

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

Marcos Tadeu dos Santos

**O INTERACTOMA DE STANNIOCALCINA-1
HUMANA SUGERE NOVAS FUNÇÕES E VIAS DE
ATUAÇÃO CELULARES**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Marcos Tadeu dos Santos
Jörg Kobarg
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Genética e Biologia
Molecular, na área de Genética Animal
e Evolução.

Orientador: Prof. Dr. Jörg Kobarg

Co-Orientador: Prof. Dr. José Andrés Yunes

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Sa59i	<p>Santos, Marcos Tadeu dos, 1984- O interactoma de Stanniocalcina-1 humana sugere novas funções e vias de atuação celulares / Marcos Tadeu dos Santos. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.</p> <p>Orientador: Jörg Kobarg. Coorientador: Jose Andres Yunes. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Proteína Stanniocalcina-1. 2. Proteína Sumo-1. 3. Interatoma. 4. Técnicas do sistema de duplo-híbrido. 5. Leucemia. I. Kobarg, Jörg. II. Yunes, Jose Andres. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.</p>
-------	---

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: The interactome of human Stanniocalcin-1 suggests new cellular functions and pathways

Palavras-chave em Inglês:

Stanniocalcin-1 protein

Sumo-1 protein

Interactome

Two-hybrid system techniques

Leukemia

Área de concentração: Genética Animal e Evolução

Titulação: Doutor em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Jörg Kobarg [Orientador]

Vanessa Schein

Sandra Martha Gomes Dias

Claudio Chrysostomo Werneck

Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo

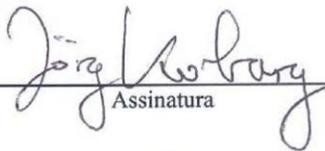
Data da defesa: 19-08-2011

Programa de Pós Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 19 de Agosto de 2011

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jörg Kobarg (Orientador)


Assinatura

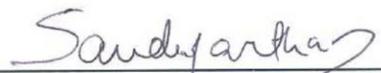
Profa. Dra. Vanessa Schein


Assinatura

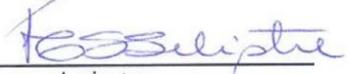
Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck


Assinatura

Profa. Dra Sandra Martha Gomes Dias


Assinatura

Profa. Dra Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo


Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Damário Gomes

Assinatura

Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti

Assinatura

Profa. Dra. Carmen Verissima Ferreira

Assinatura

Agradecimentos.....	vii
Lista de Abreviações e Siglas.....	xii
Resumo.....	xv
Abstract.....	xvi
1 – Introdução.....	1
1.1- A colaboração entre o LNBio e o Centro Infantil Boldrini.....	1
1.2- A leucemia infantil.....	1
1.3- O microambiente tumoral da medula óssea.....	3
1.4- A proteína Stanniocalcina-1.....	6
1.5- Stanniocalcina-1 e as evidências de receptores na membrana.....	11
1.6- Stanniocalcina-1, Câncer, Hipóxia, Angiogênese e outras implicações funcionais	14
1.7- Stanniocalcina-1 e o seu estado da arte.....	18
2 – Objetivos.....	21
3 – Resultados e Discussão.....	22
3.1- Desenvolvimento de um <i>kit</i> diagnóstico para identificação da proteína Stanniocalcina-1 em soro de pacientes com leucemia.....	22
3.2- Identificação de parceiros de interação para STC1 humana, dentro e fora da célula, visando compreender melhor as vias de atuação e possíveis funções.....	28
3.3- Resultados Complementares.....	61
4 – Conclusões.....	64
4.1- Conclusões Específicas.....	64
4.2- Conclusão Geral.....	66
5 – Perspectivas.....	67
6 – Materiais e Métodos.....	69
6.1- Desenvolvimento de um kit diagnóstico visando a identificação da proteína STC1 em soro de pacientes com leucemia.....	69
6.1.1- Co-cultivo de células de estroma de medula óssea e blastos leucêmicos, para avaliação de genes diferencialmente expressos candidatos a marcadores moleculares.....	69
6.1.2- PCR em Tempo Real quantitativo (RQ-PCR).....	69
6.1.3- Expressão e purificação de STC1-HT inteira no sistema baculovírus.....	69
6.1.3.1- Cromatografia de Troca Iônica.....	71
6.1.3.2- Cromatografia de Afinidade.....	71
6.1.3.3- Cromatografia de Exclusão (Gel Filtração).....	72
6.1.3.4- Método de quantificação de proteínas por BCA.....	72
6.1.4- Clonagens das porções STC1 C- e N-Terminal em vetores de expressão.....	72
6.1.4.1- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	73
6.1.4.2- Digestões enzimáticas.....	73
6.1.4.3- Eletroforese em gel de agarose.....	73
6.1.4.4- Purificação de DNA recortado de gel de agarose.....	73

6.1.4.5-	Ligação.....	73
6.1.4.6-	Preparo de bactérias competentes para transformação pelo choque térmico.....	74
6.1.4.7-	Transformação de bactéria competentes pelo choque térmico.....	74
6.1.4.8-	Mini-preparação de DNA plasmidial.....	75
6.1.4.9-	Análise dos clones obtidos.....	75
6.1.4.10-	Sequenciamento automático dos clones obtidos.....	75
6.1.5-	Expressão das construções STC1 N- e C-terminal clonadas em bactéria.....	75
6.1.5.1-	Lise Bacteriana.....	76
6.1.5.2-	SDS-PAGE.....	76
6.1.5.3-	<i>Western Blot</i>	77
6.1.5.4-	Anticorpos Utilizados.....	78
6.1.5.5-	Quantificação por espectrofotometria.....	78
6.1.6-	<i>Refolding</i> e purificação de STC-1 C-terminal-GST dos corpos de inclusão de BL21 (DE3) pRARE.....	78
6.1.7-	Produção e seleção de anticorpos monoclonais anti-STC1.....	79
6.1.8-	Biotinilação dos anticorpos monoclonais anti-STC1.....	79
6.1.9-	Ensaio de ELISA.....	80
6.2-	Identificar parceiros de interação para STC1 humana, dentro e fora da célula, visando compreender melhor as vias de atuação e possíveis funções.....	80
6.2.1-	O ensaio de duplo híbrido em leveduras.....	80
6.2.2-	Isolamento e identificação do receptor de Stanniocalcina-1 humana.....	81
6.2.2.1-	Cultura de linhagens celulares humanas.....	81
6.2.2.2-	Citometria de Fluxo.....	81
6.2.2.3-	<i>Crosslinking</i> e isolamento do complexo STC1-receptor.....	81
6.2.2.4-	Espectrometria de massas.....	82
6.2.3-	A interação entre Stanniocalcina-1 e NEK6.....	82
6.2.3.1-	Busca por sítios de fosforilação na sequência de STC1.....	82
6.2.3.2-	Ensaio de Fosforilação <i>in vitro</i>	82
6.2.3.3-	Ensaio de co-localização de STC1 e NEK6 em células THP-1 e microscopia confocal.....	83
6.2.4-	O ensaio de <i>pull down</i> semi <i>in vivo</i>	83
6.2.4.1-	Extração de baço murino.....	83
6.2.4.2-	Extração de proteínas totais de baço murino.....	83
6.2.4.3-	<i>Pull-down</i> de proteínas do baço murino.....	84
6.2.4.4-	Identificação de proteínas que se ligaram a STC1-HT por espectrometria de massas.....	84
6.2.5-	Flp-In T-Rex Mammalian Expression System – Geração de clones estáveis... ..	85
6.2.6-	Resultados Complementares.....	85
6.2.6.1-	Ensaio de marcação intracelular e de MTT.....	85
6.2.6.2-	Marcação intracelular de STC1.....	86
7 –	Referências Bibliográficas e Patentes.....	87

8 – Anexos.....	97
Artigo Científico.....	97
Parecer CEP (Comitê de Ética em Pesquisa).....	112
Parecer CIBio (Comitê Interno de Biossegurança).....	114

Talvez, esta seja a seção mais difícil de organizar, compor e redigir nesta tese de doutorado. As demais seções, por mais desafiadoras, intrigantes, trabalhosas, custosas e gratificantes que foram não se comparam a importância de se agradecer as atitudes, as ações, as idéias e as discussões que as instituições e principalmente as **pessoas** envolvidas (direta e indiretamente) tiveram para realização do meu doutorado e concretização final desta fase de minha vida através desta presente tese.

É difícil saber quem agradecer primeiro, não existe muito bem uma ordem exata de quem foi mais ou menos importante. Todos que vou citar neste espaço (e provavelmente alguns que vou esquecer, traído pela memória) têm sua parcela de importância e sou realmente grato. Esta tese, apesar de sintetizar apenas o que foi realizado nos últimos três anos e meio em meu doutorado, é resultado de um período muito maior, que compreende toda minha formação escolar, acadêmica, científica, vocacional e pessoal.

Por isso, agradecerei primeiramente a DEUS. Apesar de eu ser uma pessoa nada religiosa e ter meus conflitos quanto a esta questão, sou obrigado a reconhecer que tamanha sorte, quanto a família, amigos e colegas de trabalho e momentos que vivi e presenciei até hoje, não podem ser fruto apenas do que propõe nosso colega Darwin. Estou certo que para ter tantas coisas boas ao meu redor, exista Algo maior, e Este algo, gosta muito de mim!

Agradeço ao meu amigo e orientador Dr. Jörg Kobarg, que me aceitou ainda no primeiro ano de graduação sem que eu soubesse o que era uma pipeta, compreendeu minha saída e re-abriu as portas novamente na pós-graduação. Em meio a muitas discussões científicas, a liberdade na tomada de decisões e a confiança em minha capacidade, foram características que considero diferenciais importantíssimos e muito relevantes na minha formação. Não menos importante, nosso convívio diário, discussões futebolísticas e de assuntos diversos não relacionados ao laboratório, fizeram com que nossa relação fosse sempre agradável e, o mais importante, de confiança mútua.

Agradeço também ao amigo Dr. José Andrés Yunes, meu co-orientador de doutorado, por ter me aceito como aluno e ser sempre solícito a tudo que precisei no momento que precisei. Não somente as riquíssimas discussões e intrigas sobre Stanniocalcina-1, mas também a valiosas dicas, idéias e tutoriamento empreendedor.

Ao Dr. Hinrich P Hansen, meu amigo e supervisor durante o período sanduiche na Alemanha. Em meio a géis, blots, kölschs, pizzas, tapas, boletins de ocorrência,

caminhadas, proteínas degradadas, bier, aulas de português e muitas horas noturnas de laboratório, me deu liberdade de execução de experimentos e opinou com uma inteligência científica admirável. Não só por ter tido peso em minha formação como cientista, mas por ter acrescentado muito no meu conhecimento geral e cultural.

Ao meu amigo Dr. Daniel Maragno Trindade, o desbravador do projeto Stanniocalcina-1, que iniciou de forma excepcional este projeto, colaborou em praticamente todos os resultados aqui apresentados e sempre foi a referência em questões intrigantes sobre esta proteína!

À todo pessoal do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), pesquisadores, doutorandos, estagiários, alunos de iniciação científica e pós-doutorandos, em especial Maria Eugênia pela amizade e apoio técnico, Rodrigo Guerra, Carol, Wanderley, Renata Rocha, Romênia, Thaís, Bianca e Deivany que generosamente ensinaram, discutiram, trocaram idéias e cederam reagentes. Sem eles, grande parte desse trabalho certamente teria sido inviável.

Aos colaboradores, Profa. Dra. Sara Saad (e todo pessoal do Hemocentro, Janine, Tiago, Victor, Pedro e Ana Leda), Dra. Leticia Archângelo (em projetos paralelos com a proteína CATS), Profa. Dra. Adriana Paes Leme (sempre muito gentil, solicita e competente na espectrometria de massas), Dra. Gabriela Vaz Meirelles, Dra. Kaliandra de Almeida Gonçalves, Dr. Gustavo Costa Bressan, MSc. Ângelo Laranjeira (pelas discussões e ensinamentos de citometria de fluxo e cultura de células).

À todos os colegas e amigos do Grupo de Biologia Molecular, desde a velha guarda (Elia, Flávia, Dario, Alexandre, Rui, Patrícia, Kali e Tiago), contemporâneos (Marcos Alborghetti, Daniel MT., Gabriela, Taís Kuniyoshi, Daniel Lanza, Marcel e Jéssica) até os mais novos (Filipe, Camila, Gustavo Camacho, Ariane, Ângela Priscila Zenatti, Priscila Papa, Germanna, Deivid, Eduardo, Edmárcia, Fernanda, Mayra, Diogo, Talita). E também aos alunos de outros grupos, André, Yuri, Tiago, Guga, Jéssica, Carlinha, Adriana S, Malu e Paier. Foram muitos almoços, happy hours, *overnights*, viagens e fantástica troca de experiências, protocolos e reagentes no laboratório.

Ao meu pupilo, Daniel Seij Saito, pelo tamanho esforço e dedicação ao projeto. Obrigado pela paciência e pela nossa amizade! Espero ter contribuído com a sua formação científica, e que você permaneça neste projeto!

Ao pessoal do Boldrini, Patrícia Jota e Ana Luiza Seidnger e aos ***pacientes***.

Ao pessoal do *Labor für Immuntherapie (Köln)* por me acolher tão bem: Martina, Maria, Hanna, Jörg, Jan, Janine, Raoul, Katrin, Maike, Gisela, Kristin, Dennis (hey man!), Dra. Elke Pogge, Dr. Mario Fabri e meu vizinho e parceiro Zel Zhang.

Aos membros da banca, Profa. Dra. Vanessa Shein, Prof. Dr. Cláudio Chrysostomo Werneck, Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo, Profa. Dra. Sandra Martha Gomes Dias, Profa. Dra. Camem Verissima Ferreira, Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti e Prof. Dr. Marcelo Damário, por terem aceitado participar da avaliação deste trabalho.

Aos membros da pré-banca, Dra. Sandra Martha Gomes Dias e Dra. Leticia Fröhlich Archangelo (também na qualificação) e do exame de qualificação Dr. Celso Eduardo Benedetti e Dra. Carmen Veríssima Ferreira pelas valiosas sugestões e dicas.

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), que me acolheu em 2003 e possibilitou uma ótima formação no Instituto de Biologia durante a graduação e desde 2008 em um dos melhores programas de pós-graduação do Brasil, o de Genética e Biologia Molecular. A todo pessoal da turma de Biologia 03N, em especial os meus amigos Pepa, Biba, Marcelinho, Lucas, Banana, Lula, Fipo, Tiaguinho, Hérnia, Cacá, Laura, Ursinha, Carol e Sueco. Junto de vocês tive uma das melhores fases da minha vida!

À todos meus antigos orientadores e co-orientadores, Dra. Estela Gonçalves (Biologia Celular), Dr. Alexandre Quaresma (LNBio), Dr. Nils-Peder Willassen e Dr. Geir Åsmund (Noruega), Dra. Laura Ottoboni e Dra. Fernanda Reis (CBMEG), por terem me ensinado os primeiros passos na biologia molecular e pela paciência!

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT), Associação Brasileira de Tecnologia de Luz Síncrotron (ABTLuS) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

À todos meus amigos moradores e ex-moradores da Gloriosa Mansão e República Subako de Kobra, os Drs Skol, Borghe, Wando, Creyto, Zélo e os bixos Cabeça, Lemão, Mengatto, Padre, Lula, Remédio, Amizade, Kid, Pepa, Nory, Portuga, Revertério, Erich, Cabelo, BNN, Ronardo, Mandrake, Frango, Azeite, Renan, Felipe, Gabriel, Teti e Lucas. Esta foi minha casa e minha família em Campinas desde 2003!

Ao pessoal da INOVA - Unicamp, onde aprendi muitas coisas que foram decisivas nos rumos da minha carreira profissional, em especial a Janaína Cesar.

Aos meus amigos e sócios da TumorType, Pedro Bordeaux Rego e Ramon Vidal, que acreditaram em minhas idéias e me ajudaram muito a tirá-las do papel.

Ao pessoal da Verdartis Biotecnologia, pela oportunidade e confiança nesta próxima etapa da minha carreira, espero conseguir contribuir positivamente.

Aos meus sempre amigos e parceiros de Ribeirão Preto, Junior, Marcelinho, Tuchê, Doug e Maria Alice, por preservarem durante tantos anos nossa amizade, mesmo eu estando longe e pelo apoio que sempre pude encontrar em vocês.

À minha melhor amiga, companheira e amada namorada **Raka**, que sempre esteve ao meu lado desde os primeiros anos de graduação até a finalização desta etapa. Obrigado pelo apoio incondicional a todas minhas decisões, pela força quando estive por baixo, pela paciência, compreensão, por dividir comigo sonhos e objetivos. Obrigado por cada acampamento, carnaval, feriado, final de semana e viagens inesquecíveis que fizemos juntos. Obrigado acima de tudo pelo Amor que você tem por mim, o meu bem mais precioso! Obrigado também pela sua família que me ama e me acolhe tão bem!

A todos os membros da família, avós e avôs com quem aprendi muito sobre a vida, tias, tios, primos, cunhados e cunhadas. Aos sobrinhos maravilhosos que são meu xodó, Frederico, Felipe e meus sobrinhos-afilhados Rafaela e Arthur, amo vocês!

Aos meus amados Pais **Cleber e Silvia**, e aos meus irmãos **Karina e Cleber Jr.**, a quem não tenho palavras para descrever a gratidão e a importância de vocês na minha vida. Toda educação que me proporcionaram desde criança, as oportunidades e por acreditar nos meus objetivos sempre. O apoio, o exemplo a dignidade e o Amor. Espero sempre poder tentar retribuir o que fizeram e fazem por mim e ser motivo de orgulho para vocês!

*Dedico esta tese a meu Pai **Cleber** e a todas as pessoas com e vitimas do câncer. Espero que esta tese possa um dia, mesmo que de forma mínima, ajudá-las de alguma forma.*

*“Cada um de nós compõe a
sua própria história
E cada ser em si, carrega o
dom de ser capaz.
De ser Feliz...”*

*“Amanheceu,
peguei a viola
botei na sacola
e fui viajar...”*

Renato Teixeira

Lista de Abreviações e Siglas

³²P	Fósforo Radioativo
ALAS2	<i>5-Aminolevulinate synthase 2</i>
ALDOA	<i>Aldolase A</i>
ANPEP	<i>Aminopeptidase N</i>
AOS2	<i>Allene oxide synthase</i>
ATF6	<i>Activating transcription factor 6</i>
ATP	<i>Adenosina triphosphate</i>
Bcl-2	<i>B-cell CLL/lymphoma</i>
Bcl-X	<i>BCL2-like 1</i>
BFS	<i>Bovine Fetal Serum</i>
BIP	<i>Binding immunoglobulin protein</i>
CaSR	<i>Calcium-sensing receptor</i>
CBP	<i>CREB binding protein</i>
CD13	<i>Cluster of differentiation 13</i>
CD19	<i>Cluster of differentiation 19</i>
Cdc3	<i>Cell division cycle protein 3</i>
CDK2	<i>Ciclin-dependent kinase 2</i>
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i>
CHOP	<i>C/EBP homologous protein</i>
CMTM3	<i>Chemokine-like MARVEL transmembrane containing motif 3</i>
COS-1	Fibroblastos de rim de macaco verde africano transformados
DAGLB	<i>Diacylglycerol lipase, beta</i>
Daxx	<i>Death-domain associated protein</i>
DHPR	<i>Dihydropyridine receptor</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
Ebp1	<i>Estrogen-binding protein</i>
ELA2	<i>Elastase 2</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ERK 1/2	<i>Extracellular signal regulated kinase</i>
ERN1	<i>Endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1</i>
EST	<i>Expressed sequence tag</i>
EWS	<i>Ewing sarcoma breakpoint region 1</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
FET	FUS EWS e TAF15 (família de proteínas)
FLJ20254	Veja TMEM214
FNDC4	<i>Fibronectin domain containin protein 4</i>
FTL	<i>Ferritin light chain</i>
FUS	<i>Fused in Sarcoma protein</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
Grp78	<i>Glucose-regulated protein 78 kDa</i>
GST	<i>Glutathione S-transferase</i>

GTP	<i>Guanosine triphosphate</i>
HBA1/2	<i>Hemoglobin alpha 1/2 chain</i>
HDAC	<i>Histone deacetylase</i>
HEK293	<i>Human embryonic kidney</i>
HIF-1	<i>Hypoxia inducible factor</i>
HIPK2	<i>Homeodomain-interacting protein kinase 2</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HSC	<i>Hematopoietic stem cell</i>
HSPA5	<i>Heat shock 70 kDa protein 5</i>
HT1080	<i>Linhagem celular de fibrosarcoma</i>
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
IgG	<i>Imunoglobulina G</i>
IRE1	<i>Proteína transmembrana – serina/treonina quinase</i>
JSRP1	<i>Junctional sarcoplasmic reticulum protein 1</i>
Kd	<i>Constante de dissociação</i>
kDa	<i>kiloDaltons</i>
LLA	<i>Leucemia linfoblástica aguda</i>
LMA	<i>Leucemia mielóide aguda</i>
LMC	<i>Leucemia mielóide crônica</i>
LMNA	<i>Laminin A</i>
MAPK14	<i>Mitogen-associated kinase 14</i>
MDCK	<i>Madin Darby canine kidney</i>
mRNA	<i>RNA mensageiro</i>
MSC	<i>Multipotent stromal cells</i>
MTND1	<i>Mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 1</i>
MTT	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
N2A	<i>Neuro-2 A</i>
NADH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NB	<i>Nuclear bodies</i>
NEK6	<i>Never in mitosis gene a-related kinase 6</i>
NEK6-HT	<i>NEK6 com cauda de histidinas (his tag)</i>
NGR	<i>Nerve growth factors</i>
NiSO₄	<i>Sulfato de Níquel</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
Pc2	<i>Polycomb protein 2</i>
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i>
PE	<i>Phicoeritrin</i>
PERK	<i>Protein kinase-like ER kinase</i>
PIAS	<i>Protein inhibitors of activated STAT</i>
PKC	<i>Protein kinase C</i>
PML	<i>Promyelocytic leukemia protein</i>
PML-NB	<i>PML-nuclear body</i>
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
POD	<i>PML oncogenic dots</i>

PR	<i>Progesterone receptors</i>
QRICH1	<i>Glutamine rich protein</i>
RACK1	<i>Receptor of activated protein kinase C</i>
RanBP2	<i>RAN binding protein 2</i>
RanGAP1	<i>Ran GTPase activating protein 1</i>
RAS	<i>RAt Sarcoma protein sub-family</i>
RE	<i>Reticulo endoplasmático</i>
Rho-	<i>Rhodamine</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNF13	<i>Ring finger protein 13</i>
RQ-PCR	<i>Relative quantitative PCR</i>
SAP18	<i>Sin3A-associated protein, 18kDa</i>
SAXS	<i>Small angle X-ray scattering</i>
SDS - PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SENP	<i>SUMO1/sentrin specific peptidase 1</i>
SERCA	<i>Sarco/endoplasmatic reticulum Ca²⁺ ATPase</i>
snRNP	<i>Small nuclear ribonucleoproteins</i>
SP100	<i>Speackle protein 100 kDa</i>
STC1	<i>Stanniocalcina-1</i>
STC1-AP	<i>STC1- alkaline phosphatase</i>
STC1-HT	<i>STC1 com cauda de histidinas (His tag)</i>
STC1ΔSP	<i>STC1 sem pepitideo sinal</i>
STC2	<i>Stanniocalcina-2</i>
Sulfo-SBED	<i>Sulfosuccinimidyl-2-[6-(biotinamido)-2-(p-azidobenzamido) hexanoamido]ethyl-1,3'- Dithiopropionate</i>
SUMO1	<i>Small ubiquitin-related modifier 1</i>
TAF15	<i>TBP-associated factor 15</i>
TLS	<i>Veja FUS</i>
TMEM132a	<i>Transmembrane protein 132a</i>
TMEM214	<i>Transmembrane protein 214</i>
TSA	<i>Tricostatina A</i>
UBA2	<i>Ubiquitin-like modifier activating enzyme 2</i>
UBC9	<i>Ubiquitin-like conjugating enzyme 9</i>
UPR	<i>Unfolded protein response</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factors</i>
WB	<i>Western blot</i>
Wnt2	<i>Wingless-type MMTV integration site family member 2</i>
wt	<i>Wild type</i>
ZBTB16	<i>Zinc finger and BTB domain containing 16</i>

O objetivo deste projeto foi estudar genes ativados em células do estroma da medula óssea, induzidos pela co-cultura com blastos leucêmicos, na tentativa de uma melhor compreensão sobre o *cross-talk* entre estas células no microambiente tumoral. Nós identificamos Stanniocalcina-1 (STC1) como um potencial marcador molecular do microambiente tumoral, uma vez que sua expressão foi aumentada cerca de 7 vezes em células do estroma co-cultivadas com blastos leucêmicos primários. STC1 humana é uma glicoproteína secretada e tem sido descrita participando em diferentes processos fisiológicos, incluindo a angiogênese, hipóxia e principalmente, a carcinogênese. Nós produzimos a proteína recombinante STC1 no sistema baculovírus e também anticorpos monoclonais, usados em um ensaio ELISA, que agora será testado como um novo *kit* de diagnóstico de leucemia por uma empresa brasileira. Além disso, identificamos novos parceiros de interação para STC1 através do sistema de duplo híbrido em levedura sendo que algumas destas interações foram confirmadas por *GST-pull down*. A região N-terminal foi identificada como sendo a região responsável pela interação de STC1 com seus parceiros. Estudos de localização sub-celular por microscopia, revelaram uma deposição ubíqua citoplasmática e puntiforme nuclear, lembrando corpúsculos nucleares relacionados a SUMOilação. Embora STC1 interaja com a proteína SUMO1 e tenha uma predição de alta probabilidade para ser SUMOilada, ensaios *in vitro* e *in vivo* não conseguiram detectar STC1 SUMOilada. No entanto, observamos que STC1 regula a SUMOilação de forma significativa em três outras proteínas. Essas descobertas sugerem um novo papel para STC1 no ciclo de SUMOilação, agindo como uma SUMO E3 ligase. Observamos também que STC1 possui um receptor na membrana plasmática em linhagem de células leucêmicas K562 e que a incubação de STC1 com outras células leucêmicas parece favorecer a proliferação destas células ao passo que estimula uma maior produção da própria STC1 intracelular em células do estroma. Juntos, todos estes resultados abrem novas pistas promissoras a serem exploradas no futuro, uma vez que todos os resultados mostram ligações interessantes com estudos funcionais anteriores em STC1.

