCR em tempo real.

5.2. A inibição de ARHGAP21 induz o aumento da expressão de PAI-1, PODXL, FRZB, FGF18, SMURF2, BNIP3, STC1 e HMGA2, em células HUVECs

O aumento de expressão dos genes *PAI-1*, *PODXL*, *FRZB*, *FGF18*, *SMURF2*, *BNIP3*, *STC1* e *HMGA2* nas células HUVECs com inibição de expressão de ARHGAP21 observado nos ensaios de microarranjos de DNA foi confirmado por RT- PCR em tempo real (Figura 25). A expressão gênica de *TRAF1*, *ELK3*, *NEK7* e *IGFBP2* foi testada por RT- PCR em tempo real, mas não confirmou os resultados de microarranjos de DNA. A descrição das princiapias funções de PAI-1, PODXL, FRZB, FGF18, SMURF2, BNIP3, STC1 e HMGA2 encontra-se no Apêndice V.



Figura 25. Alteração da expressão de PAI-1, PODXL, FRZB, FGF18, SMURF2, BNIP3, STC1 e HMGA2 em células HUVECs submetidas à inibição da expressão de ARHGAP21, em comparação às células controle. Barras azul-escuras representam a alteração encontrada nos microarranjos de DNA e as barras brancas representam a alteração encontrada por RT-PCR em tempo real. Note que o aumento de expressão dos genes PAI-1, PODXL, FRZB, FGF18, SMURF2, BNIP3, STC1 e HMGA2 nas células HUVECs com inibição de expressão de ARHGAP21 observado nos ensaios de microarranjos foi confirmado por RT-PCR em tempo real.

6. A inibição de ARHGAP21 induz alteração no ciclo celular de células HUVECs

Com o objetivo de avaliar se a inibição de ARHGAP21 teria algum efeito no ciclo celular, as diferentes fases do ciclo foram avaliadas nas células HUVECs após inibição da expressão de ARHGAP21. Nas células submetidas à inibição de expressão de ARHGAP21, houve aumento de aproximadamente 10% das células nas fases G0-G1 e diminuição nas Fases S (6%) e G2 – M (4%) (Figura 26).



Figura 26. A inibição de ARHGAP21 induz alteração no ciclo celular de células HUVECs. O ciclo celular foi avaliado em células HUVECs controle ou submetidas à inibição de ARHGAP21, (siRNA ARHGAP21). As porcentagens de células em diferentes fases do ciclo celular (G0/G1, S, G2/M) estão indicadas no gráfico. Note que a inibição de ARHGAP21 resulta em uma maior porcentagem de células na fase G2-M (média = 59,02% \pm 0,48) comparadas às células controle (média = 49,11 \pm 1,44).

A seguir, descreveremos os resultados obtidos com linhagens celulares de adenocarcinoma de próstata (DU145, LNCaP e PC-3).

7. ARHGAP21 é expressa em linhagens celulares de adenocarcinoma de próstata

Antes de dar início aos experimentos com células de adenocarcinoma de próstata, a expressão de ARHGAP21 foi verificada nas linhagens celulares LNCaP, DU145 e PC-3 através de ensaios de western blot. Observamos que ARHGAP21 é expressa nas três linhagens (Figura 27).



Figura 27. ARHGAP21 é expressa em células LNCaP, DU145 e PC-3. A expressão de ARHGAP21 em linhagens de adenocarcinoma de próstata foi verificada por western blot. Observe que ARHGAP21 é expressa nas três linhagens celulares.

8. ARHGAP21 localiza-se no núcleo e citoplasma de células LNCaP e PC3

O estudo por microscopia confocal revelou que ARHGAP21 está presente no núcleo e citoplasma de células LNCaP e PC-3 (Figura 28).



Figura 28. ARHGAP21 localiza-se no núcleo e citoplasma de células LNCaP e PC-3. A localização celular de ARHGAP21 foi investigada com o anticorpo anti-ARHGAP21 conjugado com Alexa 488 (fluorescência verde). DAPI foi utilizado para visualização do núcleo (fluorescência azul). A reação de imunofluorescência foi visualizada em microscópio confocal a laser (Zeiss LM510). Note que a sobreposição das duas imagens indica a localização nuclear e citoplasmática de ARHGAP21 nas duas linhagens celulares.

9. Inibição da expressão de ARHGAP21 em células LNCaP e PC-3

Através dos ensaios de PCR em tempo real e western blot, verificamos a inibição da expressão gênica e protéica de ARHGAP21 nas células LNCaP e PC-3 submetidas à transfecção com *siRNA ARHGAP21 ON-TARGETplus* (siRNA ARHGAP21) em comparação as células transfectadas com *siRNA ON-TARGETplus Non-targeting Pool* (controle). Em ambas as linhagens, houve diminuição na expressão de ARHGAP21 de aproximadamente 80% por PCR em Tempo Real e western blot (Figura 29).



Figura 29. Inibição da expressão de ARHGAP21 em células LNCaP e PC-3. Ensaios de RT-PCR em tempo real (A) e western blot (B) foram realizados para verificar a efetividade da inibição de ARHGAP21 através do uso de siRNAs nas linhagens LNCaP e PC-3. Em ambas as linhagens, observamos redução de aproximadamente 80% na expressão gênica e protéica de ARHGAP21 nas células submetidas à transfecção para inibição da expressão desta proteína (siRNA ARHGAP21) em comparação às células controle.

10. Expressão gênica global em células LNCaP com inibição da expressão de ARHGAP21

10.1. Análise da qualidade do RNA

A qualidade dos RNAs extraídos de células LNCaP também foi averiguada com o equipamento Agilent 2100 Eletrophoresis Bioanalyser (Agilent Technologies) e obtiveram um RIN de 9,6 e 9,3 para LNCaP Controle e LNCaP siRNA, respectivamente (Figura 30).



Figura 30. Eletroferograma demonstrando os picos de RNA ribossomais 18S e 28S das amostras de RNA de células LNCaP controle e submetidas à inibição de expressão de ARHGAP21 (siRNA ARHGAP21). A amostra de RNA total proveniente das células LNCaP controle obtiveram um RIN igual a 9,6, enquanto a amostra proveniente das células LNCaP siRNA obtiveram um RIN de 9,3.

10.2. Análise da reprodutibilidade das lâminas

Os níveis de *background* e controles de hibridização das lâminas utilizadas nos ensaios de microarranjos de DNA com células LNCaPs estavam dentro do limite aceitável. O coeficiente de correlação de Pearson entre as duplicatas técnicas foi superior a 0,95 (Figura 31).





10.3. Agrupamento funcional dos genes diferencialmente expressos em células LNCaP submetidas à inibição da expressão de ARHGAP21

A análise de expressão diferencial pelo método HTself revelou modulação na expressão de 69 genes, sendo que 63 genes foram considerados mais expressos e 6 genes menos expressos nas células LNCaP com inibição da expressão de ARHGAP21. Estes genes foram agrupados de acordo com suas principais funções (Figura 32).



Figura 32. Agrupamento de genes modulados nos ensaios de microarranjos de DNA em células LNCaP. Através da análise realizada com o método HT self, observou-se um total de 63 genes mais expressos e 6 genes menos expressos na células LNCaPs com inibição da expressão de ARHGAP21 em comparação às células controle. Para uma melhor compreensão das possíveis funções de ARHGAP21, estes genes foram agrupados de acordo com suas principais funções. Um maior número de genes modulados após a inibição de ARHGAP21 estava relacionado às funções de proliferação/ciclo celular (16 genes), hipóxia (12 genes) e adesão/migração (2 genes). Alguns genes foram incluídos em mais de um grupo, por possuírem mais de uma função, enquanto os genes com função ainda desconhecida não estão representados no gráfico.

11. Validação dos genes encontrados nos experimentos de microarranjos de DNA com células LNCaP por RT-PCR em tempo real

Experimentos de microarranjo de DNA e RT-PCR em tempo real mostraram modulação da expressão gênica de *PODXL*, *BNIP3* e *STC1* em células HUVECs com inibição da expressão de ARHGAP21. Estes genes também foram modulados em LNCaP submetidas à inibição da expressão de ARHGAP21 (Apêndice III) e foram escolhidos para validação dos resultados de microarranjo por RT-PCR em tempo real, juntamente com o gene TGF-beta induced (TGFBI).

Resultados de RT-PCR em tempo real confirmaram o aumento de expressão dos genes *PODXL*, *TGFBI*, *BNIP3* e *STC1* nas células LNCaP submetidas à inibição de ARHGAP21, comparadas às células controle (Figura 33).

Ensaios de microarranjos de DNA em células LNCaP mostraram modulação da expressão gênica de *TGF- beta 2*, mas a validação por RT-PCT em tempo real não confirmaram os resultados dos ensaios de microarranjos.



Figura 33. Alteração da expressão de *PODXL*, *TGFBI*, *BNIP3* e *STC1* em células LNCaP submetidas à inibição da expressão de ARHGAP21, em relação às células controle. Barras azul-escuras representam a alteração encontrada nos microarranjos de DNA e as barras em branco representam a alteração encontrada por RT-PCR em tempo real. Note que o aumento de expressão de *PODXL*, *TGFBI*, *BNIP3* e *STC1*, observado nos ensaios de microarranjo foi confirmado por RT-PCR em tempo real.

A descrição das principais funções de TGFBI encontra-se no Apêndice V.

12. A inibição de ARHGAP21 induz o aumento da expressão de PODXL e BNIP3 em células PC-3

A expressão dos genes modulados em LNCaP submetidas à inibição da expressão de ARHGAP21 também foi estudada em células PC-3 com inibição de ARHGAP21. Em células PC-3, a inibição de ARHGAP21 induziu a expressão dos genes PODXL e BNIP3, mas não alterou a expressão dos genes TGFBI e STC1 (Figura 34).



Figura 34. Expressão gênica de *PODXL, TGFBI, BNIP3* e *STC1* em células PC-3 com inibição de expressão de ARHGAP21. A expressão de cada gene em células PC-3 submetidas à inibição de ARHGAP21 (barras vermelhas) foi normalizada pela sua expressão nas células controle, considerada como 1 (barras azuis). Note o aumento de expressão dos genes *PODXL* (5,6 vezes) e *BNIP3* (1,45 vezes) nas células PC-3 submetidas à inibição da expressão de ARHGAP21 (siRNA ARHGAP21). A expressão gênica de TGFBI e STC1 não foi modulada nas células PC-3 com inibição de ARHGAP21.

13. Análise da expressão de PODXL, TGFBI, BNIP3 e STC1 em células LNCaP super-expressando RhoA e RhoC

Nos ensaios de GST-Pull Down com células HEK 293T, observamos que ARHGAP21 inibe a atividade de RhoA e RhoC. Desta forma, inferimos que a atividade de RhoA e RhoC está aumentada nas células com inibição de ARHGAP21. Com o objetivo de investigar se o aumento da expressão gênica de *PODXL*, *TGFBI*, *BNIP3* e *STC1* observada nas células LNCaP siRNA era devido a uma maior atividade de RhoA e RhoC, resolvemos investigar a expressão destes genes em células LNCaP com super-expressão de RhoA ou RhoC.

Células LNCaP foram transfectadas com os vetores pEGFP (células controle), pCDNA3 RhoA-GFP ou pCDNA3 RhoC-GFP. A eficiência da transfecção foi confirmada por Western Blot, utilizando-se anticorpo anti-GFP (Figura 35).



Figura 35. Super-expressão das proteínas RhoA e RhoC em células LNCaP. Extratos protéicos provenientes de células LNCaP transfectadas com o vetor para expressão de GFP (controle), RhoA-GFP e RhoC-GFP foram submetidos a ensaio de Western Blot em gel de poliacrilamida 12%. As membranas de nitrocelulose foram incubadas com anticorpos anti-GFP. Note a presença da expressão de GFP nas células trasfectadas com vetor pEGFP (27 kDa) e nas células com super-expressão de RhoA-GFP e RhoC-GFP (banda de 50 kDa).

A expressão de *PODXL*, *TGFBI*, *BNIP3* e *STC1* foi então analisada em células LNCaP com super-expressão de RhoA ou RhoC. A expressão de *PODXL* foi reduzida nas células com super-expressão de RhoC (36%) e não mudou nas células com super-expressão de RhoA. A expressão de *TGFBI* foi aumentada nas células com super-expressão de RhoA e RhoC (1,8 e 1,7 vezes, respectivamente). A expressão de *BNIP3* foi aumentada 1,4 vezes nas células com super-expressão de RhoA, mas não mudou nas células com super-expressão de RhoA, mas não mudou nas células com super-expressão de RhoA, mas não mudou nas células com super-expressão de RhoA, mas não mudou nas células com super-expressão de RhoA, mas não mudou nas células com super-expressão de RhoA, mas não de RhoC (Figura 36).



Figura 36. Expressão gênica de *PODXL*, *TGFBI*, *BNIP3* e *STC1* em células LNCaP com super-expressão de RhoA e RhoC. A expressão dos genes modulados em LNCaP siRNA foi verificada nas células LNCaP com super-expressão de RhoA e RhoC. Barras pretas representam a expressão gênica nas células controle e as barras azuis e vermelhas reapresentam a expressão dos genes nas células com super-expressão de RhoA e RhoC, respectivamente. A expressão de cada gene foi normalizada pela sua expressão nas células controle, considerada como 1. Note a maior expressão de *TGFBI* nas células com super-expressão de RhoA e RhoC em comparação com às células controle. Também foi observada uma maior expressão de *BNIP3* e *STC1* nas células com super-expressão de RhoA, comparadas às células controle. A expressão de *PODXL* foi reduzida nas células com super-expressão de RhoA.

Em conclusão, em células LNCaP, a super-expressão de RhoA induz aumento da expressão de TGFBI, BNIP3 e STC1, à semelhança da inibição da expressão de ARHGAP21. A super-expressão de RhoC induz o aumento da expressão de TGFBI, também de forma similar à inibição de ARHGAP21.

14. A inibição de ARHGAP21 induz redução na viabilidade de células PC3

Para avaliar uma possível função de ARHGAP21 na viabilidade celular, realizamos ensaios de viabilidade em células PC-3 com inibição da expressão de ARHGAP21. Como o soro fetal bovino é um agente indutor de proliferação celular, o experimento foi realizado em células estimuladas com diferentes concentrações de SFB (10%, 5%, 1%. 0,1% e 0%). Parte das células cultivadas em meio RPMI 10% SBF foram tratadas com 25, 35 e 50 µM de cisplatina, um agente quimioterápico que reduz a viabilidade de células PC-3 (Sánchez et al., 2009). As absorbâncias obtidas foram transformadas em porcentagem. O experimento foi realizado em triplicata e os valores foram normalizados pela média dos resultados obtidos com as células controle em meio de cultura com 10% SBF, considerado como 100%. Observamos redução de aproximadamente 28% na viabilidade das células PC-3 submetidas à inibição da expressão de ARHGAP21 em comparação com às células controle, quando cultivadas em meio de cultura suplementado com 10% e 5% SBF. Esta diminuição foi próxima à redução induzida pelo tratamento com as doses de 25, 35 e 50µM de cisplatina (redução de 35%). Conforme era esperado, observamos redução da viabilidade das células cultivadas com menores concentrações de soro. Quando cultivadas na ausência de SBF, as células com inibição de ARHGAP21 apresentaram uma redução na viabilidade de aproximadamente 14% em relação às células controle. Interessantemente, quando as células PC-3 com inibição da expressão de ARHGAP21 foram tratadas com cisplatina observamos um efeito adicional na redução da viabilidade. As células com inibição de ARHGAP21 tratadas com 25 e 35 µM de cisplatina tiveram uma redução na viabilidade de aproximadamente 47%, e quando tratadas com 50 µM de cisplatina tiveram uma redução de 56% (Figura 37).



Figura 37. A inibição de ARHGAP21 induz redução na viabilidade de células PC-3. Ensaios de viabilidade foram realizados com células PC-3 controle (barras azuis) e células PC-3 submetidas à inibição da expressão de ARHGAP21 (siRNA ARHGAP21) (barras vermelhas). Observe a redução na viabilidade das células com inibição de ARHGAP21 em comparação às células controle quando cultivadas com 10%, 5% e 0% SFB. Esta redução foi similar à redução induzida pelo tratamento com cisplatina. Quando as células submetidas à inibição de ARHGAP21 foram tratadas com cisplatina observamos uma redução na viabilidade ainda maior que a redução induzida apenas com a depleção de ARHGAP21 ou com o tratamento com a droga.