The aims of this project is to study upregulated genes on bone marrow stromal cells, induced by the co-culture with leukemic blasts, trying to have a better understand about the crosstalk between these cells in the tumor microenvironment. We identified Stanniocalcin-1 (STC1) as a putative molecular marker for the leukemic microenvironment, once its expression was increased around 7 times in stromal cells co-cultivated with primary leukemic blasts. Human STC1 is a secreted glycoprotein that has been implicated in different physiological process, including angiogenesis, hypoxia and mainly in carcinogenesis. We produced the recombinant protein STC1 in baculovirus system and monoclonal antibodies for an ELISA assay that now will be tested as a new leukemia diagnostic kit by a Brazilian company. Moreover, we identified new interacting protein partners for STC1 by yeast two hybrid system and some of these interactions were confirmed by GST-pull down assays. The N-terminal region was mapped to be the region that mediates the interaction between STC1 and its partners. Microscopic subcellular localization, revealed an ubiquitous cytoplasmic and dot-like nuclear deposition, resembling SUMOylation related nuclear bodies. Although STC1 interacts with SUMO-1 and has a high theoretical prediction score for a SUMOylation site, *in vitro* and *in vivo* assays could not detect STC1 SUMOylation. However, we found that STC1 significantly regulates the SUMOylation of three other proteins. These findings suggest a new role for STC1 in SUMOylation cycle, acting as a SUMO E3 ligase. We either observe that STC1 has a plasmatic membrane receptor in K562 leukemic cell lines and the incubation of STC1 with other leukemic cells suggest a increase of proliferation of these cells and stimulates the production of more intracellular STC1 at stromal cells. Together, all of these findings open promising new avenues to be explored in future detailed studies, since they all show interesting connections with previous functional studies on STC1.

1.1 - A colaboração entre o LNBio e o Centro Infantil Boldrini.

Para que os assuntos que serão introduzidos a seguir se contextualizem de forma mais clara, é importante que se introduza antes, o ambiente em que se foi desenvolvida esta presente tese de doutorado, que se encaixa dentro de um projeto com um propósito maior e mais amplo. Desta forma, o Laboratório Nacional de Biociência (LNBio) e o Centro Infantil Boldrini estabeleceram uma parceria científica colaborativa, visando unir o conhecimento, a *expertise* e a infra-estrutura de cada instituição, para ampliar a capacidade de geração de avanços científicos de qualidade e responder a questões científicas relevantes. Neste contexto, o foco geral desta parceria interinstitucional, é estudar de forma molecular o microambiente tumoral neoplásico, em especial da leucemia infantil. De forma particular, a contribuição desta tese de doutorado para este projeto, se insere na identificação e caracterização de um novo e potencial marcador molecular para a leucemia infantil através de suas implicações funcionais na célula humana. Os assuntos que serão introduzidos a seguir serão expostos de forma a não somente discorrer sobre o assunto em questão, mas também a contextualizar de forma cronológica cada avanço obtido durante o projeto, buscando justificar os objetivos de se estudar cada etapa que compõe esta tese.

1.2 – A Leucemia Infantil

O termo Leucemia se insere dentro do amplo grupo doenças hematológicas, e se remete aos casos onde existe a ocorrência de neoplasias malignas. É considerada, portanto, o câncer do sangue em formação ou dos tecidos que produzem o sangue, no caso, a medula óssea. Sua principal característica são anormalidades no processo de proliferação e diferenciação de glóbulos brancos do sangue, que ocorre devido a falhas no processo da hematopoiese (Sinnott D, *et al.*, 2006).

A classificação das diversas formas de ocorrência de leucemia se baseia principalmente em dois aspectos clínico-patológicos: (a) na linhagem celular afetada e (b) na forma de proliferação destas células. O sistema hematopoiético é composto de células tronco pluripotentes indiferenciadas na medula óssea, que proliferam, diferenciam e se separam em duas linhagens celulares: (a) mielóides e linfóides. As células mielóides se diferenciam nas células vermelhas do sangue, monócitos, granulócitos e plaquetas e as células linfóides se diferenciam e se desenvolvem em células B e T (Figura 1).

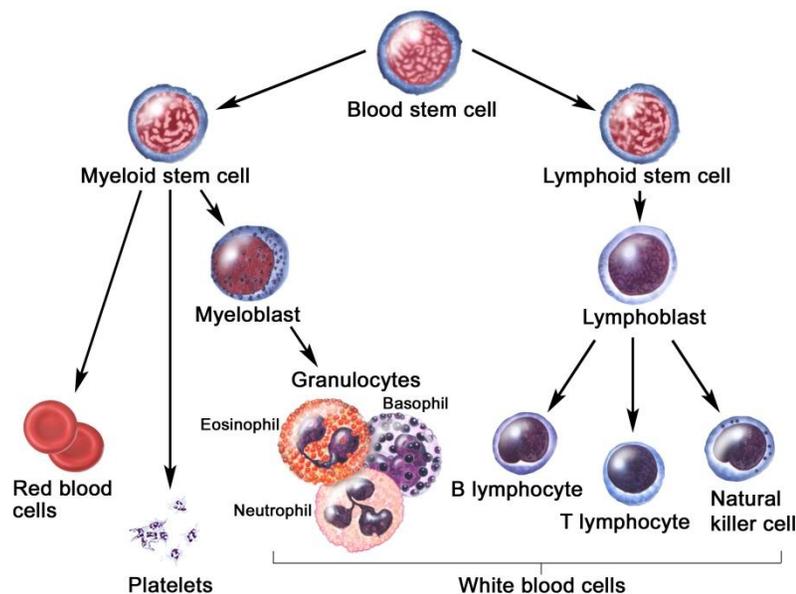


Figura 1. Processo de hematopoiese normal que gera linhagens celulares linfóides e mielóides. Falhas no evento hematopoiético levam ao acúmulo de células anormais na medula óssea que podem levar a substituição das células normais do sangue. Adaptado de www.meb.uni-bonn.de/Cancernet/.

Na leucemia, ambos tipos celulares podem se proliferar de forma (b) aguda ou crônica. A leucemia aguda é uma doença que progride rapidamente e afeta a maioria das células imaturas e indiferenciadas. Essas células são incapazes de realizar suas funções normais. Na leucemia crônica o progresso da doença é mais lento permitindo a produção de células maduras e mais diferenciadas. Essas células conseguem manter algumas de suas funções normais (Sullivan AK, *et al.*, 1998).

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), a cada ano aproximadamente 250.000 crianças e adultos são diagnosticados com um tipo de leucemia, o que representa cerca de 2,5% de todas as pessoas diagnosticadas com câncer. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), são esperados para o Brasil, cerca de 9580 novos casos de leucemia neste ano, sendo que 4.510 (47%) apenas na região sudeste do país.

No caso das leucemias que ocorrem na população infantil, existe uma prevalência de casos de leucemia linfóide aguda (LLA), que representam cerca de 75 a 80% dos casos, seguida pela leucemia mielóide aguda (LMA), que afeta entre 20 a 25% das crianças com leucemia. A leucemia mielóide crônica (LMC) é raramente reportada em crianças (menos de 5% dos casos) e a leucemia linfóide crônica não ocorre no grupo, sendo exclusiva da população adulta. Após a primeira metade do século XX, o progresso

no diagnóstico e no tratamento da leucemia infantil tem transformado essa doença, que antes era uniformemente fatal, em um grupo de malignidades que agora são curadas em muitas crianças. Esse progresso ocorreu devido ao esforço conjunto de investigações clínicas e científicas e ao trabalho de grupos de triagem clínica em cooperação nacional e internacional. Os avanços nas técnicas de citogenética, imunofenotípicas e análises de genética molecular permitiram a identificação de marcadores clínicos em células leucêmicas. Esse novo conhecimento tem contribuído para o desenvolvimento de protocolos de tratamento designados para sub-grupos específicos de pacientes com leucemia infantil (Colby-Graham, *et al.*, 2003).

Sabe-se que o estudo por si só apenas dos blastos leucêmicos são insuficientes para se compreender o desenvolvimento do processo neoplásico, o estabelecimento das células transformadas e as anormalidades proliferativas características da doença. O local onde essas células são geradas e com quem estabelecem íntima relação, chamado de microambiente tumoral da medula óssea, é igualmente importante de ser estudado e compreendido.

1.3 – O microambiente tumoral da medula óssea

A hematopoese normal ocorre através de uma complexa interação entre as células-tronco progenitoras e as células de sustentação presentes na medula óssea. A medula óssea contém células-tronco hematopoética (HSCs), células endoteliais, osteoblastos, osteoclastos e células-tronco mesenquimais (MSCs), que dão origem as células do estroma, incluindo adipócitos, condrócitos, fibroblastos e miócitos. Células de suporte de cada região da medula óssea produzem fatores solúveis, moléculas e ligantes que interagem com outras moléculas e ligantes na superfície das HSCs. Essas interações contribuem para proliferação, diferenciação, quiescência e migração das HSCs (Sison EA, *et al.*, 2011).

Estudos demonstraram que a interação entre as células do estroma da medula óssea e as células da leucemia, contribui para a sobrevivência da célula neoplásica. Sugere-se que as células leucêmicas têm a capacidade de induzir mudanças na medula óssea que passam a afetar a hematopoese e a arquitetura tecidual da medula óssea, de forma que a leucemia modula este microambiente tumoral para obter vantagens adaptativas e proliferativas. O microambiente tumoral da medula óssea, ou seja, as células do estroma medular, passam a fornecer, portanto, um ambiente propício para o estabelecimento definitivo dos blastos leucêmicos, um vez que fornece fatores de

crescimento, suprimento sanguíneo, matriz extracelular, remoção de catabólitos e de células mortas (Laranjeira ABA, *et al.*, 2007; Sison EA, *et al.*, 2011).

Diversos grupos têm demonstrado que pacientes com leucemia aguda e pré-leucemia, como síndromes mielodisplásicas e neoplasmas mieloproliferativos, possuem elevados níveis de vascularização e angiogênese na medula óssea (Ayala F, *et al.*, 2009). Em um estudo comparativo entre biópsias do núcleo de medulas ósseas de crianças com LLA com de controles saudáveis, mostraram que as biópsias de medula óssea leucêmicas têm padrões de microvasculatura distintos, incluindo a densidade de microvasos (Perez-Atayde AR, *et al.*, 1997). A habilidade para induzir angiogênese é provavelmente um mecanismo que eleva a sobrevivência de células leucêmicas na medula óssea. Apesar do fato de as leucemias não possuírem uma associação entre a densidade de microvasculatura e o prognóstico dos pacientes (Pule MA, *et al.*, 2002), inibidores de angiogênese se mostraram eficazes como agentes anti-tumorais em modelos animais, indicando a dependência da angiogênese nas leucemias (Iversen PO, *et al.*, 2002).

A hipóxia é o maior dos estimulantes para angiogênese e o fator de transcrição a indução de hipóxia, HIF-1 (*Hypoxia Inducible transcription Factor 1*) é o mediador chave deste processo. Existem trabalhos indicando que certas regiões da interface da medula óssea de murinos são ambientes hipóxicos (Parmar K, *et al.*, 2007). Dados em modelos com ratos demonstram que células leucêmicas infiltradas na medula óssea encontram ambiente mais hipóxico quando comparadas com células da medula óssea de ratos saudáveis (Mortensen BT, *et al.*, 1998). Células de leucemia são capazes de se proliferar mesmo sob condições de hipóxia, o que indica a capacidade destas células a se adaptar ao ambiente hipóxico (Jensen PO, *et al.*, 2000). De fato, a super-expressão de componentes regulados por oxigênio como HIF-1 alfa, foi observado em diversas células leucêmicas em espécimes de medula óssea de pacientes com LLA (Wellmann S, *et al.*, 2004).

Fatores de crescimento também são responsáveis por ajudar a leucemia a modular o microambiente tumoral da medula óssea. Fatores de crescimento endotelial vascular (VEGFs - *Vascular Endothelial Growth Factors*) são expressos tanto por linhagens celulares de leucemia mielóide aguda, quando por blastos leucêmicos (Fiedler W, *et al.*, 1997). Uma das funções mais correlativas entre HIF-1 e a hipóxia é justamente a ativação da produção de VEGF e o estímulo a angiogênese (Figura 2). A estimulação da

formação de novos vasos pela angiogênese representa uma resposta adaptativa a hipóxia e envolve a proliferação celular endotelial, um processo estimulado por fatores de crescimento induzíveis pela hipóxia, como VEGF. A microvasculatura é um componente ativo do microambiente da medula óssea e é responsável por fornecer oxigênio e nutrientes (Konopleva M, *et al.*, 2009). Secretado pelas células leucêmicas, VEGF ativa receptores tanto nas células endoteliais quanto nas próprias células da leucemia estimulando a sua proliferação (Dias S, *et al.*, 2002).

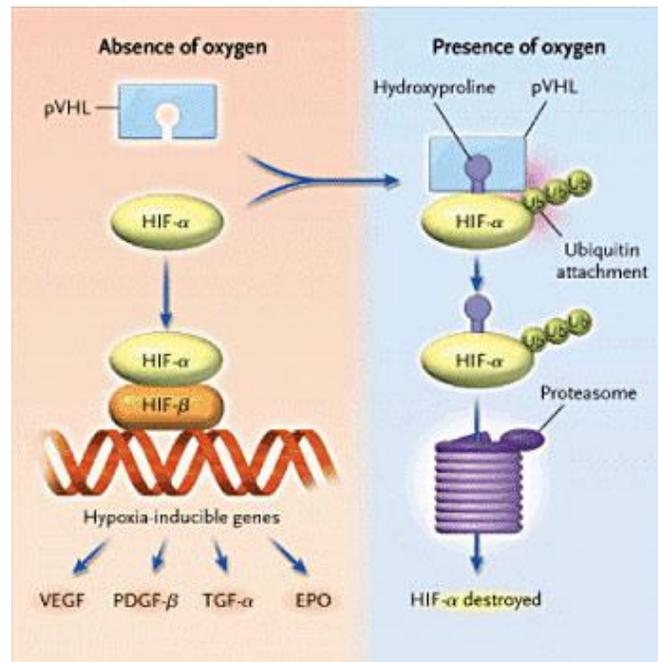


Figura 2. Regulação da produção de VEGF e outros fatores em situação de hipóxia e normóxia. A presença de oxigênio leva a degradação de HIF através de ubiquitinação pelo sistema de proteossoma. A ausência de oxigênio que ocorre no microambiente tumoral leucêmico, favorece a produção de VEGF via HIF, elevando a angiogênese do local. Adaptado de www.hemonctoday.com.

Fica claro portanto, que o contato entre os blastos leucêmicos e o microambiente composto por células do estroma da medula óssea estimula uma modulação deste ambiente de modo a favorecer a proliferação, a sobrevivência e a adaptação da leucemia. Isso ocorre devido ao *crossstalk* que ocorre entre estas células, mediados por fatores ativados e ativadores produzidos por ambas.

Em vista de se entender melhor esta modulação do microambiente na progressão das células tumorais leucêmicas, foram realizados no Centro Infantil Boldrini, estudos de expressão gênica através de plataformas de microarranjos de DNA (Affymetrix), visando identificar genes que fossem ativados nas células endoteliais da medula óssea (BMEC –

Bone Marrow Endothelial Cells) após sua incubação/interação com plasma de crianças com LLA ou com células primárias de leucemia linfoblástica aguda (dados não publicados).

Como pode ser observado na Tabela 1, o gene que mais teve sua expressão ativada nas BMEC, devido ao contato com plasma de crianças com LLA, foi o gene *STC1*, que codifica a proteína humana Stanniocalcina-1, mostrando-se como um potencial marcador molecular.

Tabela 1. Genes diferencialmente expressos pelas BMEC após 6h da adição de plasma de crianças com LLA. Valores de expressão foram calculados com o software dCHIP. Em negrito, genes diferencialmente expressos no co-cultivo de BMEC com células de LLA.

Gene	BMEC alone	BMEC + Leukemia plasma	
	(Control)	6 hours incubation	Fold change
stanniocalcin 1, <i>STC1</i>	267	2188	8
chemokine (C-X-C motif) ligand 6, CXCL6	73	581	8
interleukin 8, IL-8	214	1383	6
chemokine (C-X-C motif) ligand 2, CXCL2	88	566	6
chemokine (C-C motif) ligand 20, CCL20	177	1047	6
inhibin, beta A (activin A)	251	1335	5
putative lymphocyte G0/G1 switch gene, G0S2	199	1023	5
chemokine (C-X-C motif) ligand 1, CXCL1	125	632	5
pre-B-cell colony-enhancing factor	140	685	5
Purine nucleoside phosphorylase	166	790	5
brain-derived neurotrophic factor, BDNF	400	1781	4
chemokine (C-C motif) ligand 2, CCL2	763	3059	4
CGI-109 protein	280	1042	4
inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein, Id3	124	440	4
tissue factor pathway inhibitor 2, TFPI2	154	536	3
dickkopf homolog 1, Dkk1	656	2280	3
ESTs	48	156	3

A partir deste dado, decidiu-se investigar o que era conhecido sobre o gene e a proteína Stanniocalcina-1, visando avaliar se suas características o qualificavam como um bom candidato a ser estudado, no que diz respeito a interação entre a leucemia e o microambiente tumoral.

1.4 – A proteína Stanniocalcina-1 (STC1)

Em 1839, na Universidade de Rostock (Alemanha), o Professor H. Stannius descobriu pares de glândulas adjacentes aos rins de peixes que se acreditava serem glândulas adrenais (Stannius H, 1839). Essas glândulas, batizadas de Corpúsculos de Stannius em 1898 (Vincent S, 1898) secretam um hormônio similar a calcitonina (Fontaine

M, 1964) que mais tarde foi purificado e nomeado de Stanniocalcina (STC) (Lafeber FP, *et al.*, 1986).

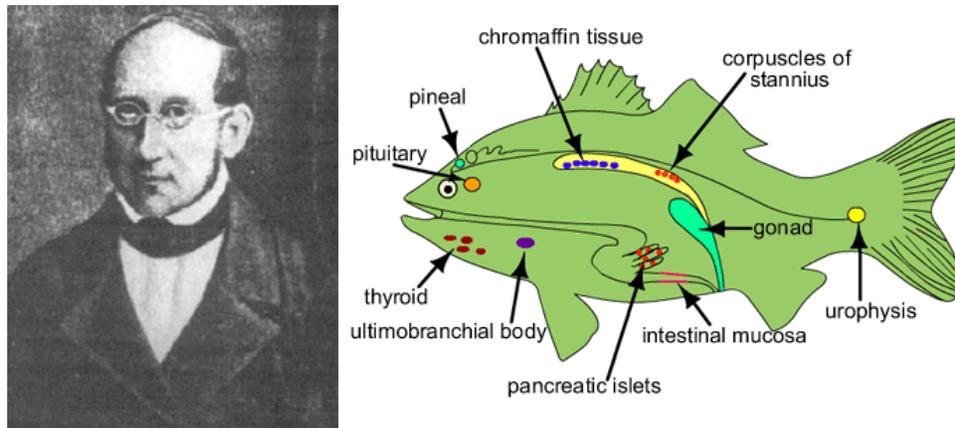


Figura 3. Os corpúsculos de Stannius. A esquerda, uma foto do Professor H. Stannius, descobridor das glândulas que secretam Stanniocalcina, os Corpúsculos de Stannius, representados neste esquema da anatomia de um peixe ósseo, a direita. Adaptado de www.vet.ohio-state.edu.

Stanniocalcina tem efeito similar ao da calcitonina sobre toda a homeostase de cálcio do corpo (Ca^{2+}) em peixes ósseos. A remoção dos Corpúsculos de Stannius produz hipercalcemia (Ishibashi K, *et al.*, 2002). Os órgãos de peixes que são os principais alvos do efeito anti-hipercalcêmico de STC são as guelras (Wagner GF, *et al.*, 1998) e o intestino (Sundell K, *et al.*, 1992).

A expressão de Stanniocalcina foi por muito tempo considerada exclusiva aos Corpúsculos de Stannius, porém o mRNA de *STC* foi detectado em células do ovário, testículos e rins de peixes ósseos (McCudden CR, *et al.*, 2001). Entretanto, o nível de *STC* nestes órgãos é cerca de 100 vezes menor do que nos Corpúsculos de Stannius, o que possivelmente explica a descoberta tardia destes locais de expressão de *STC*. Permanece desconhecido se *STC*, em peixes, é sistematicamente secretado (na circulação) como um hormônio endócrino ou se age de forma mais local nos testículos, rins e ovário (Serlachius M, 2007).