15. A inibição de ARHGAP21 induz redução na adesão de células LNCaP

Para verificar uma possível função de ARHGAP21 na adesão celular, a adesão das células LNCaP foi avaliada em plástico, matrigel e fibronectina. Observamos uma diminuição na adesão das células submetidas à inibição de ARHGAP21 em matrigel e fibronectina em comparação às células controle (Figura 38).



Figura 38. A inibição de ARHGAP21 resulta na redução na adesão de células LNCaP. Ensaios de adesão foram realizados em células LNCaP controle e submetidas à inibição de ARHGAP21 (siRNA ARHGAP21). A adesão celular foi verificada em plástico (barras azuis), matrigel (barras vermelhas) e fibronectina (barras verdes). Observe a menor adesão ao matrigel e à fibronectina das células com inibição de ARHGAP21 em comparação às células controle.

16. A inibição de ARHGAP21 altera a migração de células PC-3

Com o objetivo de verificar possíveis funções da proteína ARHGAP21 na motilidade celular, ensaios de migração foram realizados em células LNCaP e PC-3 com inibição da expressão de ARHGAP21. Células PC-3 são as células mais utilizadas no laboratório da profa. Anne Ridley para este tipo de ensaio, pois, ao contrário das células LNCaP, elas se distribuem de maneira independente nas placas, sem formar grumos (Figura 39).



Figura 39. Morfologia das células PC-3 e LNCaP. Observe que as células PC-3 se distribuem de maneira mais independente em cultura, sendo mais propícias para ensaios de migração celular randômica (A). As células LNCaP, por sua vez, tendem a formar grupos (B).

Com o uso do programa Image J, foram calculadas a velocidade, a distância percorrida e a direcionalidade de migração celular.

16.1. A inibição de ARHGAP21 induz a diminuição da velocidade de migração das células PC-3 em fibronectina

A velocidade das células PC-3 com inibição de ARHGAP21 em fibronectina foi diminuída em relação às células controle. A média foi $0,52 \pm 0,21$ e $0,35 \pm 0,25$ µm/min para controle e células com redução da expressão de ARHGAP21, respectivamente (valor d p = 0,0431, teste *student t*). Não foram observadas diferenças entre as velocidades de migração das células PC-3 controle e com inibição de ARHGAP21 cultivadas em plástico ou matrigel. (Figura 40A). Com relação às células LNCaP, não houve diferença entre as células controle e com inibição de ARHGAP21 nos três substratos estudados (Figura 40B).



Figura 40. A inibição de ARHGAP21 induz redução da velocidade de migração de células PC-3 em fibronectina. Ensaios de migração foram realizados em células PC-3 e LNCaP controle e com inibição da expressão de ARHGAP21 (siRNA ARHGAP21) em plástico (em azul), matrigel (em vermelho) e fibronectina (em verde). Note uma menor velocidade das células PC-3 com inibição de ARHGAP21 em fibronectina em relação às células controle (A). A média foi $0,52 \pm 0,21$ e $0,35 \pm 0,25$ µm/min para controle e siRNA ARHGAP21, respectivamente. Não houve diferença estatística nas velocidades das células LNCaP nos três substratos testados (B).

16.2. A inibição de ARHGAP21 induz a diminuição da distância percorrida pelas células PC-3 em fibronectina

A distância percorrida pelas células PC-3 transfectadas com siRNA para inibição de ARHGAP21 também foi menor em fibronectina. A média da distância acumulada foi $436,968 \pm 177,28 = 276,31 \pm 181,68 \text{ (p=0,0176)}$ e da distância euclidiana foi $91,065 \pm 56,152 = 56,823 \pm 35,209 \text{ (p=0,0012)}$ para as células controle e com inibição da expressão de ARHGAP21, respectivamente. Em plástico e matrigel, não houve diferenças entre as distâncias percorridas pelas células PC-3 controle e com diminuição da expressão de ARHGAP21. (Figura 41A e B). Não observamos diferenças nas distâncias percorridas entre as células LNCaP controle e com inibição da expressão de ARHGAP21 (Figura 41A e D).



Figura 41. A inibição de ARHGAP21 induz redução na distância percorrida de células PC-3 em fibronectina. Ensaios de migração foram realizados em células PC-3 e LNCaP controle e com inibição da expressão de ARHGAP21 (siRNA ARHGAP21) em plástico (em azul), matrigel (em vermelho) e fibronectina (em verde). As distâncias acumulada e euclidiana das células PC-3 com inibição de ARHGAP21 em fibronectina foram menores em relação ao controle. A média da distância acumulada foi 436,968 \pm 177,28 e 276,31 \pm 181,68 e da distância euclidiana foi 91,065 \pm 56,152 e 56,823 \pm 35,209 para as células controle e siRNA ARHGAP21, respectivamente (A e B). Não houve diferença nas distâncias percorridas pelas células LNCaP nos três substratos testados (C e D).

16.3. A inibição de ARHGAP21 induz alteração na direcionalidade de células PC-3 em plástico

A direcionalidade das células PC-3 transfectadas com siRNA para ARHGAP21 em plástico foi estatisticamente diferente das células controle (médias $0,313 \pm 0,179 \text{ e } 0,225 \pm 0,182$, respectivamente; ; p= 0,0363), conforme pode ser observado pela Figura 42.

Outra forma de mostrar a direcionalidade de migração celular é através dos gráficos de direcionalidade gerados pelo plugin Chemotaxis Tool do programa ImageJ. Estes gráficos estão representados na Figura 43, e mostram o caminho percorrido por cada célula rastreada. Assim, foi possível observar que as células com inibição de ARHGAP21 migram de maneira mais acumulada que as células controle.



Figura 42. A inibição de ARHGAP21 induz alteração na direcionalidade de células PC-3 em plástico. A direcionalidade de células PC-3 e LNCaP controle e com inibição da expressão de ARHGAP21 (siRNA ARHGAP21) foi monitorada em plástico (em azul), matrigel (em vermelho) e fibronectina (em verde). A direcionalidade das células PC-3 controle em plástico foi estatisticamente diferente das células siRNA ARHGAP21 (A). Não houve diferença na direcionalidade das células LNCaP nos três substratos testados (B).



Figura 43. Células PC-3 com inibição da expressão de ARHGAP21 migram de maneira mais acumulada. O caminho percorrido por cada célula está representado nos gráficos. Note que as células PC-3 com inibição de ARHGAP21 migram em plástico de maneira mais acumulada quando comparadas com as células controle.

17. A super-expressão de ARHGAP21 induz alteração na direcionalidade de células PC-3 em plástico.

Ensaios de migração celular também foram realizados em células PC-3 com superexpresão de ARHGAP21. Com este objetivo, foi realizada a super-expressão transitória de ARHGAP21 com o kit nucleofactor (amaxa) e a eficiência da transfecção foi verificada por ensaios de RT-PCR quantitativo em tempo real e western blot. Observamos um aumento de aproximadamente 12 na expressão gênica de ARHGAP21 e 2 vezes de aumento na expressão protéica nas células transfectadas com o vetor para super-expressão de ARHGAP21 em comparação às células controle (Figura 44).



Figura 44. Super-expressão de ARHGAP21 em células PC-3. RT-PCR em tempo real (A) e Western Blot (B) foram utilizados para se testar a eficiência da transfecção para super-expressão de ARHGAP21 em células PC3. Observe o aumento da expressão gênica e protéica nas células transfectadas com ARHGAP21 (super-ARHGAP21) em comparação às células controle. Os valores de expressão gênica foram normalizados pelo controle, considerado como 1. A expressão protéica de ARHGAP21 foi normalizada pela expressão de beta-actina.

Não houve diferença na velocidade de migração e na distância percorrida pelas células com super-expressão de ARHGAP21 em comparação às células controle. Porém, novamente observamos diferença na direcionalidade percorrida pelas células PC-3 am plástico (Figura 45).

Em comparação com células controle, as células com super-expressão de ARHGAP21 migraram de forma mais espalhada que as células controle (Figura 46).





[🔲] plástico 🔲 matrigel 🗔 fibronectina

Figura 45. A super-expressão de ARHGAP21 induz alteração na direcionalidade de células PC-3 em plástico. A direcionalidade de migração das células PC-3 controle e com super-expressão de ARHGAP21 (super-ARHGAP21) foi monitorada em plástico, matrigel e fibronectina. Observe que a direcionalidade das células PC-3 super-ARHGAP21 em plástico foi diferente das células controle. Valor de p=0,0363, teste *student t*.



Figura 46. Células PC-3 controle migram de maneira mais acumulada, em comparação às células com super-expressão de ARHGAP21. Direcionalidade das células PC-3 controle e super-ARHGAP21 em plástico. O caminho percorrido por cada célula está representado nos gráficos. Ao contrário das células com inibição de ARHGAP21, as células PC-3 com super-expressão de ARHGAP21 migram em plástico de maneira mais espalhadas quando comparadas com as células controle.

18. Crescimento tumoral em camundongos BALB/c nude inoculados com células PC-3 controle e shRNA

Para avaliar se a depleção da expressão de ARHGAP21 produz algum efeito no crescimento tumoral, células PC-3 foram transfectadas estavelmente com um vetor lentiviral para a inibição da expressão de ARHGAP21. Após 15 dias de seleção com blasticidina, as células foram coletadas para verificação da eficiência da transfecção por RT-PCR quantitativo em tempo real. Observamos uma diminuição na expressão de *ARHGAP21* de aproximadamente 50% nas células transfectadas com o vetor para inibição de ARHGAP21 (PC-3 shRNA) em comparação às células controle (Figura 47).



Figura 47. Inibição estável da expressão de ARHGAP21 em células PC-3. Ensaios de RT-PCR em tempo real foram realizados para verificar a efetividade da inibição de ARHGAP21 através do uso de lentivírus na linhagem celular PC-3. Observamos redução de aproximadamente 60% na expressão gênica de ARHGAP21 nas células submetidas à transfecção para inibição da expressão desta proteína (shRNA ARHGAP21) em comparação às células controle.

Até o momento, os ensaios de indução tumoral foram realizados em cinco animais. Dois animais receberam injeção de células controle (PC-3 parental) e três animais foram inoculados com células PC-3 shRNA ARHGAP21.

Observamos uma diminuição do crescimento dos tumores dos animais inoculados com células PC-3 shRNA em comparação aos animais inoculados com as células controle.

Esta diferença foi mais evidente no início do desenvolvimento tumoral, até o 22º dia após a inoculação das células (Figura 48).



Figura 48. Curva de crescimento tumoral em camundongos BALB/c nude inoculados com células PC-3 controle e shRNA ARHGAP21. Houve diminuição do volume dos tumores dos três camundongos inoculados com as células shRNA (linhas vermelhas) em comparação aos tumores dos dois camundongos inoculados com as células controle (linhas azuis). Esta diferença foi mais evidente até o 22º após a inoculação.



No presente estudo, as funções da proteína RhoGAP ARHGAP21 foram investigadas em células endoteliais (HUVECs) e em linhagens celulares de adenocarcinoma de próstata (LNCaP e PC-3). Células de epitélio de rim (HEK 293T) também foram utilizadas para modelo experimental em vista destas células serem facilmente transfectáveis.

A super-expressão de ARHGAP21 induziu menor atividade de RhoA e RhoC, conforme observado nos ensaios de GST-Pull Down em células HEK 293T. As atividades de Rac1, Cdc42 e RhoB, por sua vez, não foram moduladas. Estes resultados indicam que ARHGAP21 tem atividade *in vivo* específica para RhoA e RhoC (Figura 49). Esta especificidade para RhoA e RhoC e não para RhoB foi inesperada, pois as sequências das três isoformas de Rho (RhoA, RhoB e RhoC) apresentam mais de 85% de identidade. Porém, apesar da alta homologia, estas proteínas possuem diferentes localizações celulares. Enquanto RhoB localiza-se principalmente nos endossomos tardios e lisossomos, RhoA e RhoC localizam-se no citoplasma ou na membrana plasmática (Adamson et al, 1992), portanto semelhante à localização de ARHGAP21 super-expressa em HEK 293T.



Figura 49. Representação esquemática da ação de ARHGAP21 sobre Rho GTPases. A proteína ARHGAP21 inativa RhoA e RhoC, catalizando a hidrólise de GTP, através do seu domínio RhoGAP.

Considerando-se que são poucas as descrições da atividade RhoGAPs para RhoB e RhoC, nosso estudo adiciona importante dado à literatura pois indica que ARHGAP21 é capaz de discriminar essas diferentes isoformas de Rho. De fato, a maiorias dos estudos de atividade das RhoGAPs e RhoGEFs foram realizados apenas com RhoA. Além disso, a atividade das proteínas RhoGEFs Vav e p115 e as RhoGAPs Bcr e p190, testada nas três isoformas, não mostrou diferenças nas afinidades para RhoA, RhoB e RhoC (Bishop et al., 2000).

Experimentos anteriores *in vitro* demonstraram que ARHGAP21 possui atividade GAP principalmente para RhoA e Cdc42, com pouca ação sobre Rac1 (Dubois et al. 2005 e Sousa et al. 2005). Estes experimentos foram realizados em bactérias *Escherichia coli*, que portanto não são capazes de realizar modificações pós-translacionais (prenilação, clivagem proteolítica e metilação) que ocorrem nas Rho GTPases e são importantes para a sua ligação com RhoGAPs e RhoGEFs. Além disso, RhoGAPs são proteínas com múltiplos domínios e, em bactérias, efeitos de conformação proteica realizados por estes domínios podem ser negligenciados. Assim, resultados de experimentos para avaliação da especifidade de uma RhoGAP *in vivo* (em células eucariotas) e *in vitro* (bactérias) podem diferir.

Resultados anteriores do nosso grupo também demonstraram uma possível função de ARHGAP21 sobre Cdc42. Quando a linhagem de glioblastoma humano T98G foi submetida à inibição de ARHGAP21, observou-se um aumento da atividade de Cdc42 (Bigarella et al., 2009). Essa divergência com os resultados do presente estudo pode ser explicada pela variação de atividade GAP de acordo com o tipo celular. Dessa forma, ARHGAP21 agiria sobre Cdc42 na linhagem de glioblastoma humano, mas não nas linhagens HEK 293T, LNCaP e HUVECs. Outra explicação é o conhecido balanço que existe entre as atividades das Rho GTPases. Em células HUVECs, por exemplo, a inibição da expressão de RhoA por siRNAs resultou na diminuição da atividade tanto de RhoA quanto de Cdc42 (Apêndice IV). Assim, o aumento da atividade de Cdc42 encontrada nas células de glioblastoma humano poderia ter sido causado por um efeito indireto de ARHGAP21 sobre RhoA.

Outro aspecto interessante observado neste estudo foram as diferenças morfológicas das células HEK 293T com super-expressão de ARHGAP21, que se mostraram arredondadas e com protrusões, diferente das células controle (transfectadas com o vetor vazio) que mantiveram o fenótipo epitelial. A morfologia de uma célula está intimamente relacionada à sua função e esta não é a primeira vez que observamos a relação de ARHGAP21 com o fenótipo celular. Nosso grupo reportou a diferença morfológica em

células T98G submetidas à inibição de ARHGAP21, que passaram da morfologia epitelióide para uma conformação de fibroblastos (Bigarella et al., 2009). Em células HEK 293T, a diferença observada pode ser resultante de alterações nas propriedades adesivas causadas pela super-expressão de ARHGAP21, visto que estas células se soltam do substrato. Outra explicação é que a super-expressão de ARHGAP21 pode ser tóxica para as células e elas entram em processo de morte. Interessantemente, observamos que as células HEK 293T com super-expressão de p190 RhoGAP apresentaram alterações morfológicas muito similares às alterações induzidas pela super-expressão de ARHGAP21. Este fenótipo induzido pela super-expressão de p190 RhoGAP, isto é, arredondado e com protrusões já havia sido anteriormente observado na linhagem celular de fibroblastos NIH 3T3. A alteração foi dependente da presença funcional do domínio RhoGAP da p190 RhoGAP sobre Rho A, pois a expressão de RhoA na forma constitutivamente (G14V) ativa reverteu o fenótipo (Tatsis et al., 1998). Portanto, podemos inferir que a diferença morfológica nas células HEK 293T com super expressão de ARHGAP21 ou p190 RhoGAP é decorrente da diminuição atividade celular de RhoA.