A primeira forma homóloga de *STC* em mamíferos, *STC1*, foi isolada de forma independente em dois laboratórios: em um, durante estudos com fibroblastos humanos transfectados por SV40 (*Simian Vacuolating virus 40*) cujo objetivo era identificar genes envolvidos no controle da proliferação celular (Chang AC, *et al.*, 1995) e em outro, durante um *screening* por sequenciamento randômico de cDNAs de pulmão fetal humano (Olsen HS, *et al.*, 1996). Subsequentemente, o gene humano que codifica para o parálogo de *STC1* em mamíferos, *STC2*, foi identificado por um *screening* de sequências similares em

bancos de dados de sequências expressas (EST – *expressed sequence tag*) (Chang ACM, *et al.*, 1998, DiMattia GE, *et al.*, 1998 e Ishibashi K, *et al.*, 1998).

O grau de similaridade de sequência entre STC1 de humanos e STC de peixes é de 92%, sendo que dos primeiros 204 aminoácidos, 118 resíduos são idênticos. Entretanto, os últimos 43 resíduos da região C-terminal são completamente divergentes. O cDNA de *STC2* humana codifica uma proteína com 55 aminoácidos maior que a *STC1* e possui 34% de identidade com *STC1* humana e *STC* de peixes. O parentesco de *STC2* com *STC1* e com *STC* é mais evidenciado pela região N-terminal, onde entre os resíduos 41 e 160, 40% são idênticos (Figura 4). Esta identidade é mais acentuada quando comparado apenas *STC1* e *STC* de peixes, chegando a 53%. Claramente, *STC1* é mais próxima e relacionada à *STC* de peixes do que com seu parálogo humano *STC2* (Chang ACM, *et al.*, 2003).

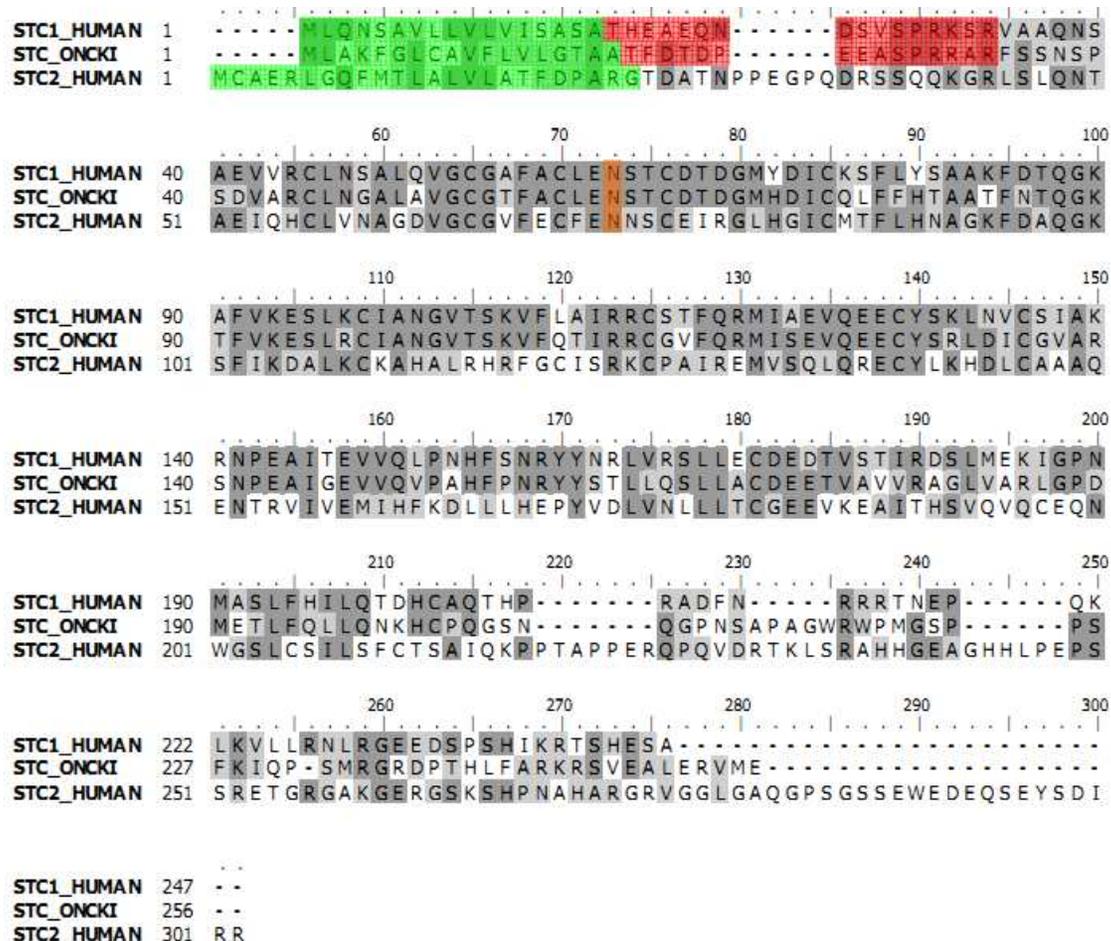


Figura 4. Alinhamento entre sequências de STC-1 e -2 humanas e a STC de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*, família Salmonidae). Marcações em tons de cinza indicam conservação (de acordo com a matriz de substituição PAM250), em verde: peptídeo sinal, vermelho: pró-peptídeo e laranja: sítio de N-glicosilação. Adaptado da dissertação de doutorado de Daniel Maragno Trindade (UNICAMP), autorizada pelo autor.

Stanniocalcina-1 humana é classificada como um hormônio glicoprotéico, de aproximadamente 27 kilodaltons (kDa) e composta por 247 aminoácidos, cujos os 17 primeiros compõem um peptídeo sinal, responsável por sua capacidade de ser secretada para o meio extracelular. Em 2009, dados publicados pelo nosso grupo de pesquisa contribuíram para diversos avanços com relação à estrutura de STC1 humana. Neste trabalho, Trindade DM e colaboradores demonstraram que a proteína STC1 humana, exibe o mesmo padrão de formação de cinco pontes dissulfeto que a STC de peixes, entre suas 10 cisteínas extremamente conservadas, e também homodimeriza-se pela cisteína 202 (Figura 5).

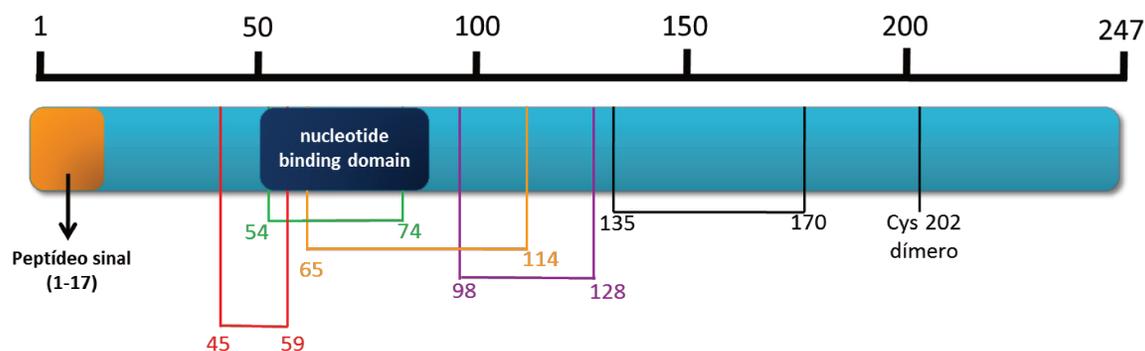


Figura 5. Estrutura primária da proteína humana Stanniocalcina-1 humana. Note que das 5 pontes dissulfeto de STC1, 4 estão presentes na região N-terminal, restando a região C-terminal apenas uma ponte dissulfeto e uma cisteína responsável pela formação do homodímero. STC1 humana ainda possui um *nucleotide binding domain* (Ellard JP, 2007), relacionado a vias de atuações de STC1 em mitocôndrias.

Neste mesmo trabalho publicado em 2009, nosso grupo realizou estudos estruturais de baixa resolução, através de SAXS (*small angle X-ray scattering*) que mostraram que STC1 humana apresenta-se como um homodímero de aspecto alongado em solução e os modelos sugerem que a homodimerização ocorra no formato anti-paralelo, de forma a expor as regiões N-terminal nas extremidades e concentrar na região central as porções C-terminal, responsáveis pela dimerização (Trindade DM, *et al.*, 2009) (Figura 6).

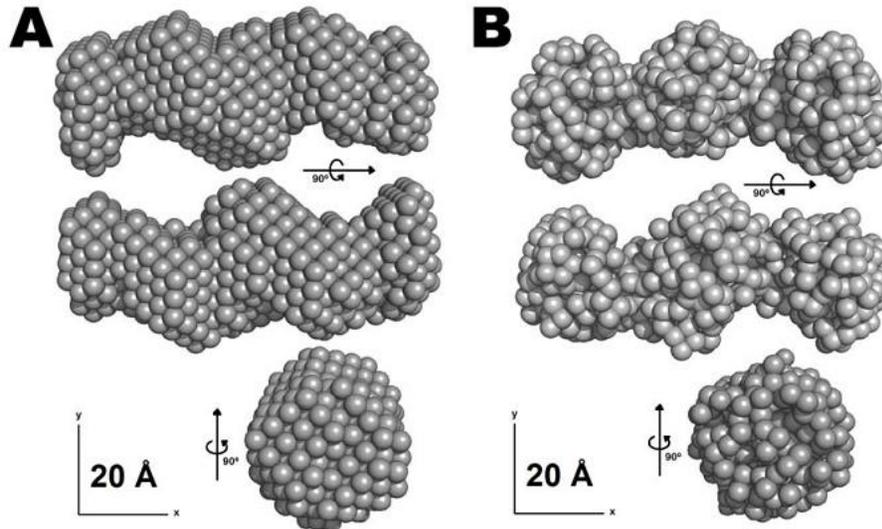


Figura 6. Modelos de baixa resolução *ab initio* gerados por dados extraídos por SAXS. (A) Modelos filtrados *dummy atoms model* (DAMMIN). **(B)** Modelos *dummy residues model* (GASBOR). Figura extraída e adaptada do artigo de Trindade DM, e colaboradores (2009), autorizada pelo autor.

Stanniocalcina-1 é também uma proteína alvo de modificações pós-traducionais. O sítio de glicosilação N-ligado também é conservado entre as STCs (como mostrado em laranja na figura 4). A sequência consenso Asn-X-Thr/Ser (ao redor dos resíduos 62-72), são sabidamente glicosilados em enguias e em salmão (Butkus A, *et al.*, 1987; Wagner GF, *et al.*, 1992), entretanto não existem dados diretamente mostrados para STC1 de mamíferos. Por outro lado, o conteúdo de sacarídeos foi analisado em sistema de expressão por baculovírus e em células de ovário de hamster chinês (*CHO – Chinese Hamster Ovary*). Um sítio de glicosilação N-ligado foi encontrado (mas não determinado) e nenhum oligosacarídeo O-ligado foi identificado (Zhang K, *et al.*, 1998). Talvez essa glicosilação de STC1 humana explique o fato de, em géis SDS-PAGE, o padrão de migração desta proteína ser em forma de banda difusa e o peso molecular variar até 5 kDa a mais que o esperado.

Além de glicosilação, STC1 humana é também uma proteína fosforilada. Após a incubação de células HT1080, uma linhagem primária de fibrosarcoma, com ^{32}P , STC1 marcada foi encontrada no meio de cultura, de forma secretada. STC1 foi fosforilada por PKC (*protein kinase C*) *in vitro* e *in vivo*, e em ambas as situações a fosforilação ocorreu exclusivamente em resíduos de serina. O mapeamento de fosfopeptídeos também foi similar em ambos os experimentos, sugerindo que PKC deva ser uma quinase que atue realmente *in vivo* (Jellinek DA, *et al.*, 2000). Análises pelo programa PredictProtein/PHD feitas pelo trabalho de Trindade e colaboradores, em 2009, revelaram as serinas 176 e

216 como potenciais alvos de fosforilação por PKC, uma vez que tem predição de estarem mais expostas ao solvente e, portanto, mais passíveis de serem fosforiladas. Novos sítios de fosforilação por outras enzimas, são também propostos e discutidos nos resultados desta tese.

O gene de *STC1* humana está localizado no braço curto do cromossomo 8 (8p11.2-p21). Este gene contém 4 exons e os sítios de início de transcrição estão localizados 284, 271 e 153 nucleotídeos à 5' do códon de iniciação (metionina). A região 5' não traduzida é rica em repetições trinucleotídicas CAG, onde existem quatro blocos relativamente curtos, cada um contendo de 3 a 6 CAG repetidos, separados por 6 a 15 nucleotídeos (Chang ACM, *et al.*, 2003). Os 51 primeiros nucleotídeos do exon 1 codificam para um peptídeo sinal altamente conservado. A secreção de STC1 para o meio extracelular e sua forma de sinalização hormonal ainda não são muito bem compreendidos pela comunidade científica que propõe sua interação com receptores de superfície celular.

1.5 – Stanniocalcina-1 e as evidências de receptores de membrana

A literatura é vasta no que diz respeito a evidências da existência de proteínas na superfície celular que tenham afinidade por Stanniocalcina-1 e funcionem como receptores. Não é bem compreendido ainda, se Stanniocalcina-1 quando secretada, liga-se a receptores na membrana plasmática e dispara cascatas de sinalização intracelulares ou se Stanniocalcina-1 é endocitada e passa então a atuar dentro da célula. Também não se descarta a possibilidade de que ambas alternativas possam ocorrer de acordo com a finalidade de cada contexto fisiológico da célula. Devido aos diversos processos celulares relacionados à Stanniocalcina-1 e sua proposta multifuncionalidade (que será mais bem discutido no item 1.6 e na sessão de resultados e discussão), também se considera a possibilidade de haverem diferentes receptores que possuam afinidade a Stanniocalcina-1. Apesar de todas as evidências, até hoje, nenhum trabalho demonstrou experimentalmente qual é o (ou um dos) receptor(es) de Stanniocalcina-1.

Em 2002, McCudden CR e colaboradores utilizaram a proteína Stanniocalcina-1 fusionada a fosfatase alcalina (STC1-AP) para demonstrar a existência de receptores para esta proteína em diferentes tecidos. Eles observaram, *in situ*, uma ligação de alta afinidade de STC1-AP na superfície celular de tecidos como rim e fígado. Além disso, purificaram mitocôndrias destes dois tecidos e observaram que nesta organela também ocorria uma ligação de alta afinidade de STC1-AP, mais especificamente na membrana

interna mitocondrial e viram que a essa ligação estimulava o metabolismo mitocondrial e a transferência de elétrons. Mais tarde, em 2007, este grupo descreve que esta ligação entre STC1-AP e os receptores mitocondriais pode ser desfeita de forma dose-dependente de acordo com a adição de ATP, que interfere de forma significativa em sua constante de dissociação (K_d) (Ellard JP, *et al.*, 2007).

Também através de ensaios de ligação *in situ*, o mesmo grupo observou em dois diferentes trabalhos, a afinidade da “big” STC1 (uma forma variante de STC1, expressa principalmente em células do ovário, cuja massa molécula pode atingir 84, 122 ou 135 kDa) na membrana plasmática de células: inicialmente do corpo lúteo de ovário humano (Paciga M, *et al.*, 2003) e mais tarde na superfície celular de células da adrenal de camundongos, principalmente na zona cortical, e também em células de adipócitos (Paciga M, *et al.*, 2005).

A afinidade de Stanniocalcina-1 pela superfície celular de diferentes tipos de células de carcinoma de mama, também foi observada, segundo os autores, em 91% das biópsias analisadas, mais uma vez através de estudos histológicos de ligação *in situ*. A presença destes receptores de Stanniocalcina-1 e também a produção da própria proteína por essas células malignas mamárias, levou os autores a proporem que neste caso, Stanniocalcina-1 possua um modo de ação autócrino (McCudden CR, *et al.*, 2004).

Por outro lado, no mesmo ano, Luo CW e colaboradores observaram, utilizando STC1 recombinante marcada radioativamente, que esta proteína possui receptores de alta afinidade na membrana plasmática de células granulosas do ovário, que por sua vez não produzem STC1, sugerindo neste caso um modo de ação parácrino.

Receptores de alta afinidade, cuja ligação foi descrita como saturável, para STC1, também foram descritos em células vermelhas do sangue de humanos, cães e porcos (através de imunohistoquímica) e os autores discutem essa ligação como uma possível via de *delivery* de STC1 para órgãos ou células distantes, reforçando seu modo de atuação hormonal (James K, *et al.*, 2005). Células MDCK (*Madin Darby Canine Kidney*) e IMCD3 (*Inner Medullary Collecting Duct 3*) também tiveram receptores de membrana identificados devido à ligação de alta afinidade de STC1 à superfície celular (Sazonova O, *et al.*, 2008).

Não apenas em mamíferos foram descritos a existência de receptores para Stanniocalcina. Existem três trabalhos que discutem a possível relação entre STC e o CaSR (*Calcium-Sensing Receptor*) em peixes. De forma geral, estes trabalhos observam que ocorre a expressão destes receptores nos Corpúsculos de Stannius: além de se tratar

de um receptor envolvido com a homeostase de cálcio, observa-se que modificações no nível de expressão deste receptor extracelular reflete na secreção de STC (Radman DP, *et al.*, 2002; Greenwood MP, *et al.*, 2009; Loretz CA, *et al.*, 2009). Em 2004, Tanega e colaboradores também mostram ligação de alta afinidade de STC1 em frações membranares de células de anelídeos e relacionaram que essa ligação possa fazer parte da regulação de troca de íons destes organismos com o ambiente.

Recentemente foi publicado o único trabalho da literatura que propõe vias de sinalização disparadas pela ligação de STC1 com receptores de membrana, com base experimental. Ao estudarem o potencial oncogênico de STC1 em tumores de ovário, os autores sugerem que a ligação de STC1 a receptores desconhecidos em células tumorais, promova o aumento da proliferação celular, a diminuição da apoptose e o consequente aumento do volume do tumor (Figura 7) (Liu G, *et al.*, 2010). Assim como diversos outros trabalhos (Sheikh-Hamad D, *et al.*, 2003; Yoshiko Y, *et al.*, 2004; Wagner GF, *et al.*, 2006 ; BlockGJ, *et al.*, 2010; Roch GJ, *et al.*, 2011), este autores discutem a elevadíssima relevância de se identificar o receptor de Stanniocalcina-1 para que se possa compreender melhor sua função e modo de atuação.

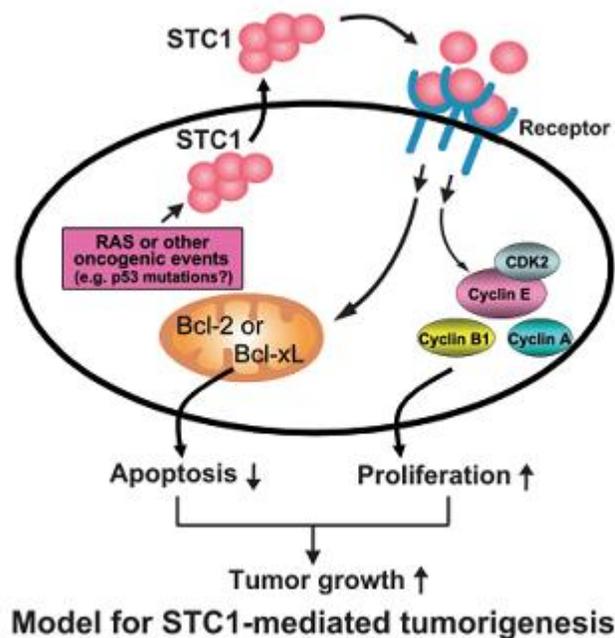


Figura 7. Modelo proposto para tumorigênese mediada por Stanniocalcina-1. RAS ou outros eventos oncogênicos (como mutações na p53) ativam a expressão de STC1 e elevam sua secreção. Sua ligação a receptores de superfície celular inibem a apoptose, por um mecanismo não compreendido, que eleva a expressão de fatores anti-apoptóticos como Bcl-2 ou Bcl-x. Também promove a progressão do ciclo celular por elevar os níveis de expressão de proteínas regulatórias do ciclo celular, como ciclina B1, ciclina A, ciclina E e CDK2 (*Cyclin-Dependent Kinase 2*) (Liu G, *et al.*, 2010).

1.6– Stanniocalcina-1, Câncer, Hipóxia, Angiogênese e outras implicações funcionais

Diferentemente do seu modo de ação nos peixes, onde STC atua de forma quase que exclusiva na homeostase mineral, principalmente na regulação de íons de cálcio, Stanniocalcina-1 de mamíferos, mais especificamente a humana, é tida como uma proteína multifuncional que também participa de diversos outros processos fisiológicos e celulares. Tem também sua atuação na homeostase mineral descrita (Olsen HS, *et al.*, 1996 ; Lafeber FP, *et al.*, 1988; Wagner GF, *et al.*, 1997; Madsen KL, *et al.*, 1998) e Zhang KZ e colaboradores (1998) mostraram que, tanto a proteína STC1 humana produzida em baculovírus, como em células de hamster (CHO), produzem o mesmo efeito inibitório do transporte de cálcio em brânquias de peixes que a proteína obtida de peixes, mostrando a alta conservação da sua função.

Contudo, fica cada vez mais claro que as STCs tenham expandido seus papéis em mamíferos, sendo esta suposição baseada no fato de que as STCs, em humanos, além de possuírem um padrão de expressão abrangente em diversos tecidos normais adultos (Chang AC, *et al.*, 1995; Varghese R, *et al.*, 1998; Worthington RA, *et al.*, 1999; Paciga M, *et al.*, 2002; Serlachius M, *et al.*, 2002; Yoshiko Y, *et al.*, 2004; Wagner GF, *et al.*, 2006), também apresentam uma expressão diferencial durante a embriogênese (Zhang K, *et al.*, 1998; Franzen AM, *et al.*, 2000; Jiang WQ, *et al.*, 2000; Yoshiko Y, *et al.*, 2003; Serlachius & Andersson, 2004).

Stanniocalcina-1 parece atuar em numerosos processos fisiológicos, patológicos e também relacionados ao desenvolvimento, como a adipogênese (Serlachius & Andersson, 2004), gravidez, lactação, organogênese, diferenciação neuronal, isquemia cerebral, estresse hipertônico e a estruturação óssea e muscular (Ishibashi K, *et al.*, 2002; Chang ACM, *et al.*, 2003). Além disso, ativa vias anti-oxidantes em células endoteliais e em macrófagos e também possui ação citoprotetora e anti-inflamatória (Sheikh-Hamad D, *et al.*, 2010).

Porém, com base no foco de estudo desta presente tese de doutorado, será mais detalhadamente descrito nesta seção, uma visão da literatura sobre o conhecimento gerado até hoje sobre Stanniocalcina-1 e suas implicações no câncer e em processos relacionados, como a angiogênese e a hipóxia, de forma a complementar a justificativa de escolha desta molécula como foco deste estudo.

Alguns trabalhos descrevem implicações de Stanniocalcina-1 com o câncer de mama. Wascher RA e colaboradores foram, em 2003, os pioneiros ao observarem a

presença do mRNA de *STC1* na medula óssea e no sangue de pacientes, além de terem encontrado co-relações significativas com fatores histopatológicos múltiplos no prognóstico, como tamanho do tumor primário, número de linfonodos positivos e estágios T, M e N. Por não conseguirem detectar o mRNA de *STC1* no soro e na medula óssea de voluntários saudáveis, classificaram *STC1* como um marcador molecular para o câncer de mama. O uso de *STC1* como biomarcador, possibilitou posteriormente que fosse feita detecção de células tumorais circulantes metastáticas nos estágios iniciais do câncer de mama (Nakagawa T, *et al.*, 2007), porém ao testarem este potencial em tumores de mama caninos, observaram que ao contrário dos tumores humanos, *STC1* teve uma diminuição da expressão e muitas vezes não pode ser detectada (Klopfleisch R, *et al.*, 2009). Além disso, como descrito anteriormente, receptores de alta afinidade para *STC1* em tecidos de câncer de mama são observados histologicamente (McCudden CR, *et al.*, 2004). Aparentemente, neste tipo de tumor, a elevação da expressão de receptores de progesterona A (PR-A *Progesterone Receptor-A*) induzida por nutrição rica em soja, eleva também a expressão de *STC1* (Dave B, *et al.*, 2010).