Neste trabalho, realizamos com sucesso a inibição da expressão de ARHGAP21 em células endoteliais de veia de cordão umbilical (HUVECs). Ensaios de avaliação do ciclo celular e microarranjos de DNA foram realizados em HUVECs com diminuição de aproximadamente 70% na expressão de ARHGAP21, comparadas às células controle. Observamos um aumento da porcentagem de células nas fases G0 e G1 do ciclo celular e diminuição nas fases S e G2-M. Na fase G0, as células estão em estado quiescente após a mitose, enquanto a fase G1 é marcada pela síntese de várias enzimas que serão necessárias na fase S, principalmente para a replicação do DNA. Dessa forma, nossos resultados indicam que ARHGAP21 deve ser uma proteína importante no controle do ciclo celular de HUVECs.

De fato, Rho GTPases estão envolvidas no controle do ciclo celular. Experimentos com células epiteliais e fibroblastos em cultura mostraram que Rho, Rac e Cdc42 podem contribuir para a progressão do ciclo celular. A expressão de qualquer uma das três proteínas parece promover a entrada em G1 e a progressão para a fase S, enquanto a sua inibição bloquearia a progressão da fase G1 induzida por soro (Olson et al., 1995). Por

outro lado, outro estudo mostrou que a expressão da forma constitutivamente ativa de RhoA (V14RhoA) em células NIH 3T3 inibiu a proliferação e diminuiu em aproximadamente 10% a porcentagem de células que passaram para fase S após sincronização e estímulo com soro fetal bovino (Morin et al., 2009). Além disso, nossos resultados de microarranjos de DNA com células HUVECs, mostraram modulação de genes envolvidos com proliferação e ciclo celular, como genes codificadores de fatores de crescimento (aumento na expressão de FGF18 e NGF) e relacionados com o controle da mitose (aumento na expressão de NEK6 e NEK7).

Ensaios de microarranjos de DNA também mostraram aumento da expressão do inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI-1) nas células HUVECs submetidas à inibição da expressão de ARHGAP21 e este resultado foi confirmado por PCR em tempo real. PAI-1 é o principal inibidor dos ativadores de plasminogênio de tecido (tPA) e uroquinase (uPA), e, portanto, da fibrinólise. PAI-1 possui papel central na coagulação e sua desregulação pode levar à ocorrência de distúrbios hemorrágicos ou trombóticos. Além de regular a produção de plasmina, PAI-1 pode influenciar uma variedade de processos celulares, incluindo proliferação e controle do ciclo celular. PAI-1 é um alvo direto da proteína p53, que pode se ligar e ativar a sua região promotora (Kunz et al., 1995; Zhao et al., 2000) e é considerado um marcador da senescência replicativa (Mu et al., 1995 e Serrano et al., 1997). PAI-1 ainda regula a atividade de uPA, que por sua vez pode causar a progressão das células da fase G1 para a fase S através da sua ação sobre fatores de crescimento (De Petro et al., 1994). Nossos experimentos com HEK 293T mostraram que ARHGAP21 possui atividade catalítica sobre RhoA. Assim, inferimos que a atividade de RhoA encontra-se elevada em células submetidas à inibição da expressão de ARHGAP21. A expressão de PAI-1 já foi diversas vezes relacionada com a atividade de RhoA e esta relação parece ser dependente de ROCK (Nakakuki et al., 2005, Nakayama et al., 2009, Samarakoon et al., 2009), proteína efetora de Rho. Por exemplo, a adesão de monócitos a células endoteliais aumentou a expressão de PAI-1 e a atividade de RhoA. Porém, a inibição da atividade de RhoA pela toxina C3 transferase ou expressão da sua forma constitutivamente inativa (N19 RhoA) preveniu o aumento de PAI-1 induzido pela adesão monocítica (Sakamoto et al., 2007). Outros estudos mostraram que a expressão de N19
RhoA e o tratamento com o inibidor de ROCK atenuaram drasticamente o aumento de expressão de PAI-1 induzido por TGF-beta 1 e angiotensina 2, potentes ativadores da expressão de PAI-1 (Samarakoon et al., 2008 e Kobayashi et al., 2002). Desta forma, nossa hipótese é que o aumento na expressão de PAI-1 em células HUVECs com inibição de ARHGAP21 seja em decorrência da maior atividade de RhoA. A parada no ciclo celular observada nas células HUVECs com inibição de ARHGAP21, por sua vez, poderia ser em decorrência do aumento na expressão de PAI-1 ou de outras vias de sinalização desencadeadas por RhoA.

Outro gene cuja expressão foi modulada nos ensaios de microarranjos de DNA em células HUVECs foi o gene HMGA2. As proteínas da família HMGA são fatores de transcrição que atuam na regulação da transcrição de uma variedade de genes. Desta forma, elas influenciam diversos processos biológicos como crescimento celular, proliferação, diferenciação e morte (Cleynen e Van de Ven, 2008). Assim como PAI-1, a expressão de HMGA2 também já foi relacionada com a atividade de RhoA. Ensaios de microarranjos de DNA em células NIH 3T3 transfectadas com a forma constitutivamente ativa de RhoA mostraram aumento de sua expressão gênica (Teramoto et al., 2003). Deste modo, o aumento da expressão deste gene nas células com inibição de ARHGAP21 também pode ser decorrência da maior atividade de RhoA.

A investigação funcional de ARHGAP21 também foi realizada em linhagens de adenocarcinoma de próstata através da sua inibição em células LNCaP e PC-3. Ensaios de RT-PCR em tempo real e western blot demonstraram 80% de inibição de ARHGAP21 nas células transfectadas com oligonucleotídeos específicos para a sua inibição e estudos de expressão gênica, viabilidade, adesão e migração celular foram realizados.

Células LNCaP e PC-3 representam estágios iniciais e avançados do câncer de próstata, respectivamente. Em células LNCaP com inibição da expressão de ARHGAP21, foram realizados ensaios de microarranjos de DNA, adesão e migração. Nas células PC-3, investigamos a expressão de alguns genes modulados em LNCaP e realizamos experimentos de viabilidade celular e migração.

Experimentos de MTT em células PC-3 mostram que a diminuição da expressão de ARHGAP21 induz uma menor viabilidade celular. A diminuição da viabilidade celular

observada pode ser em decorrência da diminuição da taxa de proliferação ou do aumento de morte celular. Estes resultados são de extrema importância, uma vez que a diminuição da proliferação ou o aumento da morte celular em células cancerígenas podem combater a doença. A redução na viabilidade induzida pela inibição da expressão de ARHGAP21 foi similar à redução induzida pelo tratamento com cisplatina. Além disso, quando as células submetidas à inibição de ARHGAP21 foram tratadas com cisplatina observamos uma redução na viabilidade ainda maior que a redução induzida apenas com a inibição de ARHGAP21 ou com o tratamento com a droga. Estes resultados foram confirmados pela diminuição no crescimento tumoral observado em camundongos submetidos à injeção de células PC-3 com inibição da expressão de ARHGAP21 pode ser um alvo tumoral no tratamento do câncer de próstata.

Ensaios de adesão em células LNCaP mostraram que a inibição de ARHGAP21 resulta em uma menor adesão ao matrigel e à fibronectina. Estes substratos são comumente usados em ensaios de adesão e migração celular, pois são formados por componentes da matriz extracelular que interagem com as células, estimulando a migração e adesão *in vivo*. Os principais componentes do matrigel são laminina e colágeno. A fibronectina, por sua vez, é uma glicoproteína da matriz extracelular que regula muitos processos celulares, como reorganização do citoesqueleto, progressão do ciclo celular e migração (Shibata et al., 1998). Processos de adesão e migração celular são muito importantes para a invasão das células cancerígenas. Para as células migrarem, elas precisam primeiramente aderir e reconhecer o ambiente extracelular. Depois, para mover, é necessário que elas se desprendam de outras células e da matriz extracelular. ARHGAP21 já foi reportada como um componente importante na adesão célula-célula, através da sua interação com alfacatenina (Sousa et al., 2005). Neste trabalho, observamos que ARHGAP21 deve também ter uma importante função na adesão entre a célula e a matriz extracelular.

Com relação aos ensaios de migração, observamos uma diminuição na migração das células PC3 com inibição de ARHGAP21 em fibronectina em comparação com as células controle. A regulação precisa de RhoA é crucial para que a migração ocorra. Apesar de certa atividade de RhoA ser necessária para a migração, alta atividade de RhoA inibe a

motilidade celular (Takaishi *et al.*, 1994; Ridley *et al.*, 1995; Nobes e Hall, 1999). A fibronectina é reconhecida na superfície celular pelas integrinas alfa5beta1 e alfa5beta3. A adesão da célula à matriz extracelular mediada por integrinas regula a atividade de RhoA, causando sua inativação transiente, que é necessária para que ocorra rearranjos no citoesqueleto e formação de protrusões, importantes para a migração (Ren et al., 1999; Arthur et al, 2000). A expressão de dominante negativo de p190 RhoGAP previne a inibição da atividade de RhoA durante a adesão à fibronectina e culmina em um atraso na migração celular na fibronectina (Arthur e Burridge, 2001). Nossa hipótese é de que o mesmo pode estar acontecendo em nossos experimentos com células PC-3 submetidas à inibição de ARHGAP21. Neste caso, a inibição de ARHGAP21 estaria desencadeando um aumento na atividade de RhoA, que por sua vez não é inibida pela fibronectina, resultando na menor migração (Figura 50).



Figura 50. Representação esquemática da suposta função de ARHGAP21 na migração celular em fibronectina. (A) A adesão a matriz extracelular mediada por integrinas causa a inativação transiente de RhoA. Esta inativação é necessária no processo de migração, pois ocasiona em rearranjos no citoesqueleto e formação de protrusões. (B) Baixos níveis de ARHGAP21 poderiam prevenir esta inativação, causando uma desregulação no controle do citoesqueleto e uma menor migração celular em fibronectina.

Experimentos de migração também mostraram que a direcionalidade das células PC-3 com inibição da expressão de ARHGAP21 foi alterada em plástico. Em comparação

às células controle, as células que sofreram inibição da expressão de ARHGAP21 pareceram migrar de forma mais acumulada. Células PC-3 com super-expressão de ARHGAP21, por sua vez, migraram de forma mais espalhada. Assim, podemos inferir que a presença da ARHGAP21 favorece a migração celular, sugerindo que a inibição de ARHGAP21 poderia reduzir a ocorrência de metástase.

Outro dado interessante de nosso estudo foi o aumento da expressão de BNIP3 em células HUVECs, PC3 e LNCaP com inibição de ARHGAP21, ou células LNCaP com super-expressão de RhoA. Estes resultados sugerem que a expressão BNIP3 pode estar relacionada a ARHGAP21 em diversos tipos celulares. BNIP3 foi originalmente identificado como um gene que interage com a proteína adenovírus E1B 19kDa e é um membro da família das proteínas Bcl-2 que pode heterodimerizar e antagonizar proteínas de sobrevivência, como Bcl-2, promovendo assim a morte celular (Boyd et al., 1994). A expressão de BNIP3 é aumentada em situações de estresse, como hipóxia, através de mecanismos dependentes ou não de HIF-1 (Sandau e Handa 2007). Ainda é controverso qual tipo de morte celular é induzida por BNIP3. Foi observado que esta proteína pode induzir necrose (Cizeau et al., 2000), autofagia (Tracy et al., 2007) e/ou apoptose, com liberação de citocromo c da membrana e ativação de caspases (Regula et al., 2002). Diversas proteínas controlam a expressão de BNIP3 em condições normais de crescimento, como o supressor tumoral retinoblatoma (Tracy et al., 2007) e NFkB (Shaw et al., 2007). Desta forma, ARHGAP21 pode também estar envolvida com a sobrevivência celular.

Em conclusão, esta é a primeira vez que a atividade de ARHGAP21 é avaliada em conjunto para RhoA, RhoB e RhoC e nossos experimentos evidenciaram que ARHGAP21 tem ação seletiva para RhoA e RhoC. O presente estudo ainda mostrou que ARHGAP21 possui importantes funções em dois diferentes modelos celulares. Em células endoteliais, observamos que a inibição de sua expressão resultou em alterações no ciclo celular e na modulação da expressão de diversos genes importantes para a regulação das propriedades do endotélio, como o inibidor do ativador do plasminogênio 1. Em células de adenocarcinoma de próstata, a inibição da expressão de ARHGAP21 propiciou a diminuição da proliferação, adesão e migração celular, eventos importantes para a

progressão tumoral e metástase. Os achados aqui descritos sugerem que ARHGAP21 pode ser uma molécula alvo para a terapia de adenocarcinoma de próstata e permitirão direcionar novos estudos com o objetivo de melhor elucidar as funções específicas de ARHGAP21 em outros modelos celulares.



O conjunto dos resultados apresentados neste trabalho permite as seguintes conclusões:

Em células HEK 293T (células endoteliais de rim):

- 1. Super-expressão de ARHGAP21 inibiu a atividade de RhoA e RhoC e não alterou a atividade de Rac1, Cdc42 e RhoB.
- 2. Super-expressão de ARHGAP21 resultou em alterações morfológicas semelhantes ao fenótipo induzido pela super-expressão de p190 Rho GAP.

Em células HUVECs (células endoteliais de veia de cordão umbilical humano):

- 3. ARHGAP21 está localizada no núcleo e citoplasma.
- Inibição de ARHGAP21 resultou em modulação de genes envolvidos na adesão e migração (PAI-1 e PODXL), via da beta-catenina (FRZB, FGF18 e SMURF2), hipóxia (BNIP3 e STC1) e fatores de transcrição (HMGA2).
- Inibição de ARHGAP21 aumentou a porcentagem de células nas fases G0-G1 do ciclo celular.

Em linhagens celulares de adenocarcinoma de próstata:

- 6. ARHGAP21 está localizada no núcleo e citoplasma.
- 7. Inibição de ARHGAP21 em PC-3 e LNCaP resultou em modulação de genes envolvidos na adesão (PODXL, TGF-beta induced) e apoptose celular (BNIP3).
- A modulação dos genes *TGF-beta induced* e *BNIP3* foram induzidas por RhoA e RhoC em LNCaP.
- Inibição de ARHGAP21 em células PC-3 resultou em redução da viabiliadade celular, redução da velocidade de migração em fibronectina e migração celular de maneira mais acumulada.
- 10. Superexpressão de ARHGAP21 em PC-3 resultou em migração celular de maneira menos acumulada.
- 11. Inibição de ARHGAP21 em células LNCaP resultou em redução da adesão em matrigel e fibronectina
- 12. Estudos funcionais preliminares *in vivo* indicam que a inibição de ARHGAP21, por shRNA em células PC-3, resulta na diminuição do crescimento tumoral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adamson P, Paterson HF, Hall A. Intracellular localization of the P21rho proteins, **J. Cell Biol.** 119: 617–627, 1992

Ahmed S, Lee J, Kozma R, Best A, Monfries C, Lim L. A novel functional target for tumor-promoting phorbol esters and lysophosphatidic acid. The p21Rac-GTPase activating protein n-chimaerin. **J. Biol. Chem**. 268:10709–10712, 1993.

Allal C, Favre G, Couderc B, Salicio S, Sixou S, Hamilton AD, Sebti SM, Lajoie-Mazenc I, Pradines A. RhoA Prenylation Is Required for Promotion of Cell Growth and Transformation and Cytoskeleton Organization but Not for Induction of Serum Response Element Transcription. **J Biol Chem**. 275(40):31001-8 2000.

Allen, W. E., Zicha, D., Ridley, A. J. and Jones, G. E. (A role for Cdc42 in macrophage chemotaxis. **J. Cell Biol**. 141: 1147,1998

Andreasen PA, Egelund R, Petersen HH. The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. **Cell Mol Life Sci**; 57: 25-40. 2000.

Antoine M, et al. Fibroblast growth factor 16 and 18 are expressed in human cardiovascular tissues and induce on endothelial cells migration but not proliferation. **Biochem. Biophys. Res. Commun**. 346:224–233. 2006

Aronheim A, Broder YC, Cohen A, Fritsch A, Belisle B, Abo A. Chp, a homologue of the GTPase Cdc42Hs, activates the JNK pathway and is implicated in reorganizing the actin cytoskeleton. **Curr. Biol**. 8:1125–1128, 1998.

Arthur WT, Burridge K. RhoA inactivation by p190RhoGAP regulates cell spreading and migration by promoting membrane protrusion and polarity. **Mol. Biol. Cell** 12:2711–2720, 2001.

Arthur WT, Petch LA, Burridge K. Integrin engagement suppresses RhoA activity via a c-Src-dependent mechanism. **Curr Biol**. 15;10(12):719-22. 2000

Aspenstrom P, Fransson A, Saras J. Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. **Biochem. J.** 377:327–37, 2004.

Ban, R., Irino, Y., Fukami, K. and Tanaka, H. Human mitotic spindle-associated protein PRC1 inhibits MgcRacGAP activity toward Cdc42 during the metaphase. **J. Biol. Chem**. 279:16394–16402, 2004.

Bassères DS, Tizzei EV, Duarte AA, Costa FF, Saad ST. ARHGAP10, a novel human gene coding for a potentially cytoskeletal Rho-GTPase activating protein. **Biochem Biophys Res Commun**; 14;294(3):579-85. 2002.

Bernards A. GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPase activating proteins in man and Drosophila. **Biochim. Biophys. Acta**, 1603:47–82, 2003.

Bigarella CL, Borges L, Costa FF, Saad ST. ARHGAP21 modulates FAK activity and impairs glioblastoma cell migration. **Biochim Biophys Acta.** 1793(5):806-16, 2009.

Billuart P, Winter CG, Maresh A, Zhao X, Luo L. Regulating axon branch stability: the role of p190 RhoGAP in repressing a retraction signaling pathway. **Cell**. 107:195–207, 2001.

Bishop AL, Hall A. Rho GTPases and their effector proteins. **Biochem. J**. 348: 241–255, 2000

Blasi F, Carmeliet P. uPAR: a versatile signalling orchestrator. **Nat Rev Mol Cell Biol**. ;3(12):932-43. 2002 Borges, L., Bigarella, C. L., Baratti, M. O., Crosara-Alberto, D. P., Joazeiro, P. P., Franchini, K. G. Costa FF, Saad ST., et al. ARHGAP21 associates with FAK and PKCzeta and is redistributed after cardiac pressure overload. **Biochem Biophys Res Commun** ;374(4):641-6. 2008.

Borkhardt A, Bojesen S, Haas OA, Fuchs U, Bartelheimer D, Loncarevic IF, Bohle RM, Harbott J, Repp R, Jaeger U, Viehmann S, Henn T, Korth P, Scharr D, Lamper F. The human GRAF gene is fused to MLL in a unique t(5;11)(q31;q23) and both alleles are disrupted in three cases of myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia with a deletion 5q. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 97: 9168–9173, 2000.

Boyd JM, Malstrom S, Subramanian T, Venkatesh LK, Schaeper U, Elangovan B, D'Sa-Eipper C, Chinnadurai G. Adenovirus E1B 19 kDa and bcl-2 proteins interact with a common set of cellular proteins. **Cell**,;79(2):341–351.1994.

Braga VMM. Small GTPases and regulation of cadherin dependent cell±cell adhesion. **Mol. Pathol**. 52:97-202, 1999.

Brandão MM, Silva-Brandão KL, Costa FF, Saad ST. Phylogenetic analysis of RhoGAPdomain containing proteins. **Genomics Proteomics Bioinformatics**.;4 (3):182-8, 2006.

Brentani, H., Caballero, O. L., Camargo, A. A., da Silva, A. M., da Silva, W. A., Jr., Dias Neto, E., et al. The generation and utilization of a cancer-oriented representation of the human transcriptome by using expressed sequence tags. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 100(23): 13418-13423, 2003

Brouns MR, Matheson SF, Hu KQ, Delalle I, Caviness VS, Silver J, Bronson RT, Settleman J. The adhesion signaling molecule p190 RhoGAP is required for morphogenetic processes in neural development. **Development**. 127:4891–4903, 2000.

Brouns MR, Matheson SF, Settleman J. p190 RhoGAP is the principal Src substrate in brain and regulates axon outgrowth, guidance and fasciculation. **Nat. Cell Biol**. 3:361–367, 2001.

Bryan BA, D'Amore PA. What tangled webs they weave: Rho-GTPase control of angiogenesis. Cell Mol. Life Sci. 64:2053–2065, 2007.

Burbelo PD, Finegold AA, Kozak CA, Yamada Y, Takami H. Cloning, genomic organization and chromosomal assignment of the mouse p190-B gene. **Biochim. Biophys. Acta** 1443, 203–210,1998.

Burridge K, Wennerberg K. Rho and Rac take center stage. Cell. 116:167-179, 2004.

Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. **Genes Dev**.;11(24):3286-305. Review. 1997

Canalis E, Centrella M, McCarthy T. Effects of basic fibroblast growth factor on bone formation in vitro. **J Clin Invest**.;81(5):1572-7, 1988

Carles A, Millon R, Cromer A, Ganguli G, Lemaire F, Young J, Wasylyk C, Muller D, Schultz I, Rabouel Y, Dembélé D, Zhao C, Marchal P, Ducray C, Bracco L, Abecassis J, Poch O, Wasylyk B. Head and neck squamous cell carcinoma transcriptome analysis by comprehensive validated differential display. **Oncogene** ;25(12):1821-31. 2006

Casey G, Neville PJ, Liu X, et al., Podocalyxin variants and risk of prostate cancer and tumor aggressiveness. **Hum Mol Genet**;15:735–41. 2006

Celis EC. Cell Biology: A laboratory handbook. 2. ed. San Diego: Academic Press, 1998.

Chakraborty A, Brooks H, Zhang P, Smith W, McReynolds MR, Hoying JB, Bick R, Truong L, Poindexter B, Lan H, Elbjeirami W, Sheikh-Hamad D. Stanniocalcin-1 regulates endothelial gene expression and modulates transendothelial migration of leukocytes. **Am J Physiol Renal Physiol**Feb;292(2):F895-904. 2007

Chakravarty G, Roy D, Gonzales M, Gay J, Contreras A, Rosen JM. p190-B, a Rho-GTPase-activating protein, is differentially expressed in terminal end buds and breast cancer. **Cell Growth Differ**. 11:343–354, 2000.

Chang AC, Janosi J, Hulsbeek M, de Jong D, Jeffrey KJ, Noble JR, Reddel RR. A novel human cDNA highly homologous to the fish hormone stanniocalcin. **Mol Cell Endocrinol** 112: 241–247, 1995.

Chang AC, Jellinek DA, Reddel RR. Mammalian stanniocalcins and cancer. **Endocr Relat Cancer** 10: 359–373, 2003.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem**. ;162(1):156-9., 1987

Chuman, Y., Uren, A., Cahill, J., Regan, C., Wolf, V., Kay, B. K. and Rubin, J. S. Identification of a peptide binding motif for secreted frizzled-related protein-1.**Peptides**/. 25, 1831-1838. 2004.

Cizeau J, Ray R, Chen G, Gietz RD, Greenberg AH. The C. elegans orthologue ceBNIP3 interacts with CED-9 and CED-3 but kills through a BH3- and caspase-independent mechanism. **Oncogene**; 19: 5453–5463. 2000.

Clark EA, Golub TR, Lander ES, Hynes RO. Nature 406:532-535, 2000.

Cleynen I, Van de Ven WJ. The HMGA proteins: a myriad of functions. **Int J Oncol**. 32(2):289-305, 2008.

Cleynen I, Van de Ven WJ. The HMGA proteins: a myriad of functions. Int J Oncol. ;32(2):289-305. 2008

Coso OA, Chiariello M, Yu JC, Teramoto H, Crespo P, Xu N, Miki T, Gutkind JS. The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. **Cell**. 81:1137-1146, 1995.

Cox AD, Der CJ. Protein prenylation : more than just glue? **Curr. Opin. Cell Biol.** 4:1008-1016, 1992.

Dailey L, Ambrosetti D, Mansukhani A, Basilico C. Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling. **Cytokine Growth Factor Rev**. 16(2):233-47. 2005.

Daub H, Gevaert K, Vandekerckhove J, Sobel A, Hall A. Rac/Cdc42 and p65PAK regulate the microtubule-destabilizing protein stathmin through phosphorylation at serine 16. **J. Biol. Chem**. 276:1677–1680 2001.

De Petro G, Copeta A, Barlati S. Urokinase-type and tissue-type plasminogen activators as growth factors of human fibroblasts. **Exp. Cell Res**. 213:286–294, 1994.

Del Peso L, Herna'ndez-Alcoceba R, Embade N, Carnero A, Esteve P, Paje C, Lacal JC. Oncogene 15:3047–3057, 1997.

Devy L, Blacher S, Grignet-Debrus C, et al., The pro- or antiangiogenic effect of plasminogen activator inhibitor 1 is dose dependent. **FASEB J** ; 16: 147-54, 2002.

Di Cello F, Hillion J, Hristov A, Wood LJ, Mukherjee M, Schuldenfrei A, Kowalski J, Bhattacharya R, Ashfaq R, Resar LM.HMGA2 participates in transformation in human lung cancer. **Mol Cancer Res**.;6(5):743-50.2008.

Diana F, Di Bernardo J, Sgarra R, Tessari MA, Rustighi A, Fusco A, Giancotti V, Manfioletti G. Differential HMGA expression and post-translational modifications in prostatic tumor cells. **Int J Oncol**.;26(2):515-20.2005.

Dias Neto, E., Correa, R. G., Verjovski-Almeida, S., Briones, M. R., Nagai, M. A., da Silva, W., Jr., et al. Shotgun sequencing of the human transcriptome with ORF expressed sequence tags. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 97(7): 3491-3496, 2000.

Dieudonne, S. C., Kerr, K. M., Xu, T., Sommer, B., DeRubeis, A. R., Kuznetsov, S. A., Kim, I.-S., Robey, P. G., and Young, M. F. J. **Cell. Biochem**. 76, 231–243.1999.

Dubois, T., Chavrier, P. ARHGAP10, a novel RhoGAP at the cross-road between ARF1 and Cdc42 pathways, regulates Arp2/3 complex and actin dynamics on Golgi membranes. **Med Sci** ;21(8-9):692-4.2005.

Ellsworth JL, Berry J, Bukowski T, Claus J, Feldhaus A, Holderman S, Holdren MS, Lum KD, Moore EE, Raymond F, Ren H, Shea P, Sprecher C, Storey H, Thompson DL, Waggie K, Yao L, Fernandes RJ, Eyre DR, Hughes SD. Fibroblast growth factor-18 is a trophic factor for mature chondrocytes and their progenitors. **Osteoarthritis Cartilage**.;10(4):308-20. Erratum in: Osteoarthritis Cartilage;10(10):826. 2002.

Etienne A, Carbuccia N, Adélaïde J, Bekhouche I, Rémy V, Sohn C, Sainty D, Gastaut JA, Olschwang S, Birnbaum D, Mozziconacci MJ, Chaffanet M. Rearrangements involving 12q in myeloproliferative disorders: possible role of HMGA2 and SOCS2 genes. **Cancer Genet Cytogenet**. 1;176(1):80-8.2007

Etienne-Manneville S, Hall A. Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKCζ. **Cell** 106:489–498 2001.

Fujisawa K, Madaule P, Ishizaki T, Watanabe G, Bito H, Saito Y, Hall A, Narumiya S. Different regions of Rho determine Rhoselective binding of different classes of Rho target molecules. **J. Biol. Chem**. 273:18943–18949, 1998.

Fukumoto Y, Kaibuchi K, Hori Y, Fujioka H, Araki S, Ueda T, Kikuchi A, Takai Y. Molecular cloning and characterization of a novel type of regulatory protein (GDI) for the rho proteins, ras p21-like small GTP-binding proteins. **Oncogene**. 5:1321–1328 1990.

Garrett MD, Self AJ, Van Oers C, Hall A. Identification of distinct cytoplasmic targets for ras/R-ras and rho regulatory proteins. **J. Biol. Chem**. 264:10–13, 1989.

Gomez del Pulgar T, Benitah SA, Valeron PF, Espina C, Lacal JC. Rho GTPase expression in tumourigenesis: evidence for a significant link. **Bioessays**. 27:602–613, 2005.

Goode BL, Eck MJ. Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. **Annual Reviews of Biochemical**. 76:593–627, 2007.

Gouw LG, Reading NS, Jenson SD, Lim MS, Elenitoba-Johnson KS. Expression of the Rho-family GTPase gene RHOF in lymphocyte subsets and malignant lymphomas. **Br. J. Haematol**. 129:531–533, 2005.

Guasch RM, Scambler P, Jones GE, Ridley A J. RhoE regulates actin cytoskeleton organization and cell migration. **Mol. Cell. Biol**. 18:4761–4771, 1998.

Guo, J.K., Menke, A.L., Gubler, M.C., Clarke, A.R., Harrison, D., Hammes, A., Hastie, N.D. and Schedl, A. WT1 is a key regulator of podocyte function: reduced expression levels cause crescentic glomerulonephritis and mesangial sclerosis. **Hum. Mol. Genet.,** 11, 651–659. 2002.

Hansen SH, et al. Induced expression of Rnd3 is associated with transformation of polarized epithelial cells by the Raf–MEK–extracellular signal-regulated kinase pathway. **Mol. Cell. Biol**. 20, 9364–9375, 2000.

Harbeck N, Kates RE, Gauger K, et al.,. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1; novel tumor-derived factors with a high prognostic and predictive impact in breast cancer. **Thromb Haemost**; 91: 450-6. 2004.

Hart MJ, Maru Y, Leonard D, Witte ON, Evans T, Cerione RA. A GDP dissociation inhibitor that serves as a GTPase inhibitor of the Ras-like protein CDC42Hs. **Science.** 258, 812–815 1992.

Haskell MD, Nickles AL, Agati JM, Su L, Dukes BD,Parsons SJ. Phosphorylation of p190 on Tyr1105 by c-Src is necessary but not sufficient for EGF-induced actin disassembly in C3H10T1/2 fibroblasts. **J. Cell Sci**. 114:1699–1708, 2001.

Hausler, K. D., Horwood, N. J., Chuman, Y., Fisher, J. L., Ellis, J., Martin, T. J., Rubin,J. S. and Gillespie, M. T.. Secreted frizzled-related protein-1 inhibits RANKL-dependent osteoclast formation. *J. Bone Miner. Res.* 19, 1873-1881.2004

Hill CS, Wynne J, Treisman R. The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. **Cell**. 81: 1159-1170, 1995.

Hoffman GR, Nassar N, Cerione RA. Structure of the Rho family GTP-binding protein Cdc42 in complex with the multifunctional regulator RhoGDI. **Cell.** Feb 4;100(3):345-56 2000.

Hu KQ, Settleman J. Tandem SH2 binding sites mediate the RasGAP–RhoGAP interaction: a conformational mechanism for SH3 domain regulation. **EMBO J**. 16: 473–483, 1997.

Hu MC, Qiu WR, Wang YP, Hill D, Ring BD, Scully S, Bolon B, DeRose M, Luethy R, Simonet WS, et al. FGF-18, a novel member of the fibroblast growth factor family, stimulates hepatic and intestinal proliferation. **Mol. Cell. Biol**. 18:6063–6074.*1998*

Humphries MJ. Cell Adhesion Assays. Molecular biotechnology, 18, 57-61, 2008.

Irigoyen M, Pajares MJ, Agorreta J, Ponz-Sarvise M, Salvo E, Lozano MD, Pio R, Gil-Bazo I, Rouzaut A. TGFBI expression is associated with a better response to chemotherapy in NSCLC. **Mol Cancer**. 28;9(1):130.2010.

Ishibe T, Nakayama T, Okamoto T, Aoyama T, Nishijo K, Shibata KR, Shima Y, Nagayama S, Katagiri T, Nakamura Y, Nakamura T, Toguchida J. Disruption of fibroblast growth factor signal pathway inhibits the growth of synovial sarcomas: potential application of signal inhibitors to molecular target therapy. **Clin Cancer Res**. 1;11(7):2702-12. 2005.

Isogai C, Laug WE, Shimada H, Declerck PJ, Stins MF, Durden DL, Erdreich-Epstein A, DeClerck YA. Plasminogen activator inhibitor-1 promotes angiogenesis by stimulating endothelial cell migration toward fibronectin. **Cancer Res**; 61: 5587-94.2001.