Não somente em tumores mamários Stanniocalcina-1 tem sido classificada com um marcador molecular. Em 2000, Fujiwara Y e colaboradores avaliaram este potencial em diversos tipos de tumores, primários e linhagens celulares. Eles concluem que existe de fato uma tendência de super-expressão do mRNA de *STC1* em todos tipos de câncer testados, e destacam os dados obtidos em câncer coloretal e carcinoma hepatocelular, onde a expressão de *STC1* não foi detectada nos tecidos correspondentes saudáveis. Ao testarem o soro de pacientes com carcinoma hepatocelular, foi possível a detecção do mRNA de *STC1* em 8 dos 11 pacientes testados, ao passo que não foi possível tal identificação em nenhum dos 31 indivíduos saudáveis usados como controle. Resultados semelhantes são descritos: O mRNA de *STC1* também foi detectado apenas no soro de pacientes com metástases de carcinoma hepático, câncer de mama e doença residual mínima na leucemia (descrito também por Tohmiya Y, *et al.*, 2004 – Figura 8), e não em indivíduos saudáveis (Koyde Y, *et al.*, 2006) e correlacionado ao mal prognóstico pós operatório em casos de tumor coloretal (Tamura S, *et al.*, 2011).

Análises em larga escala visando identificar novos biomarcadores para alguns tumores também descrevem *STC1* diferencialmente expresso em algumas neoplasias. Através de microarranjos de DNA, diversos sub-tipos de tumores do plexo coróide foram analisados em relação a células sadias e *STC1* se mostrou super-expressa em todos sub-

tipos, o que foi confirmado através de imunocitoquímica (Hasselblatt M, *et al.*, 2006). Utilizando técnicas de proteômica, o secretoma de fibroblastos isolados de pacientes com mieloma múltiplo foi comparado ao de fibroblastos epiteliais normais. Essa abordagem identificou STC1 com potencial biomarcador para a detecção precoce do melanoma metastático, além de ser considerado um fator importante neste microambiente tumoral (Paulitschke V, *et al.*, 2009).

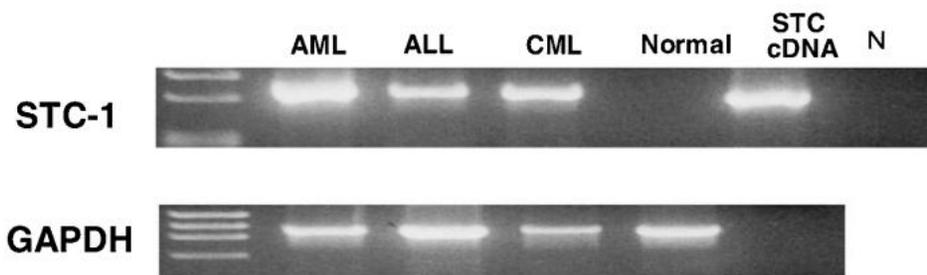


Figura 8. Análise da expressão do mRNA de *STC1* em sangue periférico de pacientes com leucemia por *nested* RT-PCR. N= *negative control*. No sangue periférico dos três tipos de leucemia testados, LMA, LLA e LMC, foi possível identificar expressão do mRNA de *STC1*, diferentemente do soro de voluntários saudáveis (Tohmiya Y, *et al.*, 2004).

São descritas implicações de Stanniocalcina-1 em diversos outros tipos de tumores, tais como: fibrosarcoma (Jellinek DA, *et al.*, 2000), glioblastoma (Lal A, *et al.*, 2001), neoplasia endócrina múltipla (Watanabe T *et al.*, 2002), lipossarcoma (Serlachius M, *et al.*, 2004), tumor epitelial (Block GJ, *et al.*, 2010) e câncer gástrico (He LE, *et al.*, 2011).

O papel de Stanniocalcina-1 na apoptose de células tumorais também não é muito bem compreendido, e parece ter relação com cada tipo de tecido. Quando estudada em células de tumor nasofaríngeo STC1 mostrou-se como uma proteína pró-apoptótica cuja expressão é regulada por p53 (Lai KP, *et al.*, 2007). Em células de adenoma de cólon humano, STC1 também foi considerada um fator pró-apoptótico, ao observarem que estas células quando incubadas com TSA (tricotostatina A – inibidor de histona deacetilases) tem o grau de apoptose aumentado, acompanhado pela elevação do nível de expressão de STC1 e sugerem que isso ocorra devido a uma regulação de NFκB no promotor de STC1 (Law AY, *et al.*, 2008). Já em células de tumor de pulmão incubadas com células multipotentes estromais (MSC – *Multipotent Stromal Cells*), a elevação da secreção de STC1 por parte das células MSCs, diminuiu a apoptose das células neoplásicas (Block GJ, *et al.*, 2008), assim como em tumor de ovário, onde o tratamento e a secreção de STC1 além de diminuir a apoptose, induziu a expressão de proteínas reguladoras do ciclo

celular (Liu G, *et al.*, 2010 – Figura 7), levando STC1 a ser classificada em ambos trabalhos como um fator anti-apoptótico.

Como pode ser percebido, a elevada expressão de Stanniocalcina-1 em quase todos tipos de tumores, deixa claro que esta proteína pode ter um papel chave no câncer humano, seja no processo tumorigênico, no desenvolvimento e/ou no estabelecimento e adaptação destas células neoplásicas. Talvez a maior de todas as evidências seja a relação de STC1 com a angiogênese e com a hipóxia.

Ao estudarem transcricionalmente genes que respondiam a hipóxia em tumores, detectou-se a indução da expressão do mRNA de *STC1* em linhagens celulares de câncer de mama e de colon e o que foi confirmado por imunohistoquímica nas regiões hipóxicas nestes tipos de tumores. Observou-se neste mesmo estudo, que a expressão de STC1 era regulada por HIF-1 (Lal A, *et al.*, 2001). A mesma abordagem, porém para neoplasia endócrina múltipla, também verificou a superexpressão de STC1 em situação de hipóxia (Eisenhofer G, *et al.*, 2004) e um ano mais tarde, foi reafirmado em linhagens celulares de câncer nasofaríngeo, colon e de ovário, o estímulo à expressão de STC1 pela hipóxia (Yeung HY, *et al.*, 2005).

Modelos *in vitro* de estudo de angiogênese também identificaram STC1 através de análises de perfis de expressão gênica, inicialmente em células endoteliais normais (Kahn J, *et al.*, 2000) e a seguir em tecidos neoplásicos (Gerritsen ME, *et al.*, 2002). Devido a tais evidências, logo se observou que a expressão de *STC1* também respondia ao estímulo de VEGF e discutiram-se possíveis relações com o crescimento e a vascularização tumoral (Wary KK, *et al.*, 2003). No mesmo ano, Zlot C e colaboradores, demonstraram a forma de modulação autócrina que STC1 exerce sobre a angiogênese epitelial em resposta a fatores de crescimento. Observou-se também que Wnt2, um fator de crescimento e diferenciação, regula a expressão de STC1 em células endoteliais (Klein D, *et al.*, 2009), e que em STC1 não afeta a apoptose dessas células endoteliais no ovário, mas realmente tem papel de modulador da angiogênese em células granulosas (Basini G, *et al.*, 2009).

Recentemente, um estudo feito com tumores gástricos deixou mais clara a relação entre STC1, angiogênese e o câncer. Stanniocalcina-1 foi capaz de promover a angiogênese *in vitro* e *in vivo* através da indução da expressão de VEGF. A inibição de VEGF no sobrenadante da cultura celular, através da neutralização com anticorpos, aboliu a angiogênese induzida por STC1, *in vitro*. O processo de regulação da expressão de

VEGF por STC1 foi descrito como sendo mediado pela ativação de vias de sinalização que envolvem PKC beta e ERK 1/2 (*extracellular-signal-regulated kinase 1/2*) e este aumento da angiogênese, promoveu o crescimento do tumor gástrico (He LF, *et al.*, 2011).

Todas essas implicações envolvendo Stanniocalcina-1, principalmente com o câncer, a tornam um excelente alvo para geração de ciência aplicada e tecnologias que se beneficiem de suas características funcionais e estruturais.

1.7 – Stanniocalcina-1 e o seu estado da arte

De acordo com a WIPO (*World Intellectual Property Organization*), a agência das Nações Unidas que se dedica a desenvolver, organizar e divulgar internacionalmente o sistema de Propriedade Intelectual e Patentes, cerca de 70% de todo conhecimento gerado até hoje no mundo está contido de forma exclusiva em documentos de patentes e não em artigos científicos. Obviamente que este número é bastante variável de acordo com cada área específica do conhecimento, e no caso de ciências biológicas, que possui um dos maiores acervos de revistas científicas, esta porcentagem tende a ser consideravelmente menor. Entretanto, não podemos descartar os bancos de dados de patentes, como uma importantíssima fonte de informações, atualização e conhecimento, ao buscarmos entender melhor determinado assunto.

Apenas a título ilustrativo, uma busca no portal *PubMed* do NCBI, o principal banco de dados de artigos científicos da área biomédica, com o termo “*Stanniocalcin*”, retorna 294 artigos científicos, ao passo que utilizando o mesmo termo no PATENTSCOPE¹, o portal da WIPO que busca apenas patentes depositadas via sistema internacional e não cobre patentes depositadas de forma individual em países específicos, retorna 223 arquivos de patentes.

Durante o desenvolvimento desta tese de doutorado, foi realizado o monitoramento das patentes que envolvem Stanniocalcina-1, e pode-se perceber que a maioria das patentes tem seu respectivo artigo científico publicado, mas por via de regra, o depósito inicial do conhecimento é feito primeiramente na forma de documento de patente e mais tarde (algumas vezes, anos depois) na forma de artigo científico. Isso possibilitou uma apropriação precoce do conhecimento o que garantiu não só a certeza do ineditismo na pesquisa realizada (evitando assim uma duplicação de esforços e

¹ www.wipo.int

investimentos), mas também geração de novas idéias para aplicação prática dos resultados obtidos.

Visto o grande número de patentes que envolvem a utilização de Stanniocalcina-1 ou descrevem vias de atuação, apenas as principais patentes que se relacionam de alguma forma ao foco e tema desta presente tese de doutorado serão introduzidas a seguir, de forma a complementar e exemplificar a aplicação prática do conhecimento sobre a proteína Stanniocalcina-1.

Nos Estados Unidos, um grupo da Universidade do Texas observou que células-tronco obtidas de ou em agregados mesenquimais esferoidais, expressam níveis de proteínas terapêuticas superiores aos de células-tronco mesenquimais cultivadas em monocamada. Os autores classificam STC1 como uma das proteínas terapêuticas mais expressas, atribuindo funções anti-apoptóticas e anti-inflamatórias e propõe novas formas de tratamento a diversas doenças, inclusive o câncer (WO/2011/060244).

Na Alemanha, uma patente descreve o uso de inibidores de angiogênese para determinados biomarcadores, visando o tratamento de doenças relacionadas à angiogênese, incluindo o câncer. Um dos biomarcadores de angiogênese identificados pelo inventor é STC1 e este descreve que inibidores de pequenas moléculas de ATP direcionados a várias quinases, diminuem a expressão de STC1, ao passo que outros inibidores direcionados a integrinas, elevam a expressão de STC1, em células HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*), reafirmando o papel de STC1 na angiogênese. (WO/2010/072348).

Em outra patente americana, são descritos métodos de predição para prognósticos em câncer assim como o monitoramento da respostas ao tratamento de tumores. Para isso, os autores utilizam alguns inibidores, dentre eles um inibidor para o receptor de VEGF, e a inibição deste receptor é monitorada de acordo com alterações na expressão de STC1 (WO/2005/059179).

A forma mais freqüente do uso prático de Stanniocalcina-1 é como um biomarcador, usado no diagnóstico de vários tipos de câncer. Uma patente holandesa prevê a diferenciação entre tumores coloretais adenomas de adenocarcinomas e para isso um painel de genes é analisado, dentre eles STC1 (WO/2008/122936). A identificação de células de melanoma e de células de carcinomas circulantes através de um *kit* que avalia a expressão gênica de alguns biomarcadores, também inclui análise de STC1 (WO/2006/031843). Outras patentes que visam a identificação de câncer de mama (US/2005/014208), carcinoma intestinal (WO/2003/03023059) metástases de melanoma e

de câncer de mama (WO/2004/045521), também utilizam *STC1* como biomarcador, sempre com foco em níveis de expressão de mRNA.

A única patente que prevê a identificação da proteína *STC1*, no soro de pacientes, visa o diagnóstico da leucemia através da técnica de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Esta patente japonesa (JP/2000/002709) descreve que foi possível a identificação do mRNA de *STC1* apenas no soro de pacientes com leucemia e não em voluntários normais e que isso irá possibilitar a identificação e o diagnóstico de leucemia baseado na identificação da proteína, porém não descreve nenhum teste efetivamente feito em pacientes. Essa patente é restrita ao território japonês e não influencia o uso comercial de seu conteúdo em outros países. É importante ressaltar que, não conseguimos identificar o uso real de rotina para nenhuma destas patentes apresentadas, mostrando que apesar de terem seu potencial aplicado protegido, a sociedade e o mercado ainda não se beneficiaram destas descobertas.

Além das características estruturais apresentadas no item 1.4, principalmente o fato de *STC1* ser uma proteína secretada para o meio extracelular, das evidências relatadas em diversos trabalhos sobre a existência de receptores de superfície celular para *STC1* (item 1.5) e a relevância da sua identificação, os trabalhos aqui discutidos da literatura e nas patentes, sugerem diversos aspectos funcionais e vias de atuação para esta proteína. Apesar de sua aparente multifuncionalidade, as particulares implicações de *STC1* nas células e tecidos neoplásicos e no microambiente tumoral, deixam evidente que *STC1* é um ótimo candidato a ser estudado e que compreender melhor sua atuação molecular dentro e fora da célula é de grande contribuição ao desenvolvimento científico aplicado a detecção, tratamento e combate a leucemia infantil.

2.1 – Objetivo Geral

Esta tese de doutorado teve por objetivo estudar formas de atuação da proteína humana Stanniocalcina-1 dentro e fora da célula humana, visando buscar um melhor entendimento de como seus parceiros de interação e os aspectos funcionais a eles relacionados, podem contribuir no entendimento da função de STC1 na célula humana e por consequência da leucemia infantil e em sua relação com o microambiente tumoral da medula óssea.

2.2 – Objetivos Específicos

Para o objetivo geral ser atingido foram propostos os seguintes objetivos específicos:

2.2.1 - Desenvolvimento de um *kit* diagnóstico visando a identificação da proteína STC1 em soro de pacientes com leucemia.

Para tanto se fez necessário produzir em larga escala a proteína STC1 recombinante *full length* e truncada, e sua utilização na geração e no teste de anticorpos monoclonais, para o estabelecimento de um ensaio do tipo ELISA sanduiche.

2.2.2 - Identificar parceiros de interação para STC1 humana, dentro e fora da célula, visando compreender melhor as vias de atuação e possíveis funções.

Visto que nenhum parceiro de interação foi descrito para STC1 humana, buscou-se explorar dados obtidos a partir de *screening* feito pelo sistema de duplo-híbrido em leveduras, *pull down* semi *in vivo* e co-imunoprecipitação aliados a espectrometria de massas. Alguns parceiros tiveram a relevância de sua interação estudada mais a fundo, de modo a propor novas implicações e funções moleculares para esta proteína.

3. Resultados e Discussão

Os resultados apresentados nesta seção serão expostos de acordo com a ordem apresentada nos objetivos específicos apresentados na seção anterior. Muitos dos resultados aqui apresentados foram publicados este ano na revista *Molecular Biosystems* (anexo a esta tese), e é importante frisar que a obtenção destes resultados contou com a valiosa contribuição científica dos demais autores, principalmente do Dr. Daniel Maragno Trindade.

3.1 - Desenvolvimento de um *kit* diagnóstico visando a identificação da proteína STC1 em soro de pacientes com leucemia.

Os dados previamente obtidos por ensaio de microarranjos de DNA (Tabela 1), que mostraram um aumento na expressão de STC1 em BMEC após o tratamento com plasma de pacientes com LLA em cerca de 8 vezes, forneceram mais uma evidência do que já era sugerido pela literatura científica (Tohmyia Y, *et al.*, 2004) e por uma patente (JP/2000/002709): o potencial uso de STC1 como um biomarcador para microambiente tumoral leucêmico.

Nós fomos capazes de confirmar o aumento da expressão do mRNA de *STC1* durante a co-cultura de células do estroma da medula óssea com blastos leucêmicos por PCR em Tempo Real (*primers* utilizados e maiores detalhes – Tabela 2 e materiais e métodos), e observamos um aumento semelhante (cerca de 7x) ao encontrado por microarranjo, em células estromais co-cultivadas com células primárias de LLA de 3 diferentes pacientes, após 24 horas de tratamento (Figura 9).

Tabela 2. Sequência de *primers* e concentrações usadas no PCR em Tempo Real Quantitativo (Santos, MT, *et al.*, 2011)

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Product size (bp)	Concentration in RQ-PCR reaction/nM
AF1Q-F	GGCCTGGGTCTGTGATACATA	72	400
AF1Q-R	TGCTTGCCCGATCATTG		
CG1109-F	AGGGAGGAAGAAAATTGCCTTT	95	400
CG1109-R	TCCATAAACTGAACAGTGCAGAATA		
DKK1-F	AGGAAGCGCCGAAAACG	88	400
DKK1-R	TTGATCAGAAGACACATATTCCA		
STC1-F	TGAGGCGGAGCAGAATGACT	78	100
STC1-R	CAACGAACCACTTCAGCTGAGT		
TCTEIL-F	ATGCTGAGGAAGCCACAAT	148	250
TCTEIL-R	TTATAGGCTTTCCCACTTAACCA		
GAPDH-F	ATGGAAATCCCATACCATCTT	68	400
GAPDH-R	CAGCATCGCCCCACTTG		

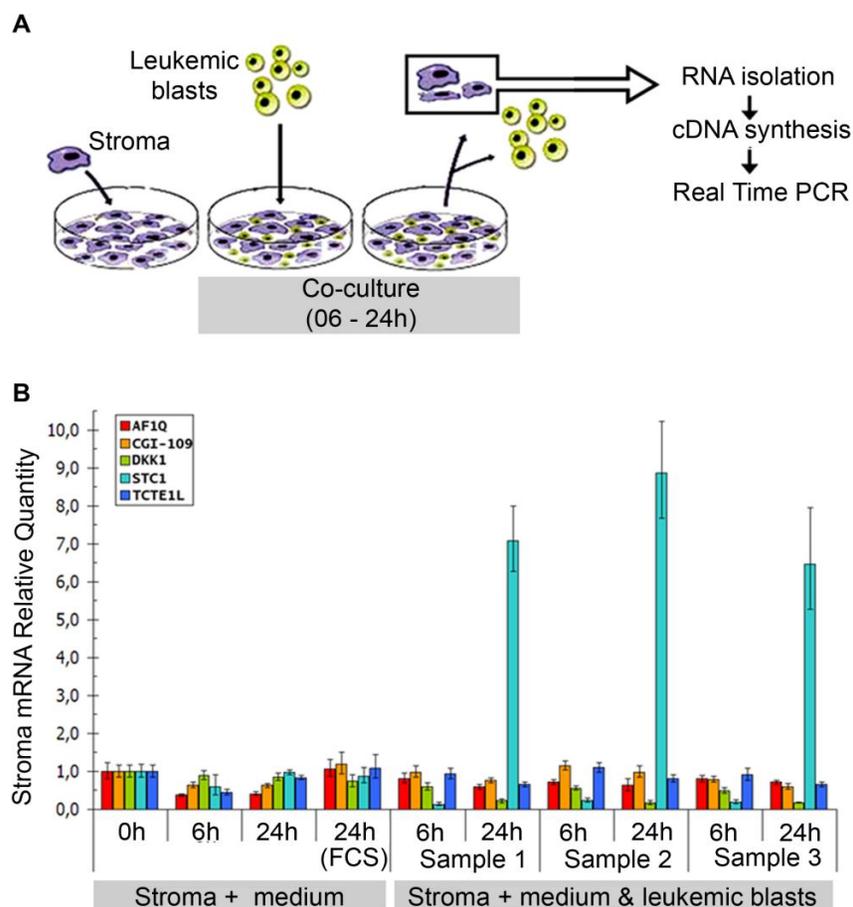


Figura 9. Análise de genes candidatos por PCR em Tempo Real Quantitativo. (A) Células estromais da medula óssea foram cultivadas até atingirem a confluência e posteriormente submetidas a co-cultura com células primárias precursoras-B de leucemia linfoblástica aguda, obtidas de diferentes paciente para os períodos de tempo indicados. As células estromais da medula óssea foram separadas e processadas para extração de RNA, síntese de cDNA e PCR em Tempo Real Quantitativo. **(B)** Expressão do mRNA de diferentes genes candidatos em células estromais da medula óssea, cultivadas em meio fresco sem Soro Fetal Bovino (BFS – *bovine fetal serum*) durante 6 horas e 24 horas (ambos com e sem BFS), ou estimulados pela co-cultura com blastos leucêmicos primários de três diferentes pacientes com LLA (amostras 1, 2 e 3) em meio fresco sem BFS. As mesmas amostras de células estromais da medula óssea antes do co-cultivo (0h) foram usadas para calibração (*set* para 1.0). As barras indicam o erro padrão com 95% de confiança. DKK1 e STC1 apresentaram inicialmente uma diminuição nos níveis de expressão, após 6 horas de co-cultura. STC1 demonstrou, após 24 horas, um grande aumento em seu nível de expressão, validando assim os dados de microarranjo e sugerindo que STC1 sirva de fato como um marcador do microambiente tumoral da leucemia. (Santos MT, *et al.*, 2011).

Este dado nos encorajou a estudar STC1 como provável e potencial biomarcador oncológico para leucemia visto que até hoje, nenhum trabalho mostra a tentativa de se identificar níveis diferenciais da proteína Stanniocalcina-1 no soro de pacientes com leucemia. Além do fato de ser possível identificar a expressão do mRNA de *STC1* em soro de pacientes com leucemia (Tohmyia Y, *et al.*, 2004; JP/2000/002709) e de *STC1* ser uma proteína sabidamente secretada para o meio extracelular (Barlet JP, *et al.*, 1998), outras evidências nos levaram a acreditar que seja possível também encontrar a proteína

no plasma destes pacientes: Em 2002, Paciga e seus colaboradores, publicaram um estudo de STC-1 em ratos e observaram a presença da proteína no soro, quando as fêmeas estavam em período de gestação e lactação, demonstrando a capacidade da proteína STC-1 transpor a membrana celular e entrar na corrente circulatória. No caso de câncer de ovário, foram identificadas quantidades da proteína STC1 no soro de pacientes significativamente maiores do que no soro de voluntários saudáveis (Liu G, *et al.*, 2010).

Desta forma iniciamos o desenvolvimento de um *kit* diagnóstico, que visa identificar níveis diferenciais da proteína STC1 em soro de pacientes com leucemia quando comparado ao soro de voluntários saudáveis, através da técnica de ELISA sanduiche.

O primeiro passo foi a produção de anticorpos monoclonais anti-STC1. Como a intenção é realizar o ensaio por ELISA sanduiche, fez-se necessário desenhar uma estratégia que identificasse anticorpos monoclonais reativos a diferentes epítomos (determinantes).

A estratégia inicial consistia em utilizar a proteína recombinante STC1 *full lenght* para imunizar os camundongos, e utilizar as construções truncadas, STC1 Cterminal e STC1 Nterminal para selecionar os diferentes clones de anticorpos, garantindo assim a identificação de clones que sejam reativos a diferentes epítomos. A truncagem da proteína em regiões C- e N terminais, visou respeitar a formação das pontes dissulfeto internas, de modo que não se separasse nenhum par de cisteínas (Figura 10 A).

A expressão da proteína STC1 *full lenght* foi feita em sistema de baculovírus em células de inseto, fusionada a uma cauda de 6 histidinas (STC1-HT) e após 3 passos de purificação, obteve-se a proteína em quantidade suficiente para imunização dos camundongos e em alto grau de pureza (Figura 10 B). A construção STC1 Cterminal foi expressa em sistema bacteriano (*E. coli* BL21 pRARE) fusionada à proteína GST (*Glutathione S Transferase*) e grandes quantidades da proteína foram isoladas, porém de forma 100% insolúvel a partir de corpos de inclusão, sendo necessário utilizar a técnica de *refolding* em solução para utilização desta proteína (Figura 10 C). Não foi possível estabelecer protocolo de expressão da construção STC1 Nterminal, nem mesmo em frações insolúveis em bactéria.

Isso fez com que a estratégia inicial fosse alterada: A imunização dos camundongos foi feita com a proteína STC1-HT e a seleção dos clones previa isolar um clone que fosse reativo a proteína *full lenght* e também a construção STC1 Cterminal (garantindo um clone reativo a um epítomo na região Cterminal) e isolar outro que fosse

reativo a proteína STC1-HT e *não* a construção STC1 Cterminal (garantido um clone reativo, teoricamente, a região Nterminal). Porém todos os 3 clones de anticorpos monoclonais isolados foram reativos à proteína STC1-HT e também à construção STC1 Cterminal.

Este resultado não garante, mas sugere que os 3 clones de anticorpos monoclonais obtidos sejam reativos ao mesmo epítopo. Porém, este dado não nos surpreendeu, visto que, como discutido na introdução, a proteína STC1 é extremamente conservada entre as diferentes espécies, principalmente pela região Nterminal (figura 4), o que sugere que a região imunogênica da proteína seja possivelmente a região Cterminal.

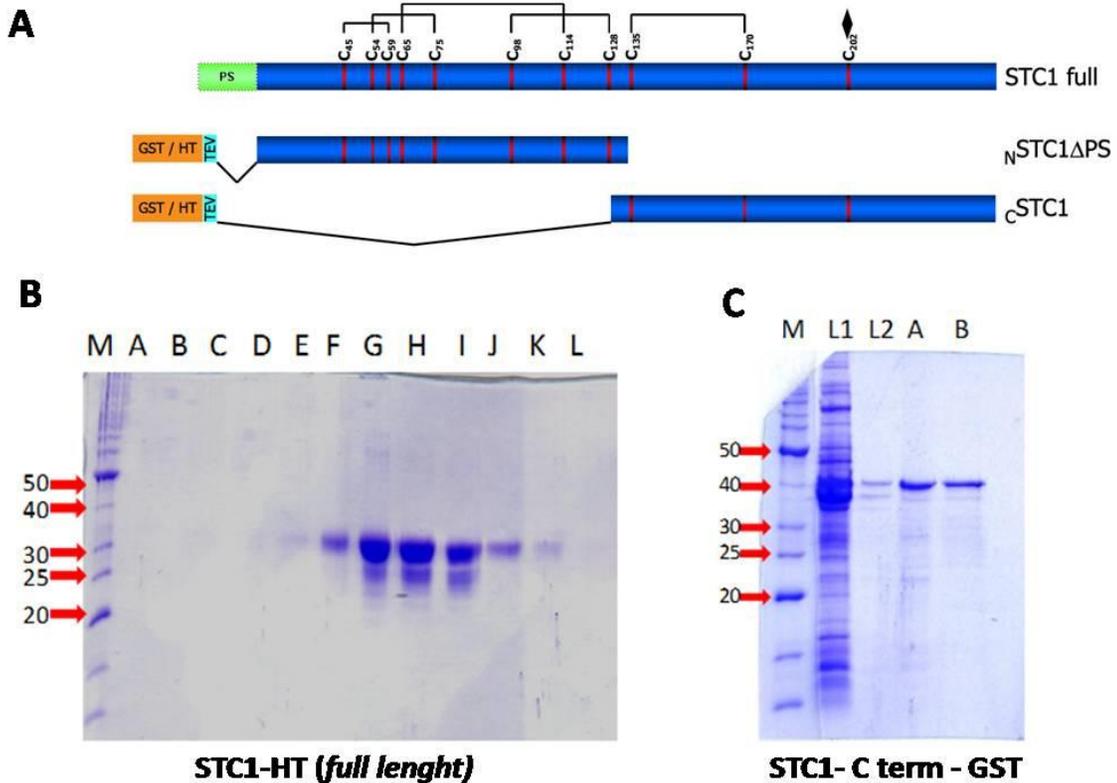


Figura 10. Esquema das porções N- e Cterminal de STC1 e expressão e purificação das mesmas. (A) Esquema em barra mostrando STC1 completa (STC1 full) e as construções codificando os domínios: amino-terminal sem o peptídeo sinal ($N_{STC1\Delta PS}$) e carboxi terminal (C_{STC1}). São mostradas a região do peptídeo sinal (PS, verde), as cisteínas (barras em vermelho) e suas respectivas pontes dissulfeto (linhas conectando as cisteínas) e a cisteína responsável pela dimerização de STC1 (♦, cisteína 202). **(B)** Gel SDS-PAGE mostrando o alto grau de pureza da proteína STC1-HT produzida em baculovírus. A-L são diferentes frações obtidas pela purificação em gel filtração. **(C)** Gel SDS-PAGE mostrando o isolamento e a pureza da proteína STC1 Cterminal-GST após processo de *refolding* em solução. L1 e L2 são amostras da lavagem da coluna de purificação por afinidade. A e B são frações da eluição. M – Marcador de peso molecular.

Entretanto, visto que a forma normalmente encontrada de STC1 consiste em um homodímero que se mostra alongado em solução (Trindade DM, *et al.*, 2009), mesmo que estes clones de anticorpos monoclonais sejam reativos ao mesmo epítopo, é possível que o anticorpo de captura se ligue em um dos monômeros, deixando disponível o outro monômero para que este seja identificado pelo anticorpo de detecção.

Os 3 clones de anticorpos monoclonais obtidos, foram biotinizados *in vitro*, para serem testados como anticorpos de detecção e para que não fosse preciso utilizar um terceiro anticorpo conjugado, o que poderia gerar sinais inespecíficos e artefatuais. Desta forma, a revelação do ensaio de ELISA pode ser feita utilizando-se estreptavidina fusionada a enzima HRP (*horseradish peroxidase*), beneficiando-se da altíssima afinidade desta molécula pela biotina, e garantindo que não haja reação cruzada com o anticorpo de captura (não biotinado).

Baseado nesta hipótese, os 3 clones de anticorpos monoclonais foram utilizados em ensaios de ELISA sanduiche, tanto na função de captura do antígeno, quanto na função de detecção (clones biotinizados). Para isso, todas as combinações possíveis entre eles foram testadas (Tabela 3), utilizando diversas concentrações destes anticorpos, assim como diversas quantidades do antígeno (STC1-HT), para se identificar a sensibilidade do ensaio.

Tabela 3. Nove diferentes combinações testadas entre os 3 clones de anticorpos monoclonais anti-STC1 humana, para ensaio de ELISA sanduiche. Apesar da possibilidade de todos os clones serem reativos ao mesmo epítopo de STC1-HT, o fato da proteína em sua forma fisiológica ser um homodímero, possibilitou que o mesmo clone fosse testado tanto para captura, quanto para detecção do antígeno.

		Anticorpos de Captura		
		Clone 1	Clone 2	Clone 3
Anticorpos de Detecção (biotinizados)	Clone 1	1x1	2x1	3x1
	Clone 2	1x2	2x2	3x2
	Clone 3	1x3	2x3	3x3

A combinação de anticorpos que melhor funcionou na identificação de STC1-HT em ensaio de ELISA sanduiche, foi justamente quando se utilizou o clone 1 como anticorpo de detecção, e o próprio clone 1 como anticorpo de captura (biotinado). Como é exemplificado no Gráfico 1, outras combinações de anticorpos não produzem sinais proporcionais e significativos, ao passo que essa combinação de anticorpos (Gráfico 2) se comportam de forma linear de acordo com as diferentes concentrações testadas para ambos.

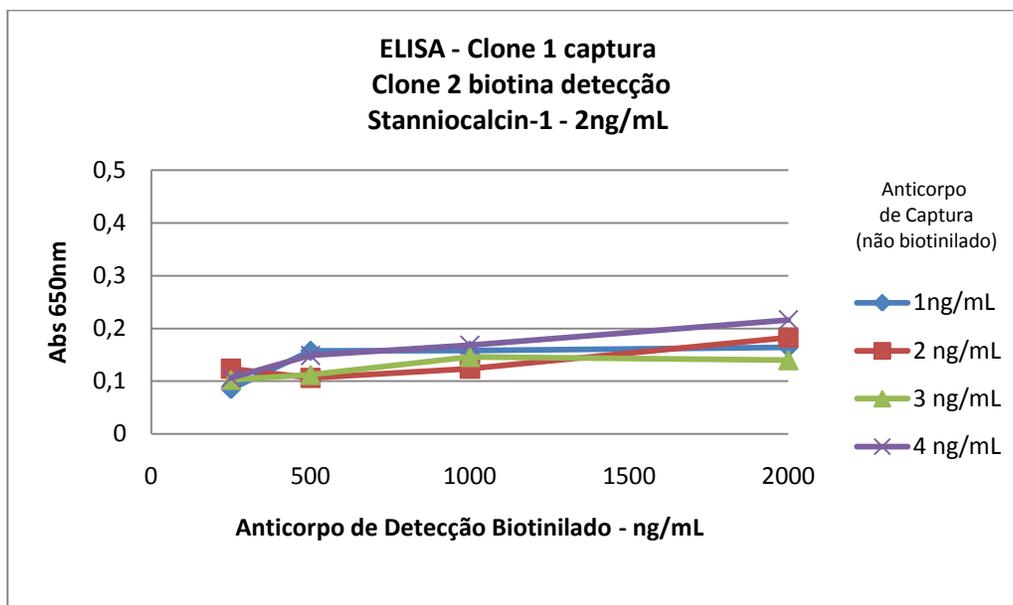


Gráfico 1. Ensaio de ELISA para proteína STC1. Neste ensaio o anticorpo monoclonal clone 1, foi utilizado para captura do antígeno e o anticorpo monoclonal clone 2 para detecção (biotilado).

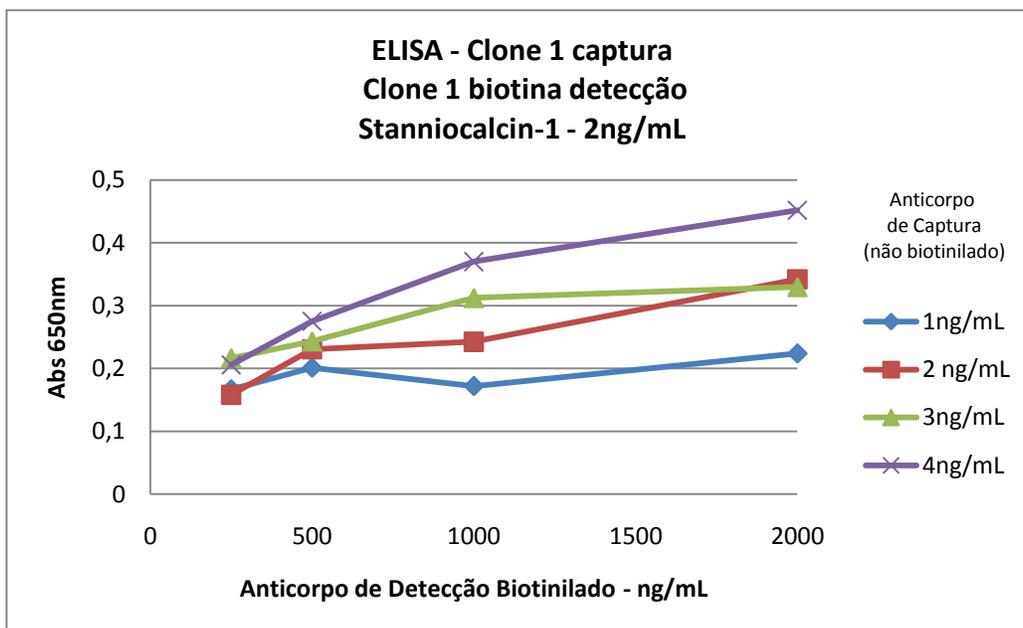


Gráfico 2. Ensaio de ELISA para proteína STC1. Neste ensaio o anticorpo monoclonal clone 1, foi utilizado tanto para captura do antígeno, quanto para detecção (biotilado). Isso é possível devido ao fato de STC1 ser um homodímero. Observa-se um aumento do sinal de absorbância de acordo com o aumento da quantidade de anticorpos utilizados, demonstrando que o ensaio foi positivo.

Além disso, concentrações crescentes de STC1-HT foram testadas, para avaliar a sensibilidade do ensaio. De 500 pg/mL a 500ug/mL, a menor quantidade de STC1-HT que o ensaio ELISA foi capaz de detectar de forma confiável foi 2ng/mL, como mostrado no gráfico 2.

Este resultado, ainda que preliminar, despertou interesse em uma empresa, cujo foco é justamente o desenvolvimento de *kits* ELISA imunodiagnósticos. Residente na Incubadora de Empresas da Unicamp (INCAMP), a RheaBiotech atua na área de biotecnologia a cerca de 4 anos e desenvolve anticorpos e ensaios ELISA para o mercado nacional.

Atualmente, o contrato de transferência de tecnologia e *know how* está em elaboração e deverá ser finalizado em breve. Essa parceria envolve o LNBio, o Centro Infantil Boldrini e a RheaBiotech, e o contrato, no que diz respeito a parte científica, prevê:

- Finalização conjunta do desenvolvimento do *kit* diagnóstico (LNBio / Rhea);
- Testes iniciais em soro de camundongos com leucemia (LNBio / Boldrini / Rhea);
- Testes finais em soro de pacientes leucêmicos (LNBio / Boldrini / Rhea),
- Disponibilização no mercado do *kit* diagnóstico (RheaBiotech).

Esse desenvolvimento em conjunto com a iniciativa privada é vital para que esta tecnologia seja absorvida de forma prática e efetiva. A idéia atual é utilizar este teste de ELISA como uma ferramenta a mais no diagnóstico da leucemia, porém, no momento oportuno, o seu potencial também será avaliado quanto a sua utilidade no prognóstico, acompanhamento do tratamento e remissão. Também está previsto que este *kit* possa ser testado para as mesmas finalidades em outros tipos de câncer, uma vez que a literatura sugere que STC1 também possa ser usada como biomarcador de outros tipos de câncer.

3.2 - Identificar parceiros de interação para STC1 humana, dentro e fora da célula, visando compreender melhor as vias de atuação e possíveis funções.

Diferentes estratégias foram utilizadas buscando-se identificar parceiros de interação para proteína humana STC1, uma vez que nenhum trabalho havia relatado interações moleculares para esta proteína. A identificação de proteínas que estabeleçam interação com STC1 é relevante para que se possa propor e identificar vias de atuação, rotas moleculares e processos celulares que permitam um melhor entendimento da forma de ação desta proteína dentro e fora da célula humana e auxilie no estabelecimento de funções específicas.

3.2.1 – O ensaio de duplo híbrido em leveduras

A primeira abordagem feita pelo nosso grupo, visando identificar parceiros de interação para STC1 humana, foi através do sistema de duplo-híbrido em leveduras. Para realizar este *screening* a proteína STC1 foi clonada em vetor pBTM116 fusionado ao domínio de ligação ao DNA, LexA. Nesta clonagem, a extremidade amino-terminal foi deletada, de forma a excluir a região correspondente ao peptídeo sinal (LexA-STC1ΔSPa), evitando assim a secreção desta proteína e garantindo sua permanência intracelular.

Antes de se realizar o *screening*, a construção LexA-STC1ΔSPa foi testada por ensaio de ativação autônoma para os genes repórteres (*His3* e *LacZ*) e não observamos nenhuma auto-ativação dos repórteres. Isso demonstra que STC1 por si só, não tem a capacidade de ativar os genes repórteres e de gerar falsos positivos. As interações identificadas demonstram, portanto, uma interação específica e direta com a proteína STC1. A ausência de auto-ativação da isca é um pré-requisito absoluto para o sucesso da execução de um *screening* através do sistema de duplo-híbrido em leveduras.

Tendo este controle assegurado, nós realizamos este *screening* em bibliotecas humanas de cDNAs de cérebro fetal, medula óssea e leucócitos. A construção usada como isca, LexA-STC1ΔSPa, gerou cerca de $1,5 \times 10^6$ clones co-transformados, considerando as três bibliotecas usadas e todos foram testados contra os dois genes repórteres.

Um mapa de interações foi desenhado para STC1 e tais interações exibem uma complexa rede (Figura 11). Um total de 22 proteínas foram identificadas e seus fragmentos e domínios assim como suas localizações celulares de acordo com o GeneOntology (Lomax J, 2005) são apresentadas na tabela 4.

As proteínas foram agrupadas, de acordo com seus respectivos compartimentos celulares, em sete grupos, apesar de algumas proteínas estarem presentes em mais um grupo: nucleares (LMNA, MAPK14, FUS, QRICH1, SAP18, SP100 e SUMO1), retículo endoplasmático (ERN1, JSRP1, TMEM132a, e FLJ20254), mitocôndria (MTND1 e ALAS2), citoplasma, (ALDOA, FTL, MAPK14 e SUMO1), membrana plasmática (ANPEP, CMTM3, DAGLB, FNDC4 e TMEM132a), extracelular/secretada (ELA2) e células vermelhas do sangue (HBA1/2). Apesar de QRICH1 e FLJ20254 não terem informações sobre suas localizações celulares no GeneOntology, nós utilizamos o programa preditor PSORT II (Nakai K, *et al.*, 1999) para inferir sua possível localização, sendo assim possível agrupá-las.

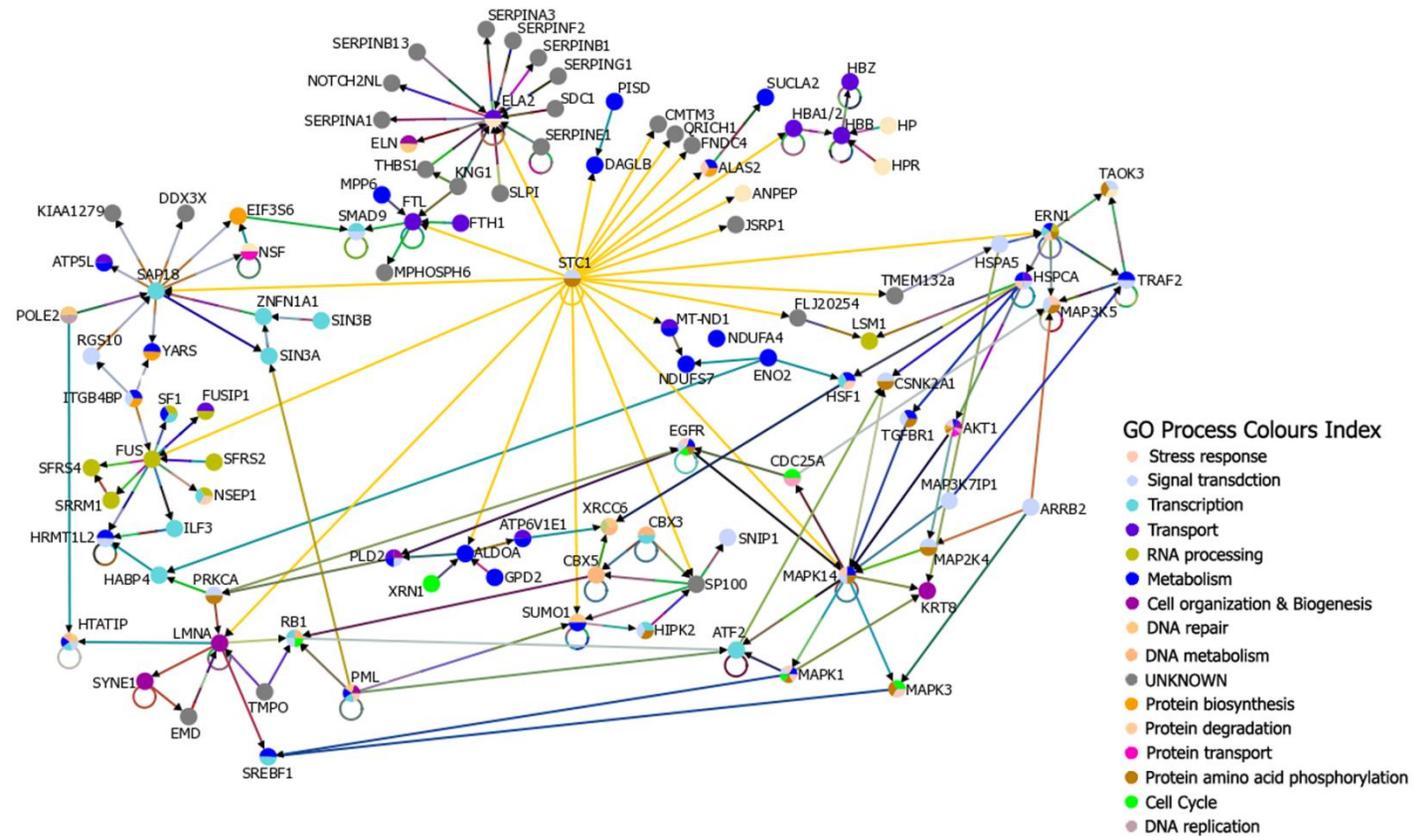


Figura 11. Mapa de interações da proteína humana STC1. Este diagrama mostra de forma simplificada a rede de interações de proteínas encontradas pelo *screening* com sistema de duplo-híbrido em levedura (ZBTB16 foi omitido neste diagrama, uma vez que pode se tratar de um falso positivo). As linhas indicam interações e cada cor é um indicativo do dado publicado sobre cada interação (as novas interações encontradas neste trabalho, são indicadas pelas linhas amarelas, ligado STC1 a suas presas). Cada proteína é representada por diferentes código de cores gerado pelo programa Osprey (Breitkreutz BJ, *et al.*, 2003) de acordo com a classificação do GeneOntology (Santos MT, *et al.*, 2011).