Iyer VR, Eisen MB, Ross DT, Schuler G, Moore T, Lee JC, Trent JM, Staudt LM, Hudson J Jr, Boguski MS, Lashkari D, Shalon D, Botstein D, Brown PO. The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. **Science** 283: 83–87, 1999.

Jenna S, Hussain NK, Danek EI, Triki I, Wasiak S, McPherson PS, Lamarche-Vane N. The activity of the GTPase-activating protein CdGAP is regulated by the endocytic protein intersectin. J. Biol. Chem. 277:6366–6373, 2002.

Jin C, Yang YA, Anver MR, Morris N, Wang X, Zhang YE. Smad ubiquitination regulatory factor 2 promotes metastasis of breast cancer cells by enhancing migration and invasiveness. **Cancer Res**. 1;69(3):735-40.2009

Jin C, Yang YA, Anver MR, Morris N, Wang X, Zhang YE. Smad ubiquitination regulatory factor 2 promotes metastasis of breast cancer cells by enhancing migration and invasiveness. **Cancer Res**, 69:735-740 2009.

Kahn J, Mehraban F, Ingle G, Xin X, Bryant JE, Vehar G, Schoenfeld J, Grimaldi CJ, Peale F, Draksharapu A, Lewin DA, Gerritsen ME. Gene expression profiling in an in vitro model of angiogenesis. **Am J Pathol** 156: 1887–1900, 2000.

Kanzawa T, Zhang L, Xiao L, Germano IM, Kondo Y, Kondo S. Arsenic trioxide induces autophagic cell death in malignant glioma cells by upregulation of mitochondrial cell death protein BNIP3. **Oncogene**; 24: 980–991. 2005

Kapadia RM, Guntur AR, Reinhold MI, Naski MC. Glycogen synthase kinase 3 controls endochondral bone development: contribution of fibroblast growth factor 18. **Dev Biol**. 15;285(2):496-507. 2005

Kavsak, P.; Rasmussen, R. K.; Causing, C. G.; Bonni, S.; Zhu, H.; Thomsen, G. H.; Wrana, J. L. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF-beta receptor for degradation. **Molec. Cell** 6: 1365-1375, 2000.

Kawano M, Komi-Kuramochi A, Asada M, Suzuki M, Oki J, Jiang J, Imamura T. Comprehensive analysis of FGF and FGFR expression in skin: FGF18 is highly expressed in hair follicles and capable of inducing anagen from telogen stage hair follicles. **J Invest Dermatol**.;124(5):877-85. 2005

Kelley TW, Huntsman D, McNagny KM, Roskelley CD, Hsi ED. Podocalyxin: a marker of blasts in acute leukemia. **Am J Clin Pathol**;124:134–42. 2005.

Kim JE, Kim EH, Han EH, Park RW, Park IH, Jun SH, Kim JC, Young MF, Kim IS. A TGF-beta-inducible cell adhesion molecule, betaig-h3, is downregulated in melorheostosis and involved in osteogenesis. **J Cell Biochem**.77(2):169-78. 2000

Kim JE, Kim SJ, Lee BH, Park RW, Kim KS, Kim IS. Identification of motifs for cell adhesion within the repeated domains of transforming growth factor-beta-induced gene, betaig-h3. **J Biol Chem**. 6;275(40):30907-15. 2000

Klein EA, Yang C, Kazanietz MG, Assoian RK. NFkappaB-independent signaling to the cyclin D1 gene by Rac. **Cell Cycle**. 6:1115–1121, 2007.

Knight, B., Laukaitis, C., Akhtar, N., Hotchin, N. A., Edlund, M. and Horwitz, A. R. Visualizing muscle cell migration in situ. **Curr. Biol**. 10, 576-585, 2000.

Kobayashi N, Nakano S, Mita S, Kobayashi T, Honda T, Tsubokou Y, Matsuoka H. Involvement of Rho-kinase pathway for angiotensin II-induced plasminogen activator inhibitor-1 gene expression and cardiovascular remodeling in hypertensive rats. **J Pharmacol Exp Ther.** 301(2):459-66, 2002.

Kotani H, Takaishi K, Sasaki T, Takai Y. Rho regulates association of both the ERM family and vinculin with the plasma membrane in MDCK cells. **Oncogene**; 14:1705. 1997

Kozma R, Ahmed S, Best A, Lim L. The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. **Mol. Cell. Biol**. 15, 1942–1952, 1995.

Kunz C, Pebler S, Otte J, Von Der Ahe D. Differential regulation of plasminogen activator and inhibitor gene transcription by the tumor suppressor p53. **Nucleic Acids Res**. 23, 3710–3717, 1995.

Lamb RF, Ozanne BW, Roy C, et al., Essential functions of ezrin in maintenance of cell shape and lamellipodial extension in normal and transformed fibroblasts. **Curr Biol**;7:682–8.1997

Lanahan A, Williams JB, Sanders LK, Nathans D. Growth factor-induced delayed early response genes. **Mol. Cell Bio**l. 9 3919±3929. 1992

Larrucea S, Butta N, Arias-Salgado EG, Alonso-Martin S, Ayuso MS, Parrilla R. Expression of podocalyxin enhances the adherence, migration, and intercellular communication of cells. **Exp Cell Res**. 10;314(10):2004-15. 2008

LeBaron, R. G., Bezverkov, K. I., Zimber, M. P., Pavele, R., Skonier, J., and Purchio, A. F. J. Invest. Dermatol. 104, 844–849.1995

Lee, H. X., Ambrosio, A. L., Reversade, B. and De Robertis, E. M. Embryonic dorsalventral signaling: secreted frizzled-related proteins as inhibitors of tolloid proteinases. **Cell** 124, 147-159. 2006

Lee, J. L., Chang, C. J., Chueh, L. L. and Lin, C. T. Secreted frizzled related protein 2 (sFRP2) decreases susceptibility to UV-induced apoptosis in primary culture of canine mammary gland tumors by NF-kappaB activation or JNK suppression. **Breast Cancer Res. Treat.** 100, 49-58. 2006

Leo C, Horn LC, Hockel M. Hypoxia and expression of the proapoptotic regulator BNIP3 in cervical cancer. **Int J Gynecol Cancer**; 16: 1314–1320. 2006

Linder S, Aepfelbacher M. Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. **Trends Cell Biol**. 13:376–385, 2003.

Liu Z, Xu J, Colvin JS, Ornitz DM. Coordination of chondrogenesis and osteogenesis by fibroblast growth factor 18. **Genes Dev**. 1;16(7):859-69.2002

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.25(4):402-8.2001

Mackay DJ, Esch F, Furthmayr H, Hall A. Rho- and rac-dependent assembly of focal adhesion complexes and actin filaments in permeabilized fibroblasts:an essential role for ezrin/radixin/moesin proteins. **J Cell Biol**; 138:927,1997

Marshall CJ. Protein prenylation: a mediator of protein-protein interactions. **Science**. Mar 259(5103):1865-6 1993.

Martinez-Climent, J. A., Andreu, E. J. and Prosper, F. Somatic stem cells and the origin of cancer. **Clin Transl Oncol**, 8(9): 647-663, 2006.

Matsui, T., Amano, M., Yamamoto, T., Chihara, K., Nakafuku, M., Ito, M., Nakano, T. Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. **EMBO Journal**, 15, 2208–2216. 1996

McCudden CR, James KA, Hasilo C, Wagner GF. Characterization of mammalian stanniocalcin receptors. Mitochondrial targeting of ligand and receptor for regulation of cellular metabolism. **J Biol Chem** 277: 45249–45258, 2002.

McGlade J, Brunkhorst B, Anderson D, Mbamalu G, Settleman J, Dedhar S, Rozakis AM, Chen LB, Pawson T. The N-terminal region of GAP regulates cytoskeletal structure and cell adhesion. **EMBO J**. 12:3073–3081, 1993.

McMahon GA, Petitclerc E, Stefansson S, et al., Plasminogen activator inhibitor-1 regulates tumor growth and angiogenesis. **J Biol Chem**; 276: 33964-8. 2001

Meijerink E, Kozulic B, Stranzinger G, Neuenschwander S. Picogram cloning and direct in situ sequencing of DNA from gel pieces. **Biotechniques**.;31(4):802-4, 806, 808, 810. 2001

Millar S.E. Smad7: Licensed to Kill b-Catenin. Developmental Cell 11, September, 2006

Mizuno T, Kaibuchi K, Yamamoto T, Kawamura M, Sakoda T, Fujioka H, Matsuura Y, Takai Y. A stimulatory GDP/GTP exchange protein for smg p21 is active on the post-translationally processed form of c-Ki-ras p21 and rhoA p21. **Proc Natl Acad Sci U S A**. Aug 1;88(15):6442-6, 1991.

Molnár G, Dagher MC, Geiszt M, Settleman J, Ligeti E. Role of Prenylation in the Interaction of Rho-Family Small GTPases with GTPase Activating Proteins **Biochemistry**, 4:10542-10549, 2001.

Morin P, Flors C, Olson MF. Constitutively active RhoA inhibits proliferation by retarding G1 to S phase cell cycle progression and impairing cytokinesis. **European** Journal of Cell Biology 88:495–507, 2009.

Mu XC, Higgins PJ. Differential growth state-dependent regulation of plasminogen activator inhibitor type-1 expression in senescent IMR-90 human diploid fibroblasts. **J. Cell Physiol**. 165, 647–657, 1995.

Muraoka, O., Shimizu, T., Yabe, T., Nojima, H., Bae, Y. K., Hashimoto, H. and Hibi, M. Sizzled controls dorso-ventral polarity by repressing cleavage of the Chordin protein. **Nat. Cell Biol.** 8, 329-338.2006

Nakahara H, Mueller SC, Nomizu M, Yamada Y, Yeh Y, Chen WT. Activation of beta1 integrin signaling stimulates tyrosine phosphorylation of p190RhoGAP and membraneprotrusive activities at invadopodia. **J. Biol. Chem**. 273:9–12, 1998.

Nakakuki T, Ito M, Iwasaki H, Kureishi Y, Okamoto R, Moriki N, Kongo M, Kato S, Yamada N, Isaka N, Nakano T. Rho/Rho-kinase pathway contributes to C-reactive

protein-induced plasminogen activator inhibitor-1 expression in endothelial cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 25(10):2088-93, 2005.

Nakayama Y, Komuro R, Yamamoto A, Miyata Y, Tanaka M, Matsuda M, Fukuhara A, Shimomura I. RhoA induces expression of inflammatory cytokine in adipocytes. **Biochem Biophys Res Commun**. 6;379(2):288-92, 2009.

Nobes CD ,Hall A. Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. **J Cell Biol**.22;144(6):1235-44, 1999

Nobes CD, Lauritzen I, Mattei MG, Paris S, Hall A, Chardin P. A new member of the Rho family, Rnd1, promotes disassembly of actin filament structures and loss of cell adhesion. **J. Cell Biol**. 141, 187–197 (1998).

Nomanbhoy TK, Erickson JW, Cerione RA. Kinetics of Cdc42 membrane extraction by Rho-GDI monitored by real-time fluorescence resonance energy transfer. **Biochemistry**. 9;38(6):1744-50, 1999.

Odero MD, Grand FH, Iqbal S, Ross F, Roman JP, Vizmanos JL, Andrieux J, Laï JL, Calasanz MJ, Cross NC. Disruption and aberrant expression of HMGA2 as a consequence of diverse chromosomal translocations in myeloid malignancies. **Leukemia**.;19(2):245-52.2005

Ohno, S., Noshiro, M., Makihira, S., Kawamoto, T., Shen, M., Yan, W., Kawashim-Ohya, Y., Fujimoto, K., Tanne, K., and Kato, Y. **Biochim. Biophys. Acta** 1451, 196– 205.1999

Olson MF, Ashworth A, Hall A. An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. **Science** 269:1270–1272, 1995.

Ossowski L, Aguirre-Ghiso JA. Urokinase receptor and integrin partnership: coordination of signaling for cell adhesion, migration and growth. **Curr Opin Cell Biol**.;12(5):613-20. Review. 2000

Palmer, R.E., Kotsianti, A., Cadman, B., Boyd, T., Gerald, W. and Haber, D.A. WT1 regulates the expression of the major glomerular podocyte membrane protein podocalyxin. **Curr. Biol.**, 11, 1805–1809. 2001

Peck J, Douglas GT, Wu CH, Burbelo PD. Human RhoGAP domain-containing proteins: structure, function and evolutionary relationships. **FEBS Lett**. 528, 27–34, 2002.

Perona R, Montaner S, Saniger L, Sanchez-Perez I, Bravo R, Lacal JC. Activation of the nuclear factor-jB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. **Genes Dev**. 11:463-475, 1997.

Prabhakaran K, Li L, Zhang L, Borowitz JL, Isom GE. Upregulation of BNIP3 and translocation to mitochondria mediates cyanide-induced apoptosis in cortical cells. **Neuroscience**; 150: 159–167. 2007

Prendergast GC. Actin' up: RhoB in cancer and apoptosis. Nat. Rev. Cancer 1:162–168, 2001.

Qiu R, Chen J, McCormick F, Symons MX. A role for Rho in Ras transformation **Proc.** Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92, 11781–11785, 1995

Rawe, I. M., Zhan, Q., Burrows, R., Bennett, K., and Cintron, C. Invest.Ophthalmol.& Visual Sci. 38, 893–900.1997

Regula KM, Ens K, Kirshenbaum LA. Inducible expression of BNIP3 provokes mitochondrial defects and hypoxia-mediated cell death of ventricular myocytes. **Circ Res** 91: 226–231, 2002.

Ren XD, Kiosses WB, Schwartz MA.. Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. **The EMBO Journal** Vol.18 No.3 pp.578– 585, 1999

Ren XD, Schwartz MA. Determination of GTP loading on Rho. Methods Enzymol. 325:264-72, 2000.

Ridley AJ, Hall A. The small GTP-binding protein Rho regulates the assembly of focal adhesions and stress fibers in response to growth factors. **Cell** 70, 389–399, 1992.

Ridley AJ, Paterson CL, Johnston CL, Diekmann D, Hall A. The small GTP-binding protein Rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. **Cell** 70, 401–410, 1992.

Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR. Cell migration: integrating signals from front to back. **Science** 302 1704–1709, 2003.

Ridley AJ, Self AJ, Kashmi F, Paterson HF, Hall A, Marshall CJ, Ellis C. Rho family GTPase activating proteins p190, Bcr and RhoGAP show distinct specificities in vitro and in vivo. **EMBO J**. 12:5151–5160, 1993.

Ridley AJ. Rho family proteins: coordinating cell responses. **Trends Cell Biol**. 11 471–477, 2001.

Ridley AJ. Rho GTPases and cell migration. J. Cell Sci. 114:2713–2722, 2001.

Ridley AJ. Rho proteins and cancer. Breast Cancer Res. Treat. 84:13–19, 2004.

Ridley, A.J., Comoglio, P.M., and Hall, A. Regulation of scatter factor/hepatocyte growth factor responses by Ras, Rac, and Rho in MDCK cells. **Mol. Cell. Bio**l. 15, 1110–1122. 1995

Ridley. Rho GTPases. Integrating integrin signaling. J. Cell Biol. 150:107–109, 2000.

Riento K, Ridley AJ. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. 4:446–456, 2003.

Rodriguez, J., Esteve, P., Weinl, C., Ruiz, J. M., Fermin, Y., Trousse, F., Dwivedy, A., Holt, C. and Bovolenta, P. SFRP1 regulates the growth of retinal ganglion cell axons through the Fz2 receptor. *Nat. Neurosci.* 8, 1301-1309. 2005

Roof RW, Haskell MD, Dukes BD, Sherman N, Kinter M, Parsons SJ. Phosphotyrosine (p-Tyr)-dependent and -independent mechanisms of p190 RhoGAP–p120 RasGAP interaction: Tyr1105 of p190, a substrate for c-Src, is the sole p-Tyr mediator of complex formation. **Mol. Cell. Biol**. 18:7052–7063, 1998.