Tabela 4. Proteínas identificadas no ensaio de duplo híbrido em leveduras (Santos MT, *et al.*, 2011)

cDNA library (no. of clones)	Official symbol (Entrez GeneID) ⁸⁷	Protein fragment	Domain(s) present	Component/compartment according to GeneOntology ¹⁵
BM (9)	FUS (2521)	381–526 (526)	ZnF RBZ	- Nucleus - Membrane - Cellular component unknown
BM (8)	HBA1/2 (3039/3040)	1–142 (142)	G	- Hemoglobin complex
BM (5)	JSRP1 (126306)	1–314 (331)		- Undetermined
BM (4)	FLJ20254 (54867)	601–689 (689)	DUF2359	- Undetermined
L (4)	SAP18 (10284)	81–153 (153)		- Histone deacetylase complex
FB (1) & L (1)	MT-ND1 (4535)	9–60 (318)	NADHdh	- Mitochondrial respiratory chain complex I
FB (2)	FNDC4 (64838)	15–234 (234)	FN3	- Integral mitochondrial inner membrane
L (2)	ERN1 (2081)	1–59 (977)	PQQ	- Integral to plasma membrane
L (2)	CMTM3 (123920)	34–182 (182)		- Integral to endoplasmic reticulum membrane - Extracellular space - Integral to plasma membrane
L (2)	MAPK14 (1432)	1–38 (360)		- Cytoplasm - Nucleus - Spindle pole
L (2)	ANPEP (290)	875–967 (967)		- Cytoplasm - Integral to plasma membrane - ER-Golgi intermediate compartment
BM (2)	ELA2 (1991)	190–267 (267)	Tryp SPc	- Cell surface - Extracellular region
L (2)	SP100 (6672)	704–852 (879)	HMG, CC	- Nucleus - PML body - Chromatin/chromosome
BM (1)	LMNA (4000)	439–572 (572)	IF tail	- Nucleus - Nuclear lamina intermediate filament
BM (1)	ALDOA (226)	89–364 (364)	FBP A1a	- Undetermined
BM (1)	FTL (2512)	1–175 (175)		- Ferritin complex - Nucleus
BM (1)	ZBTB16 (7704)	55–176 (673)	BTP	- Nuclear speckles - PML body - Transcriptional repressor complex
BM (1)	ALAS2 (212)	341–460 (587)	AAT I PLP	- Endoplasmic reticulum - Mitochondrial matrix
L (1)	QRICH1 (54870)	502–667 (776)		- Integral to mitochondrial inner membrane - Intracellular - Cytoplasm - Membrane
L (1)	SUMO1 (7341)	1–101 (101)	UBQ	- Nucleus - Nuclear pore - Nuclear membrane - Nuclear speckles - Endoplasmic reticulum
FB (1)	TMEM132A (54972)	808–932 (1024)	CC	- Golgi apparatus - Integral to endoplasmic reticulum membrane
L (1)	DAGLB (221955)	613–668 (672)		- Integral to plasma membrane

BM: bone marrow; FB: fetal brain; L: leukocyte; AAT I PLP: aspartate aminotransferase superfamily (fold type I) of pyridoxal phosphate; BTP: bromodomain transcription factors and PHD domain containing proteins; CC: coiled coil; DUF2359: uncharacterized conserved protein; FBP A1a: fructose-1,6-bisphosphate aldolase Ia; FN3: fibronectin type III; G: globin; HMG: high mobility group; IF tail: intermediate filament tail; NADHdh: NADH dehydrogenase; PQQ: beta-propeller repeat occurring in enzymes with pyrrolo-quinoline quinone; Tryp SPc: trypsin-like serine protease; UBQ: ubiquitin homologues; ZnF RBZ: zinc finger domain in ran-binding proteins.

Para confirmar as interações identificadas pelo sistema de duplo híbrido, nós realizamos um ensaio de GST-*pull down* cruzando as proteínas identificadas no *screening* (fusionadas a uma cauda de GST), com a proteína STC1-HT produzida em células de insetos. Ao analisarmos os 22 clones, 18 cDNAs tinham o *frame* da sequência compatível com a estratégia de clonagem, para transferência direta do vetor pACT2 para os vetores de expressão com cauda GST. Destes 18, fomos capazes de sub-clonar 11 e, destes, apenas sete (apresentados na figura 12 – SP100, FUS, JSRP1, SUMO1, TMEM132a, FDNC4-FIII e LMNA) apresentaram expressão de proteínas solúveis. No caso da proteína

FNDC4, foram desenhados primers para amplificar apenas a região extracelular (que é composta principalmente por um domínio de fibronectina tipo III [FNIII]). Mesmo utilizando PMSF (*phenylmethylsulfonyl fluoride*) como inibidor de proteases, algumas das proteínas expressas fusionadas a GST apresentaram alguma degradação nas condições de expressão que fomos capazes de estabelecer para obter expressão solúvel destas proteínas.

A proteína STC1-HT recombinante foi capaz de se ligar a todas as sete proteínas testadas (fusionadas a GST), mas não a proteína GST sozinha, demonstrando a especificidade das interações observadas (Figura 12).

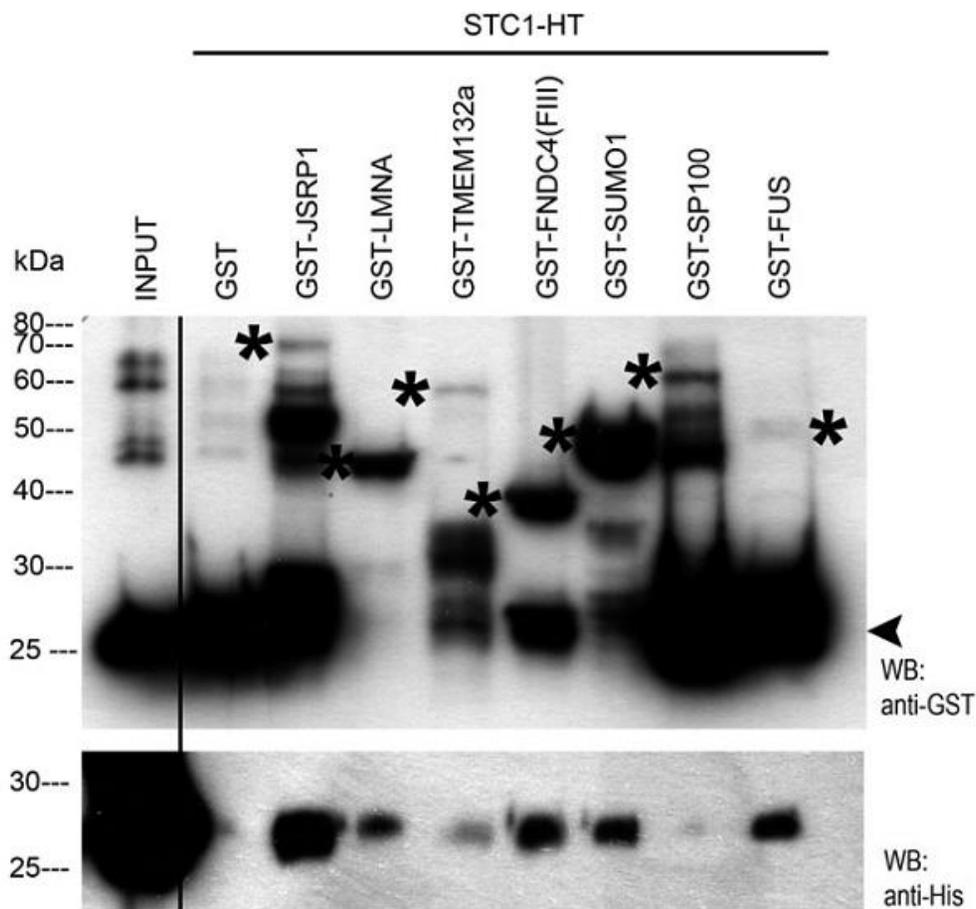


Figura 12. Confirmação *in vitro* das interações de STC1 com proteínas identificadas no sistema de duplo híbrido em leveduras. O ensaio de GST-pull down entre STC1-HT produzida em sistema de baculovírus e fragmentos das proteínas selecionadas. Todas as presas são proteínas fusionadas a GST. Os asteriscos indicam o peso molecular teórico destas proteínas recombinantes fusionadas a GST. A cabeça de seta indica o GST livre. INPUT indica a adição de GST no *western blot* superior (WB: anti-GST) e de STC1-HT no *western blot* inferior (WB: anti-6xHis) como controle positivo. (Santos MT, *et al.*, 2011)

Baseado no fato de que a região N-terminal da proteína STC1 é extremamente conservada entre todas as espécies e também com STC2, aliado aos dados estruturais de SAXS do nosso grupo (Trindade DM, *et al.*, 2009 – Figura 4), que sugerem que o homodímero de STC1 seja feito de forma anti-paralela, expondo as regiões Nterminal mais globulares nas extremidades, acredita-se que esta seja a região responsável por executar as atividades funcionais de STC1. A região Cterminal, teria um papel mais de coordenação estrutural, responsável pela homodimerização.

Para investigar esta hipótese, nós geramos duas construções de STC1 fusionadas ao domínio de ligação ao DNA, LexA, dividindo STC1 em aproximadamente duas metades (uma amino-terminal e uma carboxi-terminal, nomeadas LexA-N STC1 Δ SPb e LexA-C STC1, respectivamente). O corte entre estas duas metades foi feito de forma arbitrária, porém em uma região central onde não existe a conexão de nenhuma ponte dissulfeto na sequência primária da proteína (Figura 13 A). Ambas as construções foram testadas contra as presas identificadas no sistema e duplo híbrido.

Praticamente todas as proteínas testadas foram capazes de interagir com a região Nterminal de STC1 mas não com a região Cterminal. Interessantemente, FNDC4 foi capaz de estabelecer interação com ambas as regiões de STC1 (Figura 13 B).

Durante o mapeamento da interação entre ZBTB16 e as construções de STC1 N- e Cterminal, essa presa sozinha apresentou uma atividade β -galactosidase inespecífica (auto-ativação) com o vetor pBTM116 vazio (LexA apenas). O ensaio de confirmação com todas as presas sozinhas é essencial para que se exclua a possibilidade de que estas tenham características que ative a transcrição dos genes repórteres, gerando assim falsos positivos. No caso do regulador transcripcional ZBTB16, a auto-ativação dos genes repórteres já era esperada (Kelly KF, *et al.*, 2006; Raberger J, *et al.*, 2008). Desta forma, ZBTB16 foi considerado um falso positivo e descartado da análise.

Este resultado confirmou que a região de STC1 responsável por interagir com seus parceiros, é de fato a porção Nterminal e que provavelmente é a região da proteína responsável por realizar suas funções. Por tratar-se de um homodímero anti-paralelo que, ao que parece, expõe as regiões Nterminais, provavelmente STC1 possa interagir com mais de um parceiro ao mesmo tempo.

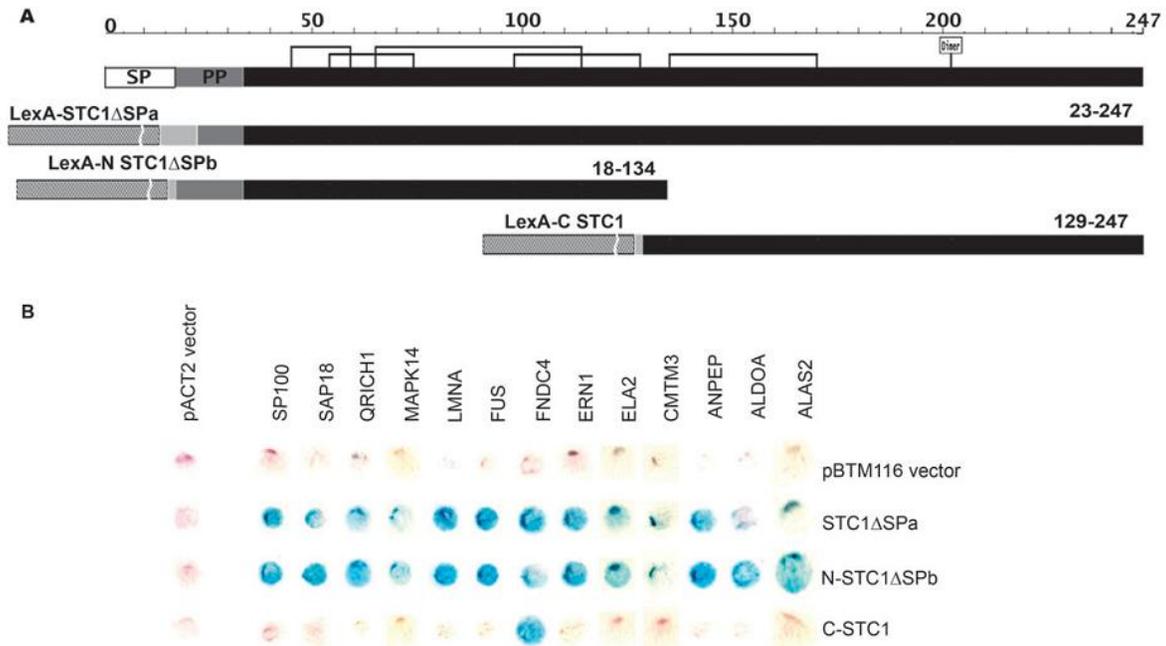


Figura 13. Mapeamento da região de interação de STC1 com suas presas através de sistema duplo híbrido em levedura. (A) Representação esquemática da proteína humana STC1 inteira e diferentes construções com o domínio de ligação ao DNA, LexA. A representação linear da sequência de aminoácidos de STC1 é mostrada com a indicação de diferentes porções (peptídeo sinal [SP] em branco, pró-peptídeo [PP] em cinza escuro e a cadeia madura da proteína em preto), suas pontes dissulfeto (*brackets*) e região responsável pela dimerização (Dimer). Todas as construções produziram proteínas fusionadas com LexA na região Nterminal. LexA-STC1ΔSPa foi usada inicialmente como isca no sistema de duplo híbrido, e todas as três construções usadas para mapear a região de interação de STC1. A barra em cinza claro indica a região do *linker* derivada da clonagem. **(B)** Fenótipo das colônias submetidas ao teste de β-galactosidase em leveduras da cepa L40 co-transformadas com construções do vetor pBTM116 expressando as iscas fusionadas ao LexA (indicadas no lado direito) e com presas fusionadas ao domínio de ativação Gal4 (indicado acima). (Santos MT, *et al.*, 2011).

A análise dos parceiros de interação de Stanniocalcina-1, como mostrado, sugere que esta proteína apesar de ser secretada para o meio extracelular, também possui implicações intracelulares, visto que interage com proteínas de praticamente todos os compartimentos celulares, o que reforça a ideia de ser uma proteína multifuncional.

Ainda não é muito bem compreendido como STC1 age dentro da célula humana. Por conter um peptídeo sinal, a ideia mais aceita na literatura (que ainda não foi demonstrada experimentalmente), é que, assim que produzida dentro da célula, esta proteína seja direcionada para vias de transporte vesiculares e secretada. Uma vez fora da célula, não se sabe se de forma autócrina ou parácrina, STC1 interage com receptores de membrana que possibilitam a sua internalização. Devido a essa evidência, Stanniocalcina-1 humana foi classificada como uma intracrine, que são proteínas sinalizadoras extracelulares, que possuem papéis e ações intracelulares (Re RN, *et al.*, 2010).

Nós também analisamos a sub-localização celular de Stanniocalcina-1, através de microscopia de fluorescência comum e confocal conforme pode ser visto na figura 14.

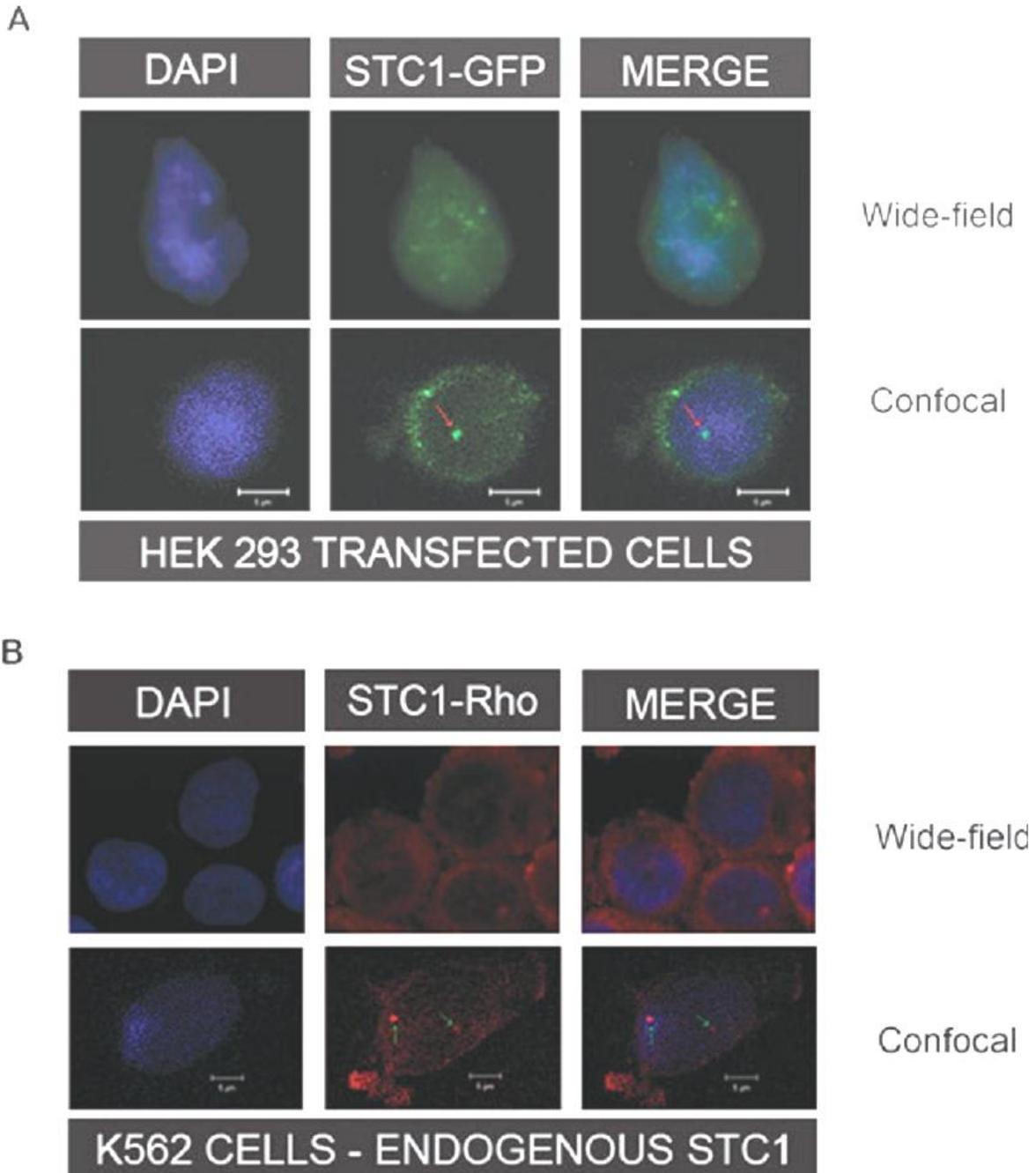


Figura 14. Stanniocalcina 1 localiza-se no citoplasma e em estruturas pontuais dentro do núcleo. Microscopia de fluorescência sugere que STC1 se localiza preferencialmente no citoplasma e de forma pontual no núcleo celular. A análise por microscopia confocal confirmou estas estruturas pontuais nucleares, sugerindo, de acordo com as proteínas identificadas no sistema de duplo híbrido, que estes *dots* possam ser corpúsculos nucleares. Em ambas linhagens celulares observa-se o mesmo padrão. **(A)** Células HEK293 (*Human Embryonic Kidney 293*) transfectadas com a construção STC1-GFP. **(B)** Linhagem celular de leucemia K562 marcada para proteína STC1 endógena. As setas (vermelhas em A e verdes em B) apontam para *dots* nucleares que co-localizam com a região nuclear marcada com DAPI. (Santos MT, *et al.*, 2011).

Essas imagens sugerem que STC1 realmente está distribuída por toda célula e os padrões de distribuição se repetem nas diferentes linhagens de células. Sejam células HEK293 transfectadas com o plasmídeo pEGFPN2-STC1, sejam células de linhagem leucêmica K562 com marcação para STC1 endógena, STC1 é sempre observada em toda extensão do citoplasma, no núcleo e região perinuclear. As imagens de microscopia comum (não confocal – *wide-field*) sugerem também uma deposição na membrana. Isso de certa forma confirma o que foi observado no ensaio de duplo híbrido em leveduras, sugerindo que STC1 estabeleça interações por toda célula humana.

O dado mais interessante que estas imagens nos forneceu, foi a presença de STC1 dentro do núcleo de forma pontual. Tanto STC1-GFP quanto STC1 endógena se organizam em forma de *dots* nucleares (como apontado pelas setas na figura 14) e isso despertou a nossa atenção.

Existem diversos corpúsculos nucleares, os *nuclear bodies* (NBs), que se organizam de forma pontual dentro do núcleo celular. Um dos principais, são os PML-NBs (*ProMyelocytic Leukemia Nuclear Bodies*), estruturas nucleares formadas por complexos multiprotéicos, ativas e dinâmicas que tem diversas implicações com o câncer (também chamados de PODs – *PML Oncogenic Dots*). Os componentes dos PML-NB atuam em rotas vitais de processos como apoptose, regulação da senescência celular e supressão tumoral (Krieghoff-Henning E, *et al.*, 2008).

Algumas das proteínas nucleares identificadas pelo ensaio de duplo híbrido, são proteínas que fazem parte da constituição destes corpúsculos pontuais nucleares, os PML-NB, sugerindo que essa localização *dot-like* de STC1 na região nuclear possa ser relacionada a estes corpúsculos. São elas: SP100 (Zimber A, *et al.*, 2004 - a segunda proteína mais abundantes nos PML-NB), SAP18 (Zhang Y, *et al.*, 1997) e SUMO1 (Shen TH, *et al.*, 2006 - talvez a proteína mais importante nestes corpúsculos, uma vez que regula a formação e atividade destes NBs).

Em 2009, em um trabalho efetuado pelo nosso grupo, Trindade DM e colaboradores publicaram predições de modificações pós-traducionais para STC1 humana e além de predições para fosforilação, observaram um motivo de SUMOilação na sequência de STC1.

A SUMOilação é uma modificação pós traducional que consiste na conjulgação de proteínas da família SUMO (*Small Ubiquitin-related MOdifiers*) em proteínas alvo, através de um ciclo muito semelhante ao ciclo de ubiquitinação (Figura 15). A família de proteínas SUMO possui 4 membros, representadas por SUMO1, SUMO2, SUMO3 e, mais

recentemente, SUMO4, todas proteínas muito semelhantes e de cerca de 11 kDa. A ligação de SUMO à proteína alvo não é aleatória e ocorre em resíduos de lisina (K) contido em um motivo bem estabelecido: Ψ K X D/E (onde Ψ pode ser qualquer resíduo alifático, K é a lisina onde ocorre a ligação covalente de SUMO com a proteína alvo, X pode ser qualquer aminoácido e D/E representa que a última posição do motivo pode ser ocupada ou por aspartato ou por glutamato) . A SUMOilação regula diversos processos celulares, incluindo transcrição, replicação, segregação cromossômica, reparo de DNA, trânsito núcleo-citoplasma, dentre outros. Portanto, uma proteína que sofre SUMOilação, pode adquirir ou desabilitar funções, alterar sua localização celular ou iniciar/cessar interações proteína-proteína, por exemplo (Gareau JR, *et al.*, 2010).

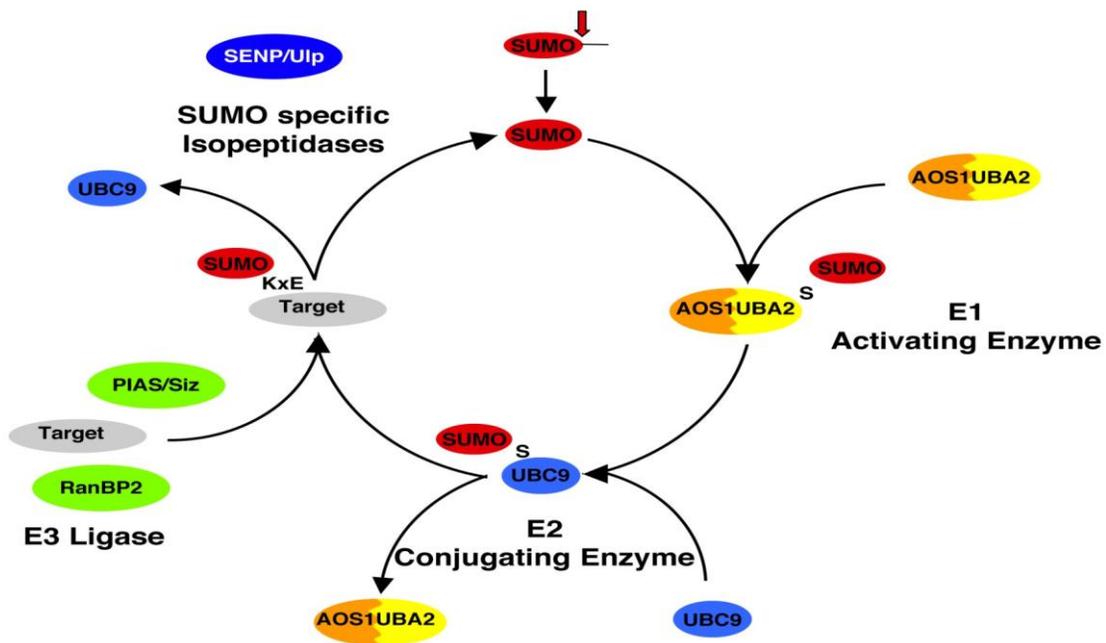


Figura 15. O ciclo de SUMOilação. A proteína SUMO é processada em sua região C-terminal (seta vermelha) e então ativada. Posteriormente esta proteína SUMO se liga a Enzima de Ativação, conhecida como enzima E1 (sempre representada pelo dímero AOS1/UBA2) através de ligação tioéster (S) em uma reação dependente de ATP. Em seguida, esta proteína SUMO é transferida a Enzima de Conjugação, conhecida como enzima E2 (também sempre representada por UBC9), também através de ligação tioéster (S). A enzima E2 é capaz então de SUMOilar a proteína alvo, transferindo a proteína SUMO para o resíduo de lisina correspondente. Este passo de transferência de SUMO por parte da enzima E2 para a proteína alvo, pode ser regulado (ou não), por proteínas conhecidas como E3 ligases. As chamadas SUMO E3 ligases, são proteínas que podem estimular ou diminuir o grau de SUMOilação das proteínas alvo, tendo papel regulatório. Diversas são as SUMO E3 ligase, sendo as mais bem estudadas RanBP2 e PIAS. Uma proteína SUMOilada pode ser deSUMOilada, através da catalise por proteínas da família da isopeptidases SENP, que clivam SUMO da proteína alvo. Esta molécula de SUMO removida de uma proteína alvo, pode ser reaproveitada em um novo ciclo de SUMOilação. Adaptado de www.biochem.mpg.de/jentsch/

Visto que SUMO1 foi uma das proteínas que interagiram com STC1 no ensaio de duplo híbrido, que esta interação foi confirmada por GST *pull down*, que STC1 se deposita no núcleo em *dots* que aparentam ser PML-NB (classificados como corpúsculos que funcionam como *hotspots* para ocorrência de SUMOilação no núcleo - Van Damme E, *et al.*, 2010) e que STC1 possui um sítio predito para ser SUMOilada com *score* de 79% (Trindade DM, *et al.*, 2009), nós investimos no estudo mais detalhado sobre a interação entre estas duas proteínas.

O primeiro passo foi comparar o motivo de SUMOilação de STC1 com o motivo e o *score* de outras proteínas sabidamente SUMOiladas. Nós observamos que outras proteínas com motivos e *scores* muito parecidos com o de STC1 foram descritas na literatura como proteínas realmente SUMOiladas (figura 17 A). Desta forma nós especulamos que STC1 não apenas interagiria com SUMO1, mas também seria uma proteína alvo de SUMOilação por SUMO1.

Como proteínas SUMOiladas podem adquirir novas funções, atividades ou parceiros de interação (Kroetz MB, *et al.*, 2009), nós estudamos a conservação do motivo de SUMOilação predito para STC1 (AK₈₃FD – lisina posição 83) em diferentes ortólogos de 24 diferentes espécies (Figura 16).

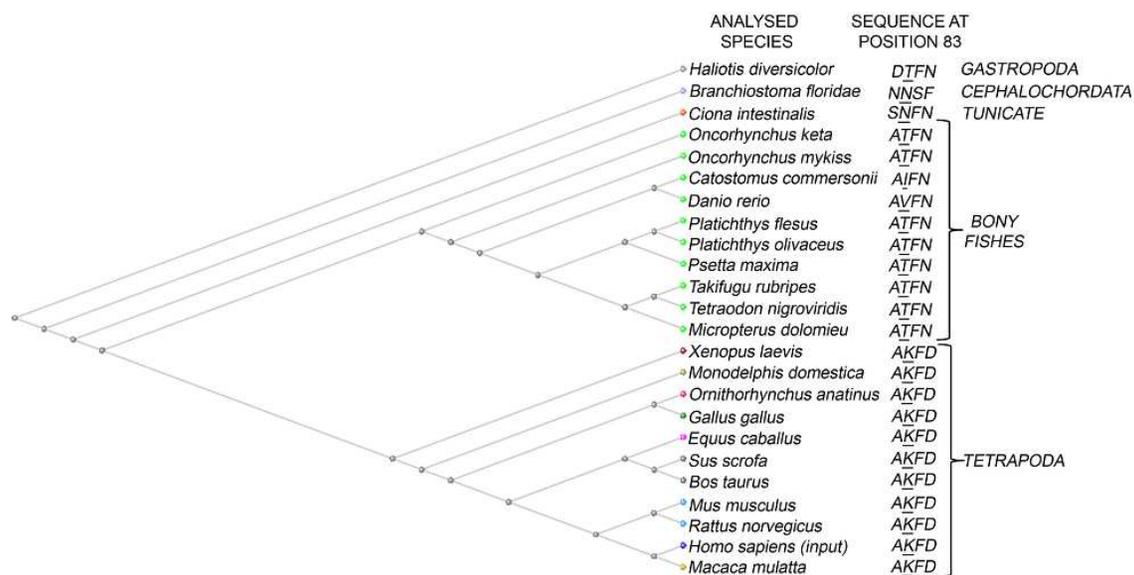


Figura 16. Análise da conservação do motivo de SUMOilação ao redor da lisina 83 da proteína Stanniocalcina-1 de 24 diferentes espécies. A sequência de *Homo sapiens* foi usada como *input* no banco de dados PSI-BLAST. Após 5 subsequentes submissões, excluindo sequências hipotéticas, sintéticas e algumas preditas, estas 24 espécies foram usadas para o alinhamento usando a plataforma COBALT (NCBI). O programa COBALT contruiu uma árvore filogenética usando o método de mínima distância rápida, com uma diferença máxima de sequência de 0,85 e o parâmetro de distância de Kimura (proteína). As 24 sequências foram analisadas na posição 83, na busca de se identificar motivos de SUMOilação conservados. Nós identificamos que o motivo de SUMOilação apareceu nos tetrápodes. (Santos MT, *et al.*, 2011)

Ao analisarmos esta árvore filogenética, nós observamos que o motivo de SUMOilação não ocorre antes do grupo dos tetrápodos, mas é 100% conservado dentro deste grupo. Esse resultado é muito bem correlacionado ao fato de que, no grupo dos peixes ósseos, onde não ocorre o motivo, o único processo celular a que STC1 foi relacionada até hoje é estritamente e apenas à homeostase de cálcio e fósforo (Wagner GF, *et al.*, 2006). Por outro lado, nos tetrápodos, especialmente nos mamíferos, parece ter havido um ganho de funções extras de STC1, uma vez que STC1 tem sido relatada participando em diversos novos processos celulares que incluem a lactação, a hipóxia, a angiogênese e o controle do crescimento ósseo e nenhum efeito significativo sobre a homeostase mineral tem sido relatado em mamíferos (Tremblay G, *et al.*, 2009 ; Basini G, *et al.*, 2010; Johnston J, *et al.*, 2010). Este dado também reforçou a hipótese de que STC1 humana pudesse ser uma proteína SUMOilada.

Desta forma, nós tentamos identificar se STC1 humana é um alvo de SUMOilação, tanto através de co-immunoprecipitação da proteína STC1 endógena de células HEK293, como por ensaios de SUMOilação *in vitro*.

Como pode ser observado na figura 17B e C, nós não fomos capazes de detectar nenhuma ligação de SUMO1 a proteína STC1-HT (em um *western blot*, é esperado um *shift* da proteína alvo, já que esta agora possui SUMO1 ligada covalentemente a sua estrutura), mostrando que STC1 não é uma proteína SUMOilada. Entretanto, como STC1 e SUMO1 interagem, nós testamos se esta interação não teria relevância, portanto, no ciclo de SUMOilação de outras proteínas. Para tanto, realizamos ensaios de SUMOilação *in vitro*, utilizando duas outras proteínas sabidamente SUMOiladas, e que até onde sabemos, não interagem com STC1.

Interessantemente nós observamos que a presença de STC1 na reação de SUMOilação, elevou de forma significativa a SUMOilação das duas proteínas testadas (Ki-1/57-GST e RanGAP1-GST) e não da proteína controle (GST). Este ensaio mostra que STC1 agiu como uma SUMO E3 ligase.

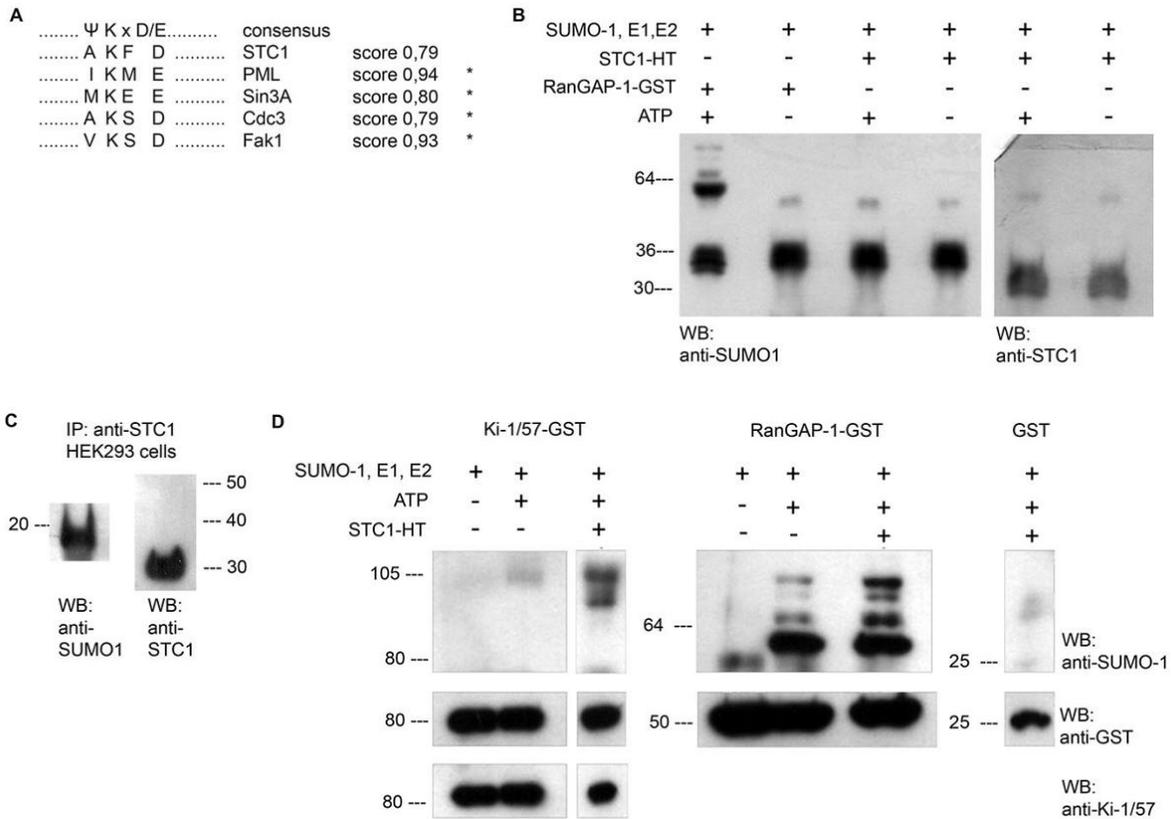


Figura 17. Stanniocalcina-1 humana não é uma proteína SUMOilada, mas age como uma SUMO E3 Ligase. (A) Análise bioinformática da proteína humana STC1 com o programa SUMOplot™ da Abgent (www.abgent.com/doc/SUMOplot). O motivo consenso Ψ K X D/E é usado pelo programa para analisar as sequências. O programa retornou os scores mostrados para as diferentes sequências submetidas. As sequências com (*) foram experimentalmente identificadas como SUMOiladas: PML e Sin3A (Yang SH, *et al.*, 2006), Cdc3 e Fak (Xue Y, *et al.*, 2006). O score de STC1 é classificado como de motivo com alta probabilidade (0,79). (B) Ensaio de SUMOilação *in vitro*. A proteína recombinante STC1-HT de baculovírus foi submetida a reação de SUMOilação através de um *kit* da BIOMOL. Como controle positivo, utilizou-se a proteína RanGAP1. Os controles negativos, são a mesma reação, sem a adição de ATP. O ensaio de SUMOilação *in vitro* não detectou SUMOilação para STC1-HT. (C) Células HEK293 foram usadas para ensaio de co-imunoprecipitação. O ensaio não conseguiu identificar SUMOilação da proteína STC1 endógena, mas por outro lado confirmou a interação entre ambas proteínas. O lisado total foi utilizado na corrida dos géis e analisado por *western blot*, mas não pode-se identificar nem STC1 nem SUMO1. Isso ocorreu provavelmente devido ao fato de que não há proteína suficiente na canaleta do lisado, comparado a canelata da co-IP, onde toda proteína ligada ao anticorpo foi concentrada em apenas um local. (D) Atividade SUMO E3 ligase de STC1. Os ensaios de SUMOilação *in vitro* foram realizados com duas diferentes proteínas, com a presença ou ausência de STC1-HT. As reações que continham STC1-HT tiveram aumento significativo da SUMOilação da proteína alvo (WB anti-SUMO1), mostrando que STC1 apresentou atividade E3 Ligase. A proteína GST foi usada como controle negativo e os *western blots* anti-GST e anti Ki-1/57 mostram que as mesmas quantidades de proteínas foram colocadas nos géis. (Santos MT, *et al.*, 2011).

Após ter sido identificada a atividade de SUMO E3 ligase de STC1 para Ki-1/57 e RanGAP-1 *in vitro*, decidimos avaliar o efeito desta atividade para SP100-GST (uma das proteínas identificadas e confirmadas no duplo híbrido, sabidamente SUMOilada - Sternsdorf T, *et al.*, 1999), e usada até mesmo como controle positivo em reações de SUMOilação *in vitro*. Interessantemente, ao contrário do que foi observado para Ki-1/57 e para RanGAP-1, STC1-HT diminuiu a SUMOilação de SP100-GST de forma dependente da concentração que foi utilizada (Figura 18).

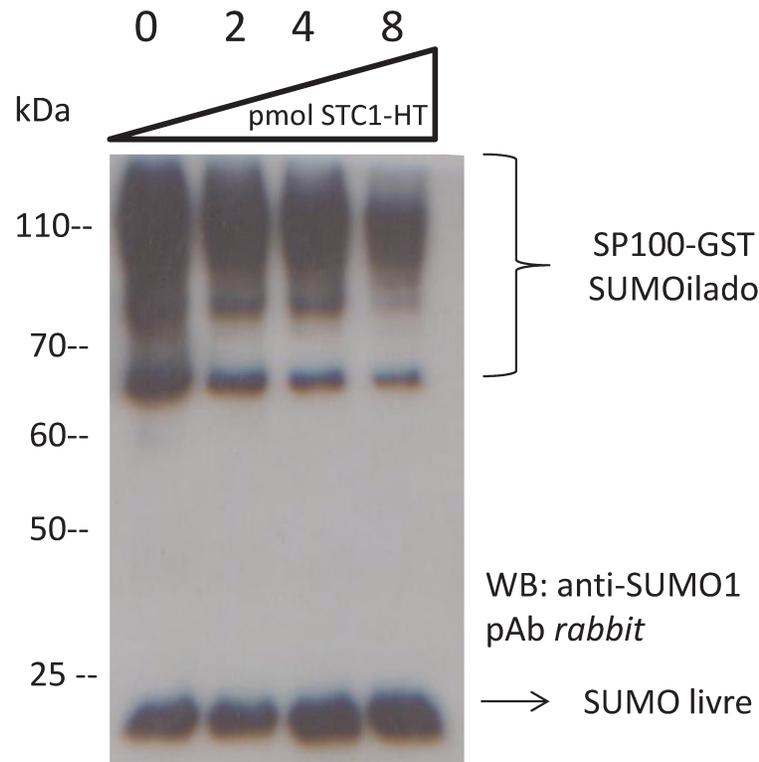


Figura 18. Ensaio de SUMOilação *in vitro* e atividade E3 ligase de STC1. Diferentes concentrações de STC1-HT foram adicionadas às reações de SUMOilação (0,2,4 e 8 pmol) de SP100-GST (241-360). O ensaio sugere que, no caso de proteínas SUMOiladas, que também interajam com STC1, a proteína STC1 diminui a SUMOilação destas proteínas de forma dose-dependente, reforçando assim a idéia sobre o papel de STC1 nas vias e ciclo de SUMOilação.

Observa-se que quanto mais STC1-HT foi adicionado a reação, menor é o sinal de SP100-GST-SUMO1 e maior é o sinal que corresponde a SUMO1 livre, não conjugado. Esse resultado levanta duas hipóteses: (i) Como STC1 interage com SUMO1 e com SP100, possivelmente pode estar havendo uma competição e um sequestro de SUMO1 por parte de STC1, impedindo que SUMO1 se ligue a SP100; (ii) STC1, por se ligar a SP100, pode estar impedindo que SUMO1 se ligue a SP100, bloqueando o sítio de SUMOilação. De uma forma ou de outra é interessante observar que a atividade E3 ligase

de STC1 ocorre em proteínas que, até onde se sabe, não tenham interação direta (Ki-1/57 e RanGAP1) de forma a aumentar o nível de SUMOilação; e em proteínas que interajam com STC1, de forma a diminuir o grau de SUMOilação. Porém, de ambas as formas, aumentando ou diminuído a SUMOilação, este resultado reforça a sugestão de que STC1 regula e participa do ciclo de SUMOilação e exibe atividade E3 ligase.

As demais interações encontradas no ensaio de duplo-híbrido em levedura, não foram estudadas de forma tão aprofundada quanto a interação entre STC1 e SUMO1, entretanto nos próximos parágrafos, serão discutidas possíveis implicações que possam haver entre STC1 e os demais parceiros de interação, com base na literatura disponível. Para que essas idéias e hipóteses fiquem mais bem organizadas, a divisão que agrupa as proteínas identificadas em diferentes compartimentos celulares será utilizada na forma de sub-itens:

- Proteínas Nucleares

O núcleo interfásico é uma organela altamente compartimentalizada, na qual os cromossomos ocupam territórios discretos e várias proteínas reguladoras estão presentes em corpúsculos nucleares específicos (NBs) e/ou estão difusamente distribuídos em todo o nucleoplasma (Kumaran RI, *et al.*, 2008). As lamininas, que pertencem à família das proteínas de filamentos intermediários, são os principais componentes de uma rede filamentosa subjacente à membrana nuclear interna, denominada lâmina nuclear. Entre os papéis atribuídos as lamininas estão a manutenção da integridade do envelope nuclear, oferta de sítios de ancoragem da cromatina e a determinação da arquitetura nuclear interfásica. Parceira de interação de STC1, Lamina A/C (codificada pelo gene LMNA) parece ter um papel na organização espacial dos *speckles*, um dos tipos de NBs, onde parece organizar fatores de *splicing* de RNA e transcrição via RNA polimerase II (Kuraman RI, *et al.*, 2002; Sylvius N, *et al.*, 2005; Sylvius N, *et al.*, 2008).

Outro parceiro de interação de STC1, FUS, também conhecido como TLS, é um membro da família FET de proteínas de ligação ao RNA, que também inclui as proteínas EWS e TAF15, que são encontradas tanto no núcleo, como no citoplasma e que transitam entre esses locais. Proteínas FET são direcionadas para grânulos de estresse induzido por choque térmico e estresse oxidativo. FUS requer seu domínio de ligação ao RNA para ocorrer esta translocação aos grânulos de estresse (Andersson MK, *et al.*, 2008). Além disso, a ribonucleoproteína nuclear pequena (snRNP – *small nuclear ribonucleoproteins*) associada de 69 kDa (69 KD), uma proteína que exibe semelhança estrutural com os

membros da família FET (TLS e EWS, de 95% e 65% de identidade, respectivamente), mostrou-se presente em *speckles* nucleares (Hackl W, *et al.*, 1996). Curiosamente, FUS foi uma das proteínas mais vezes identificadas em nosso *screening* para STC1 por ensaio de duplo híbrido em levedura. O mais interessante é que as STCs foram anteriormente relacionadas à hipóxia (Yeung HY, *et al.*, 2005) e estresse oxidativo (Ito D, *et al.*, 2004), assim é provável que poderiam ser encontradas juntas, em grânulos de estresse, com FUS e LMNA. A proteína FUS/TLS tem sido descrita não apenas no trânsito entre núcleo-citoplasma, mas também como uma SUMO E3 ligase para Ebp1, uma proteína supressora tumoral (Oh SM, *et al.*, 2010). Uma vez que estabelece interação com STC1, FUS pode estar envolvida no *shuttling* de STC1 e ambas podem estar atuando juntas na regulação da SUMOilação de outras proteínas, agindo como E3 ligases.

O fato de que STC1 pode aumentar a SUMOilação de Ki-1/57 talvez esteja ligada ao complexo em que se encontra a proteína OTUB1, um complexo de proteínas composto por FUS/TLS, CHOP e RACK1 (Edelmann MJ, *et al.*, 2009). RACK1 e Ki-1/57 foram descritas previamente como parceiras de interação (Nery FC, *et al.*, 2004). Apesar de não haverem SUMO E3 ligases descritas co-localizando com as lamínas nucleares, existem duas Ubiquitina E3 ligases, a Ret Finger Protein (Gillot I, *et al.*, 2009) e a RNF13 (Bocock JP, *et al.*, 2010) que foram assim descritas. Visto que a SUMOilação e a Ubiquitinação são processos com ciclos muito semelhantes, sugerimos que provavelmente a atividade SUMO E3 ligase de STC1 possa ocorrer também na região das lamínas. De fato, todas as imagens de microscopia confocal (STC1 endógena ou transfectada) mostram uma característica de deposição de STC1 perinuclear.