Sahai E, Marshall C J. RHO-GTPases and cancer **Nat. Rev. Cancer**. 2:133–142, 2002. Sakamoto T, Ishibashi T, Sugimoto K, Sakamoto N, Ohkawara H, Niinuma M, Nagata K, Kamioka M, Sugimoto N, Watanabe A, Kurabayashi M, Takuwa Y, Maruyama Y. RhoA-dependent PAI-1 gene expression induced in endothelial cells by monocyte adhesion mediates geranylgeranyl transferase I and Ca2+ signaling. **Atherosclerosis**. 193(1):44-54 2007.

Samarakoon R, Higgins CE, Higgins SP, Higgins PJ. Differential requirement for MEK/ERK and SMAD signaling in PAI-1 and CTGF expression in response to microtubule disruption. **Cell Signal**. 21(6):986-95, 2009.

Samarakoon R, Higgins SP, Higgins CE, Higgins PJ. TGF-beta1-induced plasminogen activator inhibitor-1 expression in vascular smooth muscle cells requires pp60(c-src)/EGFR(Y845) and Rho/ROCK signaling. J **Mol Cell Cardiol**. 44(3):527-38, 2008.

Sánchez C, Mendoza P, Contreras HR, Vergara J, McCubrey JA, Huidobro C, Castello EA. Expression of Multidrug Resistance Proteins in Prostate Cancer Is Related With Cell Sensitivity to Chemotherapeutic Drugs. **The Prostate**, 69:1448 -1459 2009.

Sandau US, Handa RJ. Glucocorticoids exacerbate hypoxia-induced expression of the proapoptotic gene Bnip3 in the developing cortex. **Neuroscience**, 144: 482–494. 2007.

Saras J, Heldin CH. PDZ domains bind carboxy-terminal sequences of target proteins. **Trends Biochem. Sci**. 21:455–458, 1996.

Sassetti, C., Tangemann, K., Singer, M.S., Kershaw, D.B. and Rosen, S.D. Identification of podocalyxin-like protein as a high endothelial venule ligand for L-selectin: parallels to CD34. J. Exp. Med., 187, 1965–1975.1998.

Schaefer L, Prakash S, Zoghbi HY. Cloning and characterization of a novel rhotype GTPase-activating protein gene (ARHGAP6) from the critical region for microphthalmia with linear skin defects. **Genomics.** 46:268–277, 1997.

Schmidt A, Hall A. Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. **Genes Dev**. 16:1587–609, 2002.

Seabra MC. Membrane association and targeting of prenylated Ras-like GTPases. **Cell Signal**. 10(3):167-72 1998.

Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. **Cell** 88:593–602, 1997.

Settleman J, Albright CF, Foster LC, Weinberg RA. Association between GTPase activators for Rho and Ras families. **Nature.** 359:153–154, 1992.

Settleman J, Narasimhan V, Foster LC, Weinberg RA. Molecular cloning of cDNAs encoding the GAP-associated protein p190: implications for a signaling pathway from ras to the nucleus. **Cell** 69:539–549, 1992.

Shaida N, Launchbury R, Boddy JL, Jones C, Campo L, Turley H et al., Expression of BNIP3 correlates with hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha, HIF-2alpha and the androgen receptor in prostate cancer and is regulated directly by hypoxia but not androgens in cell lines. **Prostate**; 68: 336–34. 2008

Shao F, Dixon JE. YopT is a cysteine protease cleaving Rho family GTPases. Adv Exp Med Biol.;529:79-84, 2003.

Shaw J, Zhang T, Rzeszutek M, Yurkova N, Baetz D, Davie JR et al., Transcriptional silencing of the death gene BNIP3 by cooperative action of NF-kappaB and histone deacetylase 1 in ventricular myocytes. **Circ Res**; 99: 1347–1354. 2006

Shaw J, Zhang T, Rzeszutek M, Yurkova N, Baetz D, Davie JR et al., Transcriptional silencing of the death gene BNIP3 by cooperative action of NF-kappaB and histone deacetylase 1 in ventricular myocytes. **Circ Res**; 99: 1347–1354. 2006.

Shibata K, Kikkawa F, Nawa A, Thant AA, Naruse K, Mizutani S, Hamaguchi M. Both focal adhesion kinase and c-Ras are required for the enhanced matrix metalloproteinase 9 secretion by fibronectin in ovarian cancer cells. **Cancer Res** 58: 900–903, 1998.

Shimoaka T, Ogasawara T, Yonamine A, Chikazu D, Kawano H, Nakamura K, Itoh N, Kawaguchi H. Regulation of osteoblast, chondrocyte, and osteoclast functions by fibroblast growth factor (FGF)-18 in comparison with FGF-2 and FGF-10. **J Biol Chem.** 1;277(9):7493-500. 2002.

Skonier, J., Benenett, K., Rothwell, V., Kosowski, S., Plowman, G., Wallace, P., Edelhoff, S., Disteche, C., Neubauer, M., Marquardt, H., Rodgers, J., and Purchio, A. F. **DNA Cell Biol**. 13, 571–584, 1994

Somasiri A, Nielsen JS, Makretsov N, et al., Overexpression of the anti-adhesin podocalyxin is an independent predictor of breast cancer progression. **Cancer Res**;64:5068–73. 2004.

Sordella R, Jiang W, Chen GC, Curto M, Settleman J. Modulation of Rho GTPase signaling regulates a switch between adipogenesis and myogenesis. **Cell** 113, 147–158, 2003.

Sousa S, Cabanes D, Archambaud C, Colland F, Lemichez E, Popoff M, Boisson-Dupuis S, Gouin E, Lecuit M, Legrain P, Cossart P. ARHGAP10 is necessary for alphacatenin recruitment at adherens junctions and for Listeria invasion. **Nat Cell Biol**.;7(10):954-60. 2005

Sowter HM, Ferguson M, Pym C, Watson P, Fox SB, Han C et al., Expression of the cell death genes BNip3 and NIX in ductal carcinoma in situ of the breast; correlation of BNip3 levels with necrosis and grade. **J Pathol**; 201: 573–580. 2003

Stefansson S, Lawrence DA. The serpin PAI-1 inhibits cell migration by blocking integrin $\alpha V\beta 3$ binding to vitronectin. **Nature**; 383: 441-3. 1996

Su L, Agati JM, Parsons SJ. p190RhoGAP is cell cycle regulated and affects cytokinesis. J. Cell Biol. 163:571–582, 2003.

Su ZJ, Hahn CN, Goodall GJ, Reck NM, Leske AF, Davy A, Kremmidiotis G, Vadas MA, Gamble JR. A vascular cell-restricted RhoGAP, p73RhoGAP, is a key regulator of angiogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101:12212–12217, 2004.

Sugiura Y, Ma L, Sun B, The plasminogen-plasminogen activator (PA) system in neuroblastoma: role of PA inhibitor-1 in metastasis. **Cancer Res**; 59: 1327-36. 1999.

Sun H, Breslin JW, Zhu J, Yuan SY, Wu MH. Rho and ROCK signaling in VEGFinduced microvascular endothelial hyperpermeability. **Microcirculation** 13:237 – 247, 2006.

Takaishi, K., Sasaki, T., Kato, M., Yamochi, W., Kuroda, S., Nakamura, T., Takeichi, M., and Takai, Y.. Involvement of Rho p21 small GTP-binding protein and its regulator in the HGF-induced cell motility. **Oncogene** 9, 273–279. 1994

Takeda, T., Go, W.Y., Orlando, R.A. and Farquhar, M.G. Expression of podocalyxin inhibits cell–cell adhesion and modifies junctional properties in Madin–Darby canine kidney cells. **Mol. Biol. Cell**, 11, 3219–3232. 2000

Takeuchi K, Sato N, Kasahara H, et al., Perturbation of cell adhesion and microvilli formation by antisense oligonucleotides to ERM family members. **J Cell Biol**;125:1371–84. 1994

Tang Y, Liu Z, Zhao L, Clemens TL, Cao X. Smad7 stabilizes beta-catenin binding to E-cadherin complex and promotes cell-cell adhesion. **J Biol Chem.** 29;283(35):23956-63. 2008.

Tatsis N, Lannigan DA, Macara IG. The function of the p190 Rho GTPase-activating protein is controlled by its N-terminal GTP binding domain. **J Biol Chem**. 273(51):34631-8, 1998.

Tcherkezian J, Lamarche-Vane N.Current knowledge of the large. RhoGAP family of proteins. Biol. **Cell**, 99, 67–86,2007.

Tcherkezian J, Danek EI, Jenna S, Triki I, Lamarche-Vane N. Extracellular signalregulated kinase 1 interacts with and phosphorylates CdGAP at an important regulatory site. **Mol. Cell. Biol**. 25:6314–6329, 2005.

Teramoto H, Malek RL, Behbahani B, Castellone MD, Lee NH, Gutkind JS. Identification of H-Ras, RhoA, Rac1 and Cdc42 responsive genes. **Oncogene**. 22:2689–2697, 2003.

Teruyama, K., Abe, M., Nakano, T., Takahashi, S., Yamada, S. And Sato, Y. Neurophilin-1 is a downstream target of transcription factor Ets-1 in human umbilical vein endothelial cells. **FEBS Lett**., 504, 1–4.2001.

Thapa N, Lee BH, Kim IS: TGFBIp/betaig-h3 protein: a versatile matrix molecule induced by TGF-beta. **Int J Biochem Cell Biol**, 39: 2183-94.2007.

Tikoo A, Czekay S, Viars C, White S, Heath JK, Arden K, Maruta H. p190-A, a human tumor suppressor gene, maps to the chromosomal region 19q13.3 that is reportedly deleted in some gliomas. **Gene**. 257:23–31, 2000.

Tracy K, Dibling BC, Spike BT, Knabb JR, Schumacker P, Macleod KF. BNIP3 is an RB/E2F target gene required for hypoxia-induced autophagy. Mol Cell Biol; 27:6229–6242, 2007.

Tusher VG, Tibshirani R, Chu G.Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 24;98(9):5116-21. 2001

Van Aelst L, D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and signaling networks. Genes & Dev. 11:2295–2322 1997.

Van Golen KL, Wu ZF, Qiao XT, Bao L, Merajver SD. HIF-1alpha mRNA and protein upregulation involves Rho GTPase expression during hypoxia in renal cell carcinoma, **Neoplasia** 2:418–425, 2000.

Van Golen KL, Wu ZF, Qiao XT, Bao LW, Merajver SD. RhoC GTPase, a novel transforming oncogene for human mammary epithelial cells that partially recapitulates the inflammatory breast cancer phenotype; **Cancer Res.** 60:5832–5838, 2000.

Van Nieuw Amerongen GP, Koolwijk P, Versteilen A, Van Hinsbergh VW. Involvement of RhoA/Rho kinase signaling in VEGF-induced endothelial cell migration and angiogenesis in vitro. Arterioscler. Thromb. **Vasc. Biol.** 23:211 – 217, 2003.

Varghese R, Wong CK, Deol H, Wagner GF, DiMattia GE. Comparative analysis of mammalian stanniocalcin genes. **Endocrinology**.;139(11):4714-25. 1998 Vêncio RZ, Koide T .HTself: self-self based statistical test for low replication microarray studies. **DNA Res**.;12(3):211-4, 2005.

Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, et al. The sequence of the human genome. **Science**. 291:1304–1351, 2001.

Villalonga P, Ridley AJ. Rho GTPases and cell cycle control. **Growth Factors** 24:159–164, 2006.

Wang DZ, Nur EKMS, Tikoo A, Montague W, Maruta H. The GTPase and Rho GAP domains of p190, a tumor suppressor protein that binds the Mr 120,000 Ras GAP, independently function as anti-Ras tumor suppressors. **Cancer Res**. 57:2478–2484, 1997.

Wang L, Yang L, Luo Y, Zheng Y. A novel strategy for specifically down-regulating individual Rho GTPase activity in tumor cells. **J Biol Chem**. Nov 7;278(45):44617-25 2003.

Watanabe N, Madaule P, Reid T, Ishizaki T, Watanabe G, Kakizuka A, et al. p140mDia, a mammalian homolog of Drosophila diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. **EMBO Journal**. 16:3044–3056, 1997.

Wong CM, et al. Genetic and epigenetic alterations of DLC-1 gene in hepatocellular carcinoma. **Cancer Res**. 63:7646–7651, 2003.

Wu M, Wu ZF, Kumar-Sinha C, Chinnaiyan A, Merajver SD. RhoC induces differential expression of genes involved in invasion and metastasis in MCF10A breast cells. **Breast Cancer Res. Treat**. 84:3–12, 2004.

Yabe, T., Shimizu, T., Muraoka, O., Bae, Y. K., Hirata, T., Nojima, H., Kawakami, A., Hirano, T. and Hibi, M. Ogon/Secreted Frizzled functions as a negative feedback regulator of Bmp signaling. *Development* 130, 2705-2716. 2003.

Yao L, Janmey P, Frigeri LG, Han W, Fujita J, Kawakami Y, Apgar JR, Kawakami T. Pleckstrin homology domains Interact with filamentous actin. **J. Biol. Chem**. 274:19752–19761, 1999.

Yeung HY, Lai KP, Chan HY, Mak NK, Wagner GF, Wong CK. Hypoxia-inducible factor-1-mediated activation of stanniocalcin-1 in human cancer cells. **Endocrinology**.;146(11):4951-60. 2005.

Yoshioka K, Matsumura F, Akedo H, Itoh K. J. Biol. Chem. 273:5146–5154, 1998.

Zhang H, Teng Y, Kong Y, Kowalski PE, Cohen SN. Suppression of human tumor cell proliferation by Smurf2-induced senescence..**J Cell Physiol**. ;215(3):613-20.2008.

Zhao R, et al. Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. **Genes Dev.**14:981–993, 2000.

Zhou X, Benson KF, Ashar HR, Chada K. Mutation responsible for the mouse pygmy phenotype in the developmentally regulated factor HMGI-C. **Nature**. 31;376(6543):771-4.1995.

Zohn IM, Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL, Der CJ. Oncogene 17:1415–1438, 1998.

Zrihan-Licht, S., Fu, Y., Settleman, J., Schinkmann, K., Shaw, L,Keydar, I., Avraham, S. and Avraham. HRAFTK/Pyk2 tyrosine kinase mediates the association of p190 RhoGAP with RasGAP and is involved in breast cancer cell invasion. **Oncogene.** 19, 1318–1328, 2000.

ANEXOS
Anexo I

· · ·



FACULDADE DE CIÈNCIAS MÉDICAS COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA © Caixa Postal 6111 13083-970 Campinas, SP @ (0_19) 3788-8935 fax (0_19) 3788-8925 @ cao@heac.fcm.unicamp.br

CEP, 19/11/02 (Grupo III)

PARECER PROJETO: Nº 458/2002

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS GENES HUMANOS RELACIONADOS AOS GENES DAS PROTEÍNAS DO CITOESQUELETO DE ESPECTRINA" PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Sara Teresinha Olalla Saad

INSTITUIÇÃO: Hemocentro/UNICAMP APRESENTAÇÃO AO CEP: 21/10/2002

II - OBJETIVOS

A pesquisa visa verificar a função de novas proteínas em diferentes tipos de células. Trata-se de um estudo comparativo para: a) determinar os diferentes tecidos humanos em que os genes codificam as ESTs homólogas às proteínas citoesqueléticas são expressos através da utilização da técnica de Northern Blotting muti-tecidual; b) obter a sequência completa do cDNA correspondente a cada uma das diferentes ESTs estudadas a partir de ESTs depositadas em banco de dados, através de bio-informática e/ou através do método de RACE ou PVR de bibliotecas de cDNA com o objetivo de se ter acesso à estrutura primária da proteína codificada por estes genes; c) produzir "macroarrays"de ESTs homólogas a genes do citoesqueleto para verficar a expressão diferencial destes genes em tecidos normais e tumores; d) identificar proteínas de ligação do domínio SH3 da alfa-espectrina em células hematopoéticas usando um ensaio "in vivo" baseado em levedura; e) identificar proteínas de ligação do domínio de cauda e do domínio rico em serina e treonina das anquirinas gigantes m tecido cerebral, usando um ensaio "in vivo" baseado em levedura; f) após a caracterização da sequência de aminoácidos dos novos genes clonados, determinar a localização celular destas proteínas, através da técnica de imunolocalização fluorescente; g) em camundongos, obter a sequência do cDNA das proteínas de maior interesse com o objetivo de se realizar estudos funcionais; h) dependendo da localização das proteínas, realizar estudos funcionais para avaliar o papel destas proteínas nos teciudos encontrados e i) avaliar a expressão do mRNA e da proteína em células de pacientes portadores de neoplasias, cardiopatias, doenças neurológicas e renais e comparar com células normais.

III - SUMÁRIO

Serão estudados cerca de 50 pacientes adultos, maiores de 18 anos de idade, de ambos os sexos, atendidos no complexo hospitalar da UNICAMP, com doenças neoplásicas, como por exemplo leucemias agudas e crônicas, linfomas e mieloma múltiplo, assim como pacientes portadores de cardiopatia, doenças neurológicas, doenças renais. Dependendo da função e localização das proteínas identificadas, será verificado se estas apresentam alteração da expressão em tecido normais e anormais. Para tanto serão analisados 20 ml de sangue periférico, ou 2 ml de medula óssea ou fragmentos de tecido submetidos à biópsia a serem analisados por imunohistoquímica, imunocitoquímica, western blotting ou quantiuficação mRNA. Exceto sangue periférico e medula óssea não será coletado material especificamente para este projeto, mas serão utilizados material de arquivo ou fragmento de material coletado para biópsia com fins diagnósticos. O estudo não explicita critérios de exclusão. Os resultados obtidos serão comparados com o de controless não portadores das doenças em questão. Como controle periférico serão utilizados glóbulos brancos obtidos em bolsas de sangue de doadores voluntários e normais. deleucocitadas pelo sistema top-bottom no Hemocentro da UNICAMP. Como controle de medula óssea será utilizado material de medula óssea obtido de pacientes portadores de púrpura trombocitopênica idiopática. A coleta de material de medula é rotina nestes casos. A metodologia a ser seguida é compatível com as questões que o estudo formula e as condições para sua realização, adequadas.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Não há riscos envolvidos no estudo, o termo de consentimento está formulado de maneira clara e objetiva, tematizando os principais pontos sob exame: anonimato garantido, liberdade para retirada do estudo independente do manutenção do atendimento, sigilo.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e 251/97, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na integra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

Atenção: Projetos de Grupo I serão encaminhados à CONEP e só poderão ser iniciados após Parecer aprovatório desta.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na XI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 19 de novembro de 2002.

Amonthin Arcingo

Prof. Dr. Sebastião Araújo ⁷ PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA FCM / UNICAMP



Apêndice I

Símbolo do gene	Descrição	Mudança de expressão
ASPH	Aspartate beta-hydroxylase	1,40
ELK3	ETS-domain protein (SRF accessory protein 2)	1,40
NAP1L5	Nucleosome assembly protein 1-like 5	1,40
CD59	CD59 molecule, complement regulatory protein	1,40
THC2364247	Q6ZPH3 MKIAA1840 protein (Fragment), partial (4%)	1,40
PAQR9	Progestin and adipoQ receptor family member IX	1,40
TFPI	Tissue factor pathway inhibitor	1,40
UAP1	UDP-N-acteylglucosamine pyrophosphorylase 1	1,40
DNAJB9	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9	1,40
ALS2CR2	Homo sapiens amyotrophic lateral sclerosis 2 (juvenile) chromosome region, candidate 2	1,40
PLEKHC1	Pleckstrin homology domain containing, family C (with FERM domain) member 1	1,40
FRMD6	FERM domain containing 6	1,40
ITGA6	Integrin, alpha 6	1,40
TIA1	TIA1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein	1,41
MTMR9	Myotubularin related protein 9	1,41
ENST00000339700	cDNA FLJ39633 fis	1,42
MYBBP1A	Homo sapiens MYB binding protein (P160) 1a	1,42

Genes diferencialmente expressos obtidos através de análise de microarranjos de DNA em células HUVECs com inibição da expressão de ARHGAP21

CAPSL	Calcyphosine-like	1,42
OSTM1	Osteopetrosis associated transmembrane protein 1	1,50
HSPA6	Heat shock 70kDa protein 6	1,42
PPM1K	Protein phosphatase 1K (PP2C domain containing)	1,42
PTX3	Homo sapiens pentraxin-related gene, rapidly induced by IL-1 beta	1,43
BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	1,43
YOD1	YOD1 OTU deubiquinating enzyme 1	1,43
PDZD2	PDZ domain containing 2	1,43
LOC389833	Similar to hypothetical protein MGC27019	1,44
IL1RAP	Interleukin 1 receptor accessory protein	1,44
WNK4	WNK lysine deficient protein kinase 4	1,44
CASP7	caspase 7, apoptosis-related cysteine peptidase	1,44
TAF13	TAF13 RNA polymerase II	1,44
ZNF467	Zinc finger protein 467	1,45
CHD7	Chromodomain helicase DNA binding protein 7	1,45
PPIC	Peptidylprolyl isomerase C (cyclophilin C)	1,45
FLJ40432	Hypothetical protein FLJ40432	1,45
PPARG	Homo sapiens peroxisome proliferative activated receptor	1,45
CFL2	Cofilin 2 (muscle)	1,46
ENST00000379187	Unknown	1,47
CHIC1	Cysteine-rich hydrophobic domain 1	1,47

AOX1	Aldehyde oxidase 1	1,47
PGAM1	Phosphoglycerate mutase 1	1,47
AK095707	cDNA FLJ38388 fis, clone FEBRA2004485	1,47
CDK5R2	Cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 2 (p39)	1,47
PTPRO	Protein tyrosine phosphatase	1,47
ENST00000381929	Mucin 4 (MUC4) mRNA, partial cds	1,48
BAMBI	BMP and activin membrane-bound inhibitor	1,48
PAG1	Phosphoprotein associated with glycosphingolipid microdomains 1	1,48
CREB5	cAMP responsive element binding protein 5	1,48
COL13A1	Collagen, type XIII, alpha 1	1,48
TBC1D9	TBC1 domain family, member 9	1,49
THC2309312	Unknown	1,49
AB014766	Dermal papilla derived protein 12	1,50
THC2339241	Q822A8 Ribonucleoside-diphosphate reductase, beta subunit	1,50
NGFB	Nerve growth factor, beta polypeptide	1,50
SMURF2	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2	1,50
LONRF1	LON peptidase N-terminal domain and ring finger 1	1,51
A_32_P159334	Unknown	1,51
THC2404479	Q9BUA6 (Q9BUA6) Myosin light chain 2, lymphocyte- specific, partial	1,51
NUPL1	KIAA0410 mRNA	1,52

B3GNT5	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N- acetylglucosaminyltransferase 5	1,53
ASPRV1	Homo sapiens aspartic peptidase, retroviral-like 1 (ASPRV1)	1,53
MLL3	Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 3	1,53
ULBP2	UL16 binding protein 2	1,54
FNDC5	Fibronectin type III domain containing 5	1,54
CAMK2D	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaM kinase) II delta	1,55
AK057981	cDNA FLJ25252 fis, clone STM03814	1,55
FOSL1	FOS-like antigen 1	1,55
BX110856	BX110856 Soares adult brain N2b4HB55Y cDNA clone IMAGp998M09331	1,57
DPF3	cDNA FLJ42956 fis, clone BRSTN2009899	1,57
TP53I11	Pig11	1,57
NID1	Nidogen 1	1,58
CLDN12	Claudin 12	1,58
THC2364724	Unknown	1,59
UGCGL2	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase-like 2	1,62
CR613972	cDNA clone CS0DI009YA14 of Placenta Cot 25- normalized of (human)	1,62
DDAH1	Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	1,63
BC030112	cDNA clone IMAGE:4799578	1,63
NAP1L5	Nucleosome assembly protein 1-like 5	1,64
MXRA8	Matrix-remodelling associated 8	1,64

HK2	Hexokinase 2	1,65
SYVN1	Synovial apoptosis inhibitor 1, synoviolin	1,65
AY143171	Testin-related protein TRG mRNA	1,66
LRP1	Low density lipoprotein-related protein 1	1,67
GBP3	Guanylate binding protein 3	1,67
MARCH4	Membrane-associated ring finger (C3HC4) 4	1,67
THC2409569	Unknown	1,67
MGC13017	Similar to RIKEN cDNA A430101B06 gene	1,68
PRKAB2	Protein kinase, AMP-activated, beta 2 non-catalytic subunit	1,68
AK057830	cDNA FLJ25101 fis, clone CBR01328	1,70
ADAM19	ADAM metallopeptidase domain 19 (meltrin beta)	1,70
QKI	Quaking homolog, KH domain RNA binding	1,70
GBP1	Guanylate binding protein 1	1,72
LTBP2	Latent transforming growth factor beta binding protein 2	1,72
MSL3L1	Male-specific lethal 3-like 1	1,73
CD33L3	CD33 molecule-like 3	1,74
GL12	GLI-Kruppel family member GLI2	1,74
THC2389705	Unknown	1,74
AK090499	cDNA FLJ33180 fis, clone ADRGL2003638	1,75
TRAF1	TNF receptor-associated factor 1	1,76
IGF2BP2	Insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 2	1,77

THC2316768	Unknown	1,77
PODXL	Podocalyxin-like	1,78
FLJ40722	Homo sapiens hypothetical protein FLJ40722	1,78
DICER1	Dicer1	1,81
KRT14	Keratin 14	1,82
THC2315472	Unknown	1,82
KCNK4	potassium channel, subfamily K, member 4	1,86
NR4A3	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	1,91
SERF2	Homo sapiens small EDRK-rich factor 2	1,92
COL4A1	Collagen, type IV, alpha 1	1,92
SLC16A9	Solute carrier family 16, member 9	1,95
CR601694	Full-length cDNA clone CS0DM011YL19 of Fetal liver of (human)	1,95
HMGA2	High mobility group AT-hook 2	1,95
NR2F1	Nuclear receptor subfamily 2, group F, member 1	1,97
CF143262	Homo sapiens cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor	2,02
AF088007	Full length insert cDNA clone YY74A01	2,02
ANGPTL4	Angiopoietin-like 4	2,05
FRZB	Frizzled-related protein	2,58
A_32_P171043	Unknown	2,08
FLJ22639	Hypothetical protein	2,08
HP	Haptoglobin	2,11

IDI1	Homo sapiens isopentenyl-diphosphate delta isomerase 1	2,11
FGF18	Fibroblast growth factor 18	2,14
CIAS1	Cold autoinflammatory syndrome 1	2,16
SETD7	SET domain containing 7	2,18
LYG1	Homo sapiens lysozyme G-like 1	2,19
NEK7	NIMA (never in mitosis gene -related kinase 7	2,20
NDRG1	N-myc Downstream regulated gene 1	2,25
GAL3ST1	Galactose-3-O-sulfotransferase 1	2,30
KRTAP2-4	Keratin associated protein 2-4	2,33
SERPINE1	Serpin peptidase inhibitor, clade E	2,34
AOC3	Amine oxidase, copper containing 3 (vascular adhesion protein 1)	2,43
ACTA1	Actin, alpha 1, skeletal muscle	2,44
C5orf23	Chromosome 5 open reading frame 23	2,58
STC1	Homo sapiens stanniocalcin 1	2,61
AVIL	Advillin	2,65
THC2249938	ADP-ribosylation factor-like 9, complete	2,66
HOM-TES-103	Intermediate filament family orphan (IFFO)	2,76
BAAT	bile acid Coenzyme A: amino acid N-acyltransferase (glycine N-choloyltransferase)	2,82
MGC35361	Hypothetical protein	-1,66
ALDH1A3	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3	-1,68
AF070620	Clone 24694 mRNA sequence.	-1,68

MRPL34	Mitochondrial ribosomal protein L34	-1,68
LCN2	Lipocalin 2 (oncogene 24p3)	-1,71
FOS	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	-1,72
ALDH18A1	Aldehyde dehydrogenase 18 family, member A1	-1,74
YPEL1	Yippee-like 1	-1,75
LYNX1	Ly6/neurotoxin 1	-1,77
THC2351317	Unknown	-1,77
STON1	Stonin 1 (STON1)	-1,92
THC2340363	ALU5_HUMAN (P39192) Alu subfamily SC sequence contamination	-1,98
LOC205251	LOC205251, mRNA cDNA clone IMAGE:5763979)	-2,00
TMEM56	Transmembrane protein 56	-2,83
ARHGAP21	Rho GTPase activating protein 21	-3,77

Apêndice II

Genes diferencialmente expressos obtidos através de análise de microarranjos de DNA em células LNCaPs com inibição da expressão de ARHGAP21

Símbolo do gene	Descrição	Mudança de expressão
HIST1H2BB	Histone 1, H2BB	0.99
CKS1B	Cdc28 Protein Kinase Regulatory Subunit 1B	1,03
ATP7A	ATPase, CU++ transporting, alpha polypeptide (menkes syndrome)	1,04
SLC2A1	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member	1,14
PRSS23	Protease, Serine, 23	1,29
SELT	Selenoprotein T	1,29
VDAC3	Voltage-dependent anion channel 3	1,31
PAPSS2	3'-Phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2	1,33
NRBP1	Nucelar receptor binding protein 1	1,33
TFPI2	Tissue factor oathway inhinitor 2	1,34
CNIH4	Cornichon homolog 4 (drosophila)	1,34
FUT11	Fucosyltransferase 11 (alpha (1,3) fucosyltransferase)	1,34
HAVCR1	Hepatitis A vírus cellular receptor al	1,35
PANX1	Pannexin 1	1,35
RNF182	Ring finger protein 182	1,35
AXL	AXL receptor tyrosine kinase	1,36

TMEM109	Transmemnrane protein 109	1,36
NDRG1	N-Myc Downstream regulated gene 1	1,37
PLOD2	Procollagen –lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	1,37
PGAM4	Phosphoglycerate mutase family member 4	1,38
S100A16	S100 calcium binding protein A16	1,38
SMTN	Smoothelin	1,39
HIST2H2BE	Histone 1, H2BB	1,4
CFL2	Cofilin 2 (muscle)	1,4
LOC653653	Similar to adaptor-related protein complex 1 sigma 2 subunit	1,4
KIAA0101	KIAA0101	1,41
SKP2	S-phase kinase-associates protein 2 (P45)	1,42
STARD3NL	Stard3 N-terminal like	1,43
PGAM1	Phosphoglycerate mutase 1 (brain)	1,44
PLAUR	Plasminogen activator, urokinase receptor	1,44
PEA15	Phosphoprotein enriched in astrocytes 15	1,44
HK2	Hexokinase 2	1,45
LOC401152	HCV F-transactivated protein 1	1,45
PMP22	Peripheral myelin protein 22	1,46
HIG2	Hypoxia-inducible protein 2	1,46
TMEM14A	Transmembrane protein 14A	1,46
ENO2	Enolase 2 (gamma, neuronal)	1,47

PFDN1	Prefoldin subunit 1	1,47
GGH	Gamma-glutamyl hydrolase	1,48
NID1	Nidogen 1	1,49
TGFBI	Transforming growth factor, beta-induced, 68kDa	1,5
FKSG14	Leucine zipper protein FKSG14	1,5
UAP1	UDP-N-Acteylglucosamine pyrophosphorylase 1	1,51
C3ORF28	Chromosome 3 open reading frame 28	1,51
PODXL	Podocalyxin-like	1,52
MYBL2	V-Myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)- like 2	1,52
C14ORF112	Chromossome 14 open reading frame 112	1,52
PPIF	Peptidylprolyl isomerase F (cyclophilin F)	1,53
C180RF55	Chromosome 18 open reading frame 55	1,53
MED31	Mediator of RNA polymerase II transcription, subunit 31	1,53
TSPAN6	Tetraspanin 6	1,54
CHRNB1	Choliner receptor, nicotinic, beta 1 (muscle)	1,55
TMEM40	Transmembrane protein 40	1,58
GJA1	GAP junction protein, alpha 1, 43 kDa (connexin 43)	1,6
AADACL1	Arylacetamide deacetylase-like 1	1,63
GLRX	Glutaredoxin (thioltransferase)	1,65
PSG4	Pregnancy specific beta-1 glycoprotein 4	1,73
STC1	Stanniocalcin 1	1,74

BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	1,75
VLDLR	Very low density lipoprotein receptor	1,79
PTX3	Pentraxin-related gene, rapidly induced by IL-1 beta	1,82
RGS2	Regulator of G-protein signaling 2, 24kDa	1,9
TGFB2	Transforming growth factor, beta 2	2,11
GDF15	Growth differentiation factor 15	-1,60
PADI2	Peptidyl arginine deiminase, type II	-1,60
LCN2	Lipocalin 2 (oncogene 24P3)	-1,64
SYNE2	Spectrin repeat containing, nuclear envelope 2	-1,76
SLC7A11	Solute carrier family 7, member 11	-1,97
ARHGAP21	Rho GTPase activating protein 21	-3,25

Apêndice III

Símbolo do gene	Descrição
NID1	Nidogen 1
PODXL	Podocalyxin-like
PTX3	Pentraxin-related gene, rapidly induced by IL-1 beta
CFL2	Cofilin 2 (muscle)
LCN2	Lipocalin 2 (oncogene 24P3)
BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3
NDRG1	N-Myc Downstream regulated gene 1
STC1	Stanniocalcin 1
HK2	Hexokinase 2
PGAM1	Phosphoglycerate mutase 1 (brain)
UAP1	UDP-N-Acteylglucosamine pyrophosphorylase 1

Genes diferencialmente expressos obtidos através de análise de microarranjos de DNA em células HUVECs e LNCaPs com inibição da expressão de ARHGAP21

Apêndice IV

Ensaios de GST-Pull Down para avaliar a atividade de Cdc42 em células HUVECs e LNCaP submetidas à inibição de ARHGAP21



A inibição de ARHGAP21 em células LNCaP e HUVECs não altera a atividade de Cdc42 em células LNCaP. Ensaios de GST-Pull Down com o domínio de ligação a Cdc42 da proteína efetora Wasp foram realizados para avaliar a atividade Cdc42 em células HUVECs (A) e LNCaP (B) submetidas a inibição de ARHGAP21. Não houve diferença na atividade de Cdc42 (Cdc42 GTP) em ambas as células submetidas à inibição de ARHGAP21 (siRNA ARHGAP21) comparadas às celulas controle. Note a diminuição da atividade de Cdc42 em células HUVECs submetidas à inibição da expressão de RhoA (siRNA RhoA).

Apêndice V

Descrição das principais funções de PAI-1, PODXL, FGF18, SMURF2, BNIP3, STC1, HMGA2 e TGFBI.

1. PAI-1 - Plasminogen activator inhibitor-1

PAI-1, ou inibidor do ativador do plasminogenio-1, é o principal inibidor dos ativadores de plasminogênio de tecido (tPA) e uroquinase (uPA), e, portanto, da fibrinólise. Enquanto uPA parece ser mais importante para a geração de plasmina para a degradação da matriz extracelular, a principal função de tPA é a geração da plasmina para a fibrinólise no sangue (Andreasen et al., 2000). Desta forma, PAI-1 possui um papel central na coagulação e sua desregulação pode levar à ocorrência de distúrbios hemorrágicos ou trombóticos.

Além de regular a produção de plasmina, PAI-1 pode influenciar uma variedade de processos normais e patológicos envolvendo migração e adesão celular. Como inibidor de uPA, seria esperado que PAI-1 inibisse a migração celular dependente da ativação do plasminogênio, porém trabalhos descrevem que PAI-1 pode ter funções tanto prómigratórias quanto anti-migratórias (Isogai et al., 2001; Sugiura et al., 1999; Stefansson et al., 1996).

PAI-1 interage com vitronectina, glicoproteína presente no plasma e nos tecidos, que promove a adesão e o espalhamento de células normais e neoplásicas. Quando se liga a vitronectina, PAI-1 bloqueia seus sítios de ligação com integrinas e uPAR, inibindo assim a migração e/ou adesão das células na matriz extracelular (Blasi et al., 2002 e Ossowski et al., 2000). A ligação de PAI-1 com uPA também leva a desativação de integrinas ligadas a uPA, diminuindo a adesão.

Foi descrito que PAI-1 também funciona como um potente regulador da angiogênese. Tratamento de animais com baixas doses de PAI-1 podem estimular a angiogênese tumoral, enquanto altas doses de PAI-1 inibem a angiogênese e o crescimento tumoral (McMahon GA et al., 2001 e Devy L et al., 2002).

Desta forma, PAI-1 possui um papel multifuncional na regulação das atividades migratórias e fibrinolíticas das células vasculares, e é considerado atualmente um dos mais

informativos marcadores de prognóstico em diversos tipos de câncer (Andreasen et al., 1997 e Harbeck et al., 2004).

2. PODXL - Podocalyxin

Outro gene cuja expressão foi aumentado nas células com inibição de ARHGAP21 foi o gene *podocalyxin*. Podocalyxin é uma glicoproteína anti-adesiva expressa abundantemente em células epiteliais dos glomérulos renais. Estudos revelam dois diferentes papéis para a podocalyxin. Em podócitos do glomérulo renal, esta proteína funciona como uma molécula reguladora da filtração (Takeda et al., 2000). Na vasculatura, a podocalyxin atua como uma molécula adesiva nas veias endoteliais, suportando a aderência e o rolamento dos linfócitos através da ligação com a L-selectina (Sassetti et al., 1998). Em HUVECs, a expressão de podocalyxin também foi relacionada com angiogênese, mostrando uma correlação positiva da expressão desta proteína com ETS1, um regulador de angiogênese (Teruyama et al., 2001). Sua expressão em células endoteliais aumentou a adesão, migração e comunicação intercelular (Larrucea et al., 2008).

A podocalyxin foi implicada no desenvolvimento de câncer, principalmente, nas formas mais agressivas. Níveis altos de podocalyxin correlacionaram-se com baixo prognóstico em câncer de mama e esta proteína é comumente expressa por blastos em leucemia aguda e leucemia blástica aguda (Somasiri et al., 2004 e Kelley et al., 2005). Variantes de PODXL foram associados com o risco de obtenção de câncer de próstata bem como a agressividade do tumor (Casey et al., 2006).

Esta proteína é um alvo dos supressores tumorais WT1 e TP53 (Palmer et al., 2001 e Guo et al., 2002). Além disso, a podocalyxin interage com a proteina ezrin, uma das três proteínas ERM (ezrin/radizin/moesin) que regulam diversas funções do citoesqueleto como adesão, migração e morte celular, todas importantes no desenvolvimento tumoral (Takeuchi et al., 1994 e Lamb et al., 1997). As proteínas ERM são ligadas à Rho GTPases por diversas vias de sinalização já descritas (Kotani et al., 1997 e Mackay et al., 1997).

3. FRZB - Frizzled-related protein

Fizzled-related protein pertence à família de proteínas FRZBs ou SFRPs, que é o maior grupo dos inibidores de Wnt. Este gene foi escolhido para a validação porque já foi reportada a interação de ARHGAP21 com a alfa-catenina (Sousa et al., 2005), que por sua vez se liga à beta-catenina. A beta-catenina funciona como um cofator de transcrição com TCF/LEF na via Wnt (Cadigan e Nusse, 1997) e uma proteína estrutural adaptadora, ligando as caderinas ao citoesqueleto de actina na adesão celular (Jamora e Fuchs, 2002). Na ausência de sinalização Wnt, a beta-catenina mantém-se ligada à alfa-catenina e caderinas na membrana plasmática e seus níveis no citoplasma são mantidos baixos através da degradação da proteína em excesso. A sinalização para fosforilação, ubiquitinização e posterior degradação ocorre em um complexo formado por beta-catenina, axin, APC e pela quinase glicogênio sintase-3β (GSK-3β). A ativação da sinalização Wnt leva à inibição da atividade de GSK-3β, resultando no acúmulo de beta-catenina no citoplasma, que então se torna disponível para se ligar a família de fatores de transcrição TCF/LEF e induzir expressão gênica no núcleo (Cadigan e Nusse, 1997).

SERPs possuem outras funções além de inibidores de Wnt. Eles estão envolvidos no direcionamento axonal (Rodriguez et al., 2005) e podem se ligar a outros receptores ou moléculas da matriz (Chuman et al., 2004; Hausler et al., 2004) e interferir na sinalização de BMP (Lee et al., 2006; Muraoka et al., 2006; Yabe et al., 2003), bem como agir como inibidores de proteinases (Lee et al., 2006).

4. FGF18- Fibroblast growth factor 18

FGF18 é um membro da família de fatores de crescimento de fibroblasto (*fibroblast growth factor - FGF*). Os membros desta família possuem uma variedade de atividades celulares ligadas à sobrevivência e proliferação e estão envolvidas em diversos processos biológicos, como desenvolvimento embrionário, morfogênese, reparação tecidual, crescimento tumoral e invasão (Canalis et al., 1991; Hu et al., 1998; Liu et al., 2002; Dailey et al., 2005; Antoine et al., 2006).

FGF18 é expresso em diversos tecidos (Hu et al., 1998; Ellsworth et al., 2002; Kawano et al., 2005), possuindo papel chave na morfogênese, angiogênese e

desenvolvimento de uma variedade de células (Hu et al., 1998; Shimoaka et al., 2002; Ishibe et al., 2005).

A expressão de FGF18 foi aumentada nas células com inibição de ARHGAP21 e este gene foi escolhido para a validação devido ao seu envolvimento com a via da betacatenina. FGF18 é um gene alvo da via de Wnt e sua expressão é regulada por GSK-3β através do controle dos níveis de beta-catenina (Kapadia et al., 2005). Além disso, ativação simultânea das vias de sinalização de Wnt e FGF leva a um aumento da ativação da via de Wnt através da translocação de beta-catenina para o núcleo. A coativação destas duas vias durante a carcinogênese leva a fenótipos mais malignos devido à potencialização da cascata de sinalização induzida por beta-catenina/TCF e SNAILEMT.

5. SMURF2 - SMAD ubiquitination regulatory factor 2

SMURF2 participa da regulação da via de sinalização de TGF-beta, que por sua vez controla inúmeros eventos biológicos, como proliferação, diferenciação, migração e apoptose. Esta proteína associa-se com Smad7, a Smad inibitória na via de sinalização de TGF-beta, induzindo o recrutamento e degradação do receptor de TGF-beta, TGFBR (Kavsak et al., 2000).

As funções de SMURF2 também estão diretamente relacionadas com a via da betacatenina. SMURF2 pode ser recrutada por Smad7 para atuar na degradação de betacatenina o que propicia a perda da sua atividade no núcleo como fator de transcição (Millar, 2006). Quando interage com axin, Smad7 pode inibir o recrutamento de SMURF2 para a beta-catenina, estabilizando a beta-catenina, que por sua vez fica mais ligada a Ecaderina nas junções celulares, fortalecendo a adesão célula-celula (Tang et al., 2008).

Recentemente, Jin e colaboradores reportaram que a expressão de SMURF2 promove metástase em células de câncer de mama, aumentando a migração e invasão tumoral (Jin et al., 2009). A expressão de SMURF2 também induziu diminuição na senescência em diversas células tumorais e esta função mostrou ser independente da sua atividade como ligase de ubiquitina (Zhang et al., 2008).

6. BNIP3 - BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3

BNIP3 foi originalmente identificado como um gene que interage com a proteína adenovírus E1B 19kDa e é um membro da família das proteínas Bcl-2 que podem heterodimerizar e antagonizar proteínas de sobrevivência, como Bcl-2, promovendo assim a morte celular (Boyd et al., 1994). A expressão de BNIP3 é aumentada em situações de estresse, como hipóxia, através de mecanismos dependentes ou não de HIF-1 (Sandau et al., 2001). Toxinas indutoras de morte celular, como trióxido arsênico e cianina também induzem a expressão de BNIP3 (Kanzawa et al., 2005 e Prabhakaran et al., 2007). Ainda é controverso qual tipo de morte celular é induzida por BNIP3. Foi observado que esta proteína pode induzir necrose (Cizeau et al., 2000), autofagia (Tracy et al., 2007) e/ou apoptose, com liberação de citocromo c da membrana e ativação de caspases (Regula et al., 2002). Diversas proteínas controlam a expressão de BNIP3 em condições normais de crescimento, prevenindo a morte celular induzida por BNIP3, como o supressor tumoral retinoblatoma (Tracy et al., 2006) e NF κ B (Shaw et al., 2007).

A expressão de BNIP3 é maior em muitos tipos de tumores, comparados com os tecidos normais, inclusive em tumores de próstata (Shaida et al., 2008). Em geral, a expressão desta proteína induz morte celular, porém em tumores está correlacionada a uma maior agressividade e estágios clínicos mais avançados (Leo et al., 2006 e Swoter et al., 2006).

A expressão de BNIP3 esteve aumentada após transfecção da forma ativa de Cdc42 e Rac1 em NIH3T3 e diminuída na mesma linhagem celular transfectada com RhoA e H-Ras (Teramoto et al., 2003), mostrando seu envolvimento com estas Rho GTPases.

7. STC1 – Staniocalcina 1

Staniocalcina 1 (ou STC1) foi inicialmente descrita como uma glicoproteína hormonal envolvida na regulação de cálcio em stanios (órgãos associados aos rins) de peixes ósseos. Em contraste com sua expressão restrita nos peixes, a staniocalcina humana é expressa em muitos órgãos e tecidos (Chang et al., 1995, Varghese et al., 1998). Dados atuais revelam que esta proteína tem papel na cicatrização (Iyer et al., 1999), metabolismo celular (McCudden et al., 2002), angiogênese (Kahn et al., 2000), câncer (Chang et al., 2003) e regulação da migração transendotelial de leucócitos (Chakraborty et al., 2007). A expressão de staniocalcina 1 foi modulada por hipóxia em diversas linhagens tumorais e a depleção de HIF-1 α confirmou que HIF-1 α endógena é um fator chave na expressão de staniocalcina 1 induzida por hipóxia (Yeung et al., 2005).

8. HMGA2 - High mobility group AT-hook 2

As proteínas da família HMGA são fatores de transcrição que atuam tanto positivamente quanto negativamente na regulação da transcrição de uma variedade de genes. Desta forma, elas influenciam diversos processos biológicos como crescimento celular, proliferação, diferenciação e morte (Cleynen e Van de Ven, 2008).

A expressão de HMGA2 é raramente detectada no tecido adulto normal, enquanto é abundantemente detectada durante o desenvolvimento embrionário (Zhou et al., 1995). Altos níveis de expressão também são observados em diversos tipos de tumores, como em câncer de pulmão e próstata e também em desordens hematopoiéticas (Di Cello et al., 2008; Odero et al., 2005 e Diana et al., 2005). Além de apresentar elevada expressão em neoplasia, este gene está freqüentemente envolvido em rearranjos cromossomais em diferentes tumores, sugerindo um importante papel no processo oncogênico, provavelmente relacionado à sua função de controlar o crescimento de células embrionárias (Etienne et al., 2007). O aumento de expressão de HMGA2 algumas horas após o estímulo com soro em células NIH3T3 e em resposta a fatores de crescimento já foi relatado, mostrando seu envolvimento com proliferação e ciclo celular (Lanahan et al., 1992).

A expressão de HMGA2 apresentou-se aumentada quando células NIH3T3 foram transfectadas com formas constitucionalmente ativas de RhoA e HRas (Teramoto et al., 2003).

9. TGFBI – TGF-beta induced (ou Big-h3)

TGF-beta induced é uma proteína da matriz extracelular e sua expressão pode ser induzida por TGF-beta em diversos tipos celulares, incluindo células de melanoma, queratinócitos e fibroblastos de pulmão (Skonier et al., 1994). Estudos mostraram que a proteína TGF-beta indeced está envolvida em proliferação e diferenciação celular (Dieudonne et al., 1999; Kim et al., 2000; Rawe et al., 1997), cicatrização (LeBaron et al., 1995) e adesão (Ohno qt al., 1999), apesar de os mecanismos envolvidos nestes efeitos ainda não estarem elucidados.

Esta proteína contém um domínio RGD (Arg-Gly-Asp) (Thapa et al, 2007), que se liga aos colágenos do tipo I, II e IV, e é encontrado em muitas proteínas de matriz extracelular modulando a adesão e atuando como uma seqüência de reconhecimento para integrinas (Kim et al., 2000).

O TFGBI desempenha um importante papel na interação célula-colageno e sua indução por TFG beta inibe a adesão celular. Também já foi descrito que o TFGBI está envolvido em proliferação celular, adesão, migração e diferenciação (Skonier et al., 1994). Sua participação na progressão de neoplasias ainda é conflitante, pois dependendo do tipo de tecido pode exercer uma função supressora ou promotora (Irigoyen et al., 2010).