Outro sub-domínios nucleares são os PML-NBs, que recrutam e acumulam localmente um grande número de proteínas, muitas delas reguladores chave de vários processos, incluindo *splicing* e transcrição. A proteína PML está presente tanto no nucleoplasma quanto nos NBs, que também estão associados à matriz nuclear (Takahashi Y, *et al.*, 2004), e desempenha um papel na organização desses PML-NBs, direcionando proteínas, tais como SP100 (parceiro de interação de STC1), CBP, ou Daxx para esses domínios (Lallemand-Breitenbach V, *et al.*, 2001). O processo de SUMOilação foi proposto pela primeira vez como condição para levar PML aos NBs, comportando-se como um sinal de direcionamento aos NBs, mas, recentemente, a SUMOilação não é mais vista desta forma e sim como uma consequência da localização das proteínas nos NBs, embora o significado funcional da presença de tantas proteínas SUMOiladas nos NBs continua a ser obscuro. (Lallemand-Breitenbach V *et al.*, 2001; Takahashi Y, *et al.*, 2004).

Curiosamente, o parceiro de STC1, ZBTB16, embora descartado durante nossos experimentos de mapeamento como um possível falso positivo, também tem sido descrito como um componente de PML-NBs (Dhordain P, *et al.*, 2000).

A maioria das proteínas de PML-NBs são residentes transientes e são recrutadas ou liberadas após diferentes sinais de estresse celular. Um exemplo é a proteína p53, que durante diferentes tipos de estresses é estabilizada e ativada nos PML-NBs e, em seguida, pode induzir a transcrição de genes alvo levando a célula a senescência, parada de ciclo ou apoptose (de Stanchina E, *et al.*, 2004; Krieghoff-Henning E, *et al.*, 2008). Outro elo de ligação entre STC1 e os PML-NBs é a observação de que durante a morte celular gerada por estresse oxidativo induzido por iodoacetamida, p53 é estabilizada e acetilada, resultando no aumento da expressão do gene STC1 (Lai KP, *et al.*, 2007).

Da mesma forma, a exposição de células a altas concentrações de metais pesados afeta as proteínas SP100 e PML alterando seu número e distribuição dentro da célula (Zimber A, *et al.*, 2004). A reposição dinâmica de PML e SP100 nos NBs é modulada pela SUMOilação (Weidtkamp-Peters S, *et al.*, 2008) e estudos hipotetizam que os PML-NBs seja *hotspots* de SUMOilação (Van Damme E, *et al.*, 2010).

Outra proteína que interagiu com STC1, SAP18 (*Sin3 associated protein 18 kDa*), vem sendo mostrada por atuar em um papel chave do recrutamento gene-específico de complexos HDAC por uma série de fatores de transcrição. Atua como um módulo de adaptação de ligação proteína-proteína, ligando o complexo Sin3-HDAC a fatores de transcrição (McCallum SA, *et al.*, 2006). A transcrição de STC1 já foi descrita por ocorrer sob a regulação de HDAC3 em células de câncer de mama. Quando os receptores de progesterona (PR), que se ligam na região promotora de STC1, são SUMOilados, HDAC3 é capaz de se ligar ao PR e inibir a transcrição. Alternativamente, quando os PR são fosforilados, SUMO1 não pode se ligar aos PR, permitindo HDAC3 promover a transcrição de STC1 (Daniel AR, *et al.*, 2009). Recentemente HDAC7 foi mostrada por agir como uma SUMO E3 ligase, promovendo a SUMOilação de PML, desempenhando um papel importante na regulação da formação dos PML-NB (Gao C, *et al.*, 2008 ; Gao C, *et al.*, 2008b).

O fato de STC1 interagir com seus parceiros predominantemente pela sua região amino-terminal (Figura 13B) possivelmente tem implicações estruturais interessantes. Em estudos prévios de SAXS (Trindade DM, *et al.*, 2009), nosso grupo havia postulado que STC1 possivelmente forma um homodímero anti-paralelo mediado pela região carboxi-terminal, deixando de forma exposta as regiões Nterminal, que dessa forma ficam

disponíveis para estabelecer interações com seus parceiros. Talvez, essa disposição estrutural seja crucial para que STC1 atue como uma SUMO E3 ligase, uma vez que permite que STC1 se ligue de um lado do dímero a SUMO1 e do outro, simultaneamente, com a proteína alvo de SUMOilação. Nos casos em que STC1 regula a SUMOilação, mas não interage com a proteína alvo, ambas extremidades do dímero podem trazer a proteína SUMO1, o que poderia explicar o aumento da SUMOilação nestes casos (Ki-1/57 e RanGAP1).

É amplamente aceito que a SUMOilação é um processo necessário para a formação dos PML-NBs. Portanto, a atividade SUMO E3 ligase de STC1 nesses corpúsculos é relevante, visto suas interações com várias proteínas importantes associados aos PML-NB que podem ser alvos de SUMOilação.

- Proteínas de retículo endoplasmático

Entre as quatro proteínas de retículo endoplasmáticos (RE) identificadas interagindo com STC1, duas estão relacionados com resposta a proteínas desenoveladas (UPR – *Unfolded Protein Response*) tal qual ocorre com o parálogo STC2 (Sharma NK, *et al.*, 2008). A primeira é o transdutor de UPR, **ERN1** e a segunda é TMEM132a, que também foi renomeada para *HSPA5-binding protein (HSPA5BP)* por sua alta homologia ao seu ortólogo em ratos (Oh-Hashi K, *et al.*, 2003). A UPR é ativada por uma variedade de eventos que perturbam o enovelamento de proteínas no lúmen do RE, evitando acúmulo de proteínas desenoveladas no lúmen desta organela. Entre estes eventos estão as alterações do cálcio intralumenal e da glicosilação, privação de nutrientes, a infecção de patógenos, expressão de proteínas com dobramento defeituosas e alterações no estado *redox* (Malhotra JD, *et al.*, 2007). A UPR em mamíferos mostrou ser ativada por três proteínas sinalizadoras interconectadas: o fator ativador de transcrição 6 (ATF6), IRE1 (também conhecida como **ERN1**), e a quinase PERK (*PRK Endoplasmatic Reticulum Kinase*). Cada uma dessas proteínas estão localizadas na membrana do RE, ligadas a proteínas reguladas por glicose de 78kDa (Grp78, também conhecidos como BIP ou **HSPA5**), uma chaperona solúvel RE-residente que após condições de estresse no RE, é liberada do trio de transdutores da UPR (Gass JN, *et al.*, 2008).

O mais interessante é que o outro membro da outra família de proteínas STC, STC2, tem demonstrado ser induzido por agentes de estresse oxidativo no RE, e seu *knockdown* mostrou elevar a morte celular em células N2A, tratadas com taspigardina.

Tapsigargina é um inibidor de SERCA (Sarco/Endoplasmatic Reticulum Ca^{2+} ATPase) via UPR (Hackl W, *et al.*, 1996). **ERN1** tem sido estudada por participar na relação entre estresse de RE e angiogênese na placenta durante a gravidez em mamíferos (Iwawaki T, *et al.*, 2009). A localização nuclear de stanniocalcina-1 durante a gravidez e lactação, juntamente com o seu papel na angiogênese foi relatada anteriormente, enfatizando as conexões funcionais entre STC1 e **ERN1** (Hasilo CP, *et al.*, 2005).

As outras duas proteínas de RE recuperadas após o *screening* utilizando STC1 como isca, são a proteína do retículo sarcoplasmático juncional-1 (JSRP1) e a proteína FLJ20254 (recentemente nomeada TMEM214), de função desconhecida. JSRP1 desempenha um papel modulador no *turnover* de cálcio no músculo, como mostrado por sua interação com ambos os sensores de voltagem de receptores di-hidropiridínicos (DHPR) dentro do lúmen do retículo sarcoplasmático, onde se liga a calciosequestrina que por sua vez está ligada a receptores da família Rianodina (canais de cálcio de liberação do retículo - Gouadon E, *et al.*, 2006; Rios W, 2006). A STC de peixes ósseos tem sido bem caracterizada por desempenhar funções na homeostase do cálcio e fosfato (Olsen SH, *et al.*, 1996; Wagner GF, *et al.*, 1997; Madsen KL, *et al.*, 1998). Evidências crescentes têm mostrado que a STC1 humana também pode ter um papel de estresse relacionado à sobrecarga de cálcio (Sheikh-Hamad D, *et al.*, 2000; Sheikh-Hamad D, *et al.*, 2003; Koizumi K, *et al.*, 2007). Portanto, é uma possibilidade plausível que STC1 pode interagir e participar de vias que JSRP1 participe.

- Proteínas mitocondriais

Stanniocalcina-1 foi previamente encontrada dentro da matriz mitocondrial, exercendo um efeito estimulatório de forma dose-dependente na oxidação por NADH (McCudden CR, *et al.*, 2002). Este efeito mostrou ser atenuado após ocupação do cassete de ligação a ATP de STC1 por nucleotídeos purínicos, tais como ATP e GTP (Ellard JP, *et al.*, 2007). O efeito de STC1 sobre a cadeia de transporte de elétrons pode ser mediada através de sua ligação com sua proteína MTND1 (Tabela 4), possivelmente aumentando a sua atividade. De fato, receptores de alta afinidade para STC1 já foram observados na membrana interna de mitocôndrias (McCudden CR, *et al.*, 2002).

- Proteínas citoplasmáticas

O parceiro de interação MAPK14 (*Mitogen-Activated Protein Kinase 14*) é uma quinase chave que passa a ser ativa sob estresse ambiental e por citocinas pró-inflamatórias, fosforilando diversos fatores de transcrição e várias quinases *downstream*. Outras proteínas quinases ativadas por mitógenos são as ERKs 1 e 2 (*Extracellular signal Regulated Kinase*) que são parte de uma cascata clássica de quinases de mitógenos, regulando a proliferação, diferenciação e progressão do ciclo celular (Roux PP, *et al.*, 2004). Existe um trabalho que propõe que a expressão de STC1 induzida por VEGF-A seja mediada primeiramente por vias envolvendo PKC, ERK e sinalização de cálcio. (Holmes DI, *et al.*, 2008). Uma vez que MAPK14 interage com STC1 nós especulamos que STC1 pode agir de forma modulatória, inibindo essa via de sinalização regulada por estresse de MAPK14, ao se ligar a ela.

- Proteínas secretadas e de células vermelhas do sangue.

A segunda proteína mais vezes identificada no sistema de duplo híbrido de STC1 foi HBA1/2, que codifica para as duas cadeias beta da proteína hemoglobina. A dificuldade de se identificar a proteína STC1 no soro, foi discutida no trabalho de James e colaboradores (2005), que demonstraram a ligação de STC1 em células vermelhas do sangue. Isto sugere que a inabilidade de detecção no soro seja devido ao seqüestro pelas células vermelhas do sangue, que pode ocorrer devido a um provável mecanismo de *delivery*, estocagem ou remoção de STC1 da circulação sanguínea, e HBA1/2 poderia servir justamente como o sítio de ligação para STC1. Muito recentemente, foi publicado um artigo que sugere a ligação de STC1 a grupos heme e hema através da cisteína 114, coordenado por íons Fe^{2+} (Westberg JA, *et al.*, 2011), o que corrobora nossos dados.

Relaciona-se também, a proteína ALAS2 (*5-Aminolevulinate synthase 2*), que também foi identificada com parceiro de interação de STC1 em nosso *screening*. Esta proteína é uma das duas isozimas que cataliza o primeiro passo da via de biosíntese de heme e no caso de ALAS2, que é expressa exclusivamente em células eritróides, é responsável pela síntese de heme especificamente direcionada para hemoglobina (Abu-Farha M, *et al.*, 2005). Interessantemente, a transcrição de ALAS2 é induzida por hipóxia de forma dependente de HIF-1, visando elevar os níveis de heme (Hofer T, *et al.*, 2003).

- Proteínas de membrana

A Aminopeptidase N (ANPEP, CD13) é uma proteína de ampla especificidade que possui implicações na digestão final de peptídeos gerados a partir da hidrólise de proteínas por proteases gástricas e pancreáticas. Serve como um receptor do conavírus humano e de infecções por citomegalovírus, assim como para peptídeos de tumores (mais especificamente para peptídeos NGR – *Nerve Growth Factors*). Adicionalmente, ANPEP parece ser um importante regulador da morfogênese endotelial, durante a angiogênese. (Pasqualini R, *et al.*, 2000; Bragwat SV, *et al.*, 2001).

CMTM3 (*Chemokine-like MARVEL Transmembrane containing Motif 3*) pertence a uma nova família de proteínas que atuam em importantes processos no sistema imune e tem participação na tumorigênese. Identificada por nós como parceiro de interação de STC1, CMTM3 é altamente expresso em testículos, leucócitos e placenta. (Zhong J, *et al.*, 2006; Wang Y, *et al.*, 2008).

FNDC4 (*fibronectin domain containin protein 4*) é uma proteína que é fortemente expressa em cérebro e fígado e contém domínios fibronectina tipo III (FN3) e Arg-Gly-Asp (RGD). É uma proteína de membrana que sugere-se que sirva como molécula de adesão celular ou como receptor de um ligante ainda não identificado (Teufel A, *et al.*, 2002).

Levando em consideração que até hoje nenhum receptor de membrana foi bioquimicamente caracterizado e identificado para STC1 na superfície celular, estas proteínas são candidatos interessantes que poderiam ser testados, porém há de se considerar que o ensaio de duplo-híbrido em leveduras, identifica presas intracelulares e a interação de STC1 com a região extracelular destas proteínas, ainda precisa ser testada, apesar da interação com a porção intracelular ter sido aqui identificada.

3.2.2 – Isolamento e identificação do receptor de Stanniocalcina-1 humana

De acordo com o que foi apresentado na seção introdutória (item 1.5), diversas são as evidências da existência de receptores de alta afinidade para proteína Stanniocalcina-1. Entretanto, nenhum trabalho até hoje identificou bioquimicamente qual é a molécula responsável por interagir com STC1 na superfície da célula, e a ausência desta informação, dificulta avanços significativos nos estudos sobre as diversas implicações e vias de atuação propostas para STC1.

Foi com o propósito de solucionar este entrave, que nosso grupo estabeleceu uma nova colaboração científica com o grupo do Dr. Hinrich P Hansen, da Universidade Clínica de Colônia (Alemanha). O Dr. Hansen lidera um grupo de pesquisa que estuda diversos receptores de membrana e possui grande experiência com biologia molecular de proteínas de superfície. Foi durante um estágio de doutorado-sanduiche com 3 meses de duração em seu laboratório, que realizamos experimentos visando o isolamento do receptor de STC1.

O passo inicial foi identificar uma boa linhagem celular que apresente marcação na superfície celular para STC1, pra que esta linhagem seja usada como alvo para o isolamento do receptor. Foram testadas algumas linhagens celulares disponíveis em cultura no laboratório: K562 (linhagem celular de leucemia mielóide aguda humana), L540 (linhagem celular derivada de linfoma de Hodgkin humano) e Karpas (linhagem celular de células B de linfoma não-Hodgkin humano). Estas células foram cultivadas e incubadas com a proteína STC1-HT produzida em baculovírus. Como controle, utilizamos células que foram incubadas apenas com o veículo (PBS). Após alguns passos de lavagem, as células foram marcadas com anticorpo anti-His (ou com o isotipo da cadeia de IgG como controle). Após a incubação com o anticorpo secundário conjugado com PE (*Phicoeritrin*) a aquisição da intensidade de fluorescência foi analisada por citometria de fluxo, através de um aparelho de FACS (*Fluorescence-activated cell sorting*). Os dados são apresentados na tabela 5.

Tabela 5. Escolha da linhagem celular que apresenta melhor ligação de STC1 à superfície da célula. Os números são expressos em % de células positivas para PE (PE+) ou negativas (PE -). Como pode ser observado em vermelho, a linhagem K562 foi a que melhor respondeu a incubação com STC1-HT.

	Vehicle only		IgG Isotype mouse + goat @mouse-PE		mouse Anti-HIS + goat @mouse-PE	
	PE + (%)	PE - (%)	PE + (%)	PE - (%)	PE + (%)	PE - (%)
L540	0,88	99,12	3,25	96,75	12,86	87,14
Karpas	0,89	99,11	0,40	99,60	1,27	98,73
K562	0,78	99,22	43,48	56,52	75,98	24,02

Como pode ser observado na tabela 5, a linhagem celular leucêmica K562 foi a que apresentou melhor sinal de células positivas, onde cerca de 76% das células apresentaram marcação, indicando a presença de STC1 ligada a membrana plasmática. Apesar do controle utilizando o isotipo IgG do anticorpo ter apresentado também uma elevada marcação positiva consideramos que existe uma diferença significativa (de 43% para 76%) e decidimos utilizar a linhagem K562, como alvo para o isolamento do receptor de STC1.

A estratégia de isolamento e identificação do receptor de STC1 foi desenhada da seguinte forma: As células K562 são incubadas com a proteína recombinante STC1-HT produzida em células de inseto para permitir a ligação de STC1 ao receptor. Após o período de incubação, vários passos de lavagem são feitos visando eliminar interações inespecíficas. Para garantir e fixar a interação de STC1 ao seu receptor utiliza-se um *crosslinker* bivalente, que torna a interação STC1-receptor fixa, através de ligação covalente. Este complexo então é precipitado e identificado por espectrometria de massas.

Após termos estudado e testados diferentes *crosslinkers* para fixar a interação, nós optamos por utilizar o *crosslinker* chamado Sulfo-SBED trifuncional (figura 19). O modo de ação deste *crosslinker* é bem elegante, uma vez que ele permite que a proteína isca (no caso STC1-HT) “transfira” uma molécula de biotina para a proteína presa desconhecida (receptor), possibilitando o isolamento da proteína presa através da interação de altíssima afinidade e especificidade entre a biotina e a estreptavidina, conjugada em *beads* magnéticas (figura 20).

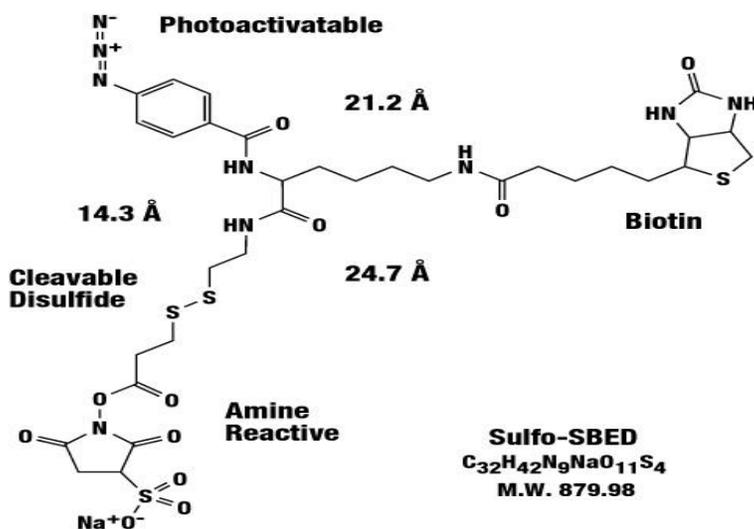


Figura 19. Estrutura do *crosslinker* Sulfo-SBED trifuncional. O grupo “amine reactive” reage com a proteína isca (STC1) que então é incubada com as células. O radical “photoactivatable” reage com a proteína presa (receptor) após exposição à luz UV. Entre ambos, existe uma ponte dissulfeto clivável e uma molécula de biotina. O *spacer arm* do *crosslinker* é de 24,7 angstroms. Adaptado de www.pierce.com

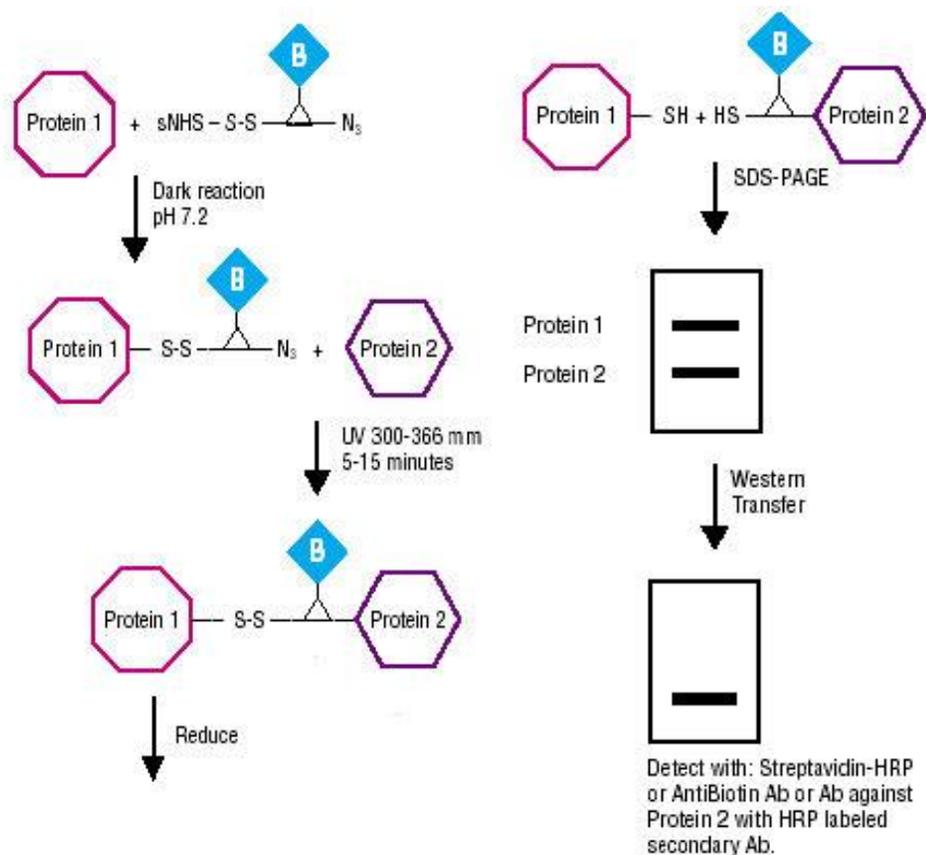


Figura 20. Modo de ação do crosslinker Sulfo-SBED trifuncional. O primeiro passo é conjugar a proteína isca (No caso representada por *Protein 1*) ao *crosslinker*. Essa conjugação ocorre entre o radical sNHS do *crosslinker* e radicais amina NH_3 da proteína isca, em uma reação no escuro em pH 7.2. Em seguida a proteína isca (*protein 1*) é incubada com as células, permitindo que STC1 interaja com o receptor desconhecido (*protein 2*). Essa interação passa a ser fixa e covalente, quando exposta a luz UV, pois faz com que o radical N_3 foto-ativável do *crosslinker* fique ativo e reaja com a proteína 2, principalmente em resíduos de lisina. Observe que na região central do *crosslinker* existe uma molécula de biotina (B), e que entre essa molécula de biotina e a proteína isca, existe uma ponte dissulfeto (S-S). Após as células terem sido solubilizadas, o lisado total é então incubado com *beads* contendo estreptavidina, que irá se ligar ao complexo formado por Proteína 1- S-S – biotina-Proteína 2 (STC1-S-S-biotina-Receptor) através da molécula de biotina. Este complexo então é tratado com agentes redutores, que desfazem a ponte dissulfeto (S-S), permitindo que a proteína 1 (STC1-HT) e a proteína 2 (receptor) migrem separadamente em um gel SDS-PAGE, mas somente a proteína 2, que permanece ligada a molécula de biotina, pode ser identificada em um *western blot* utilizando estreptavidina conjugada com HRP. Dessa forma ouve uma “transferência” da molécula de biotina de STC1, para o receptor desconhecido. Adaptado de www.pierce.com

Esta estratégia possibilitou a identificação de uma banda diferencial, presente apenas quando as células foram incubadas com STC1-SBED (STC1-HT conjugada com o *crosslinker* Sulfo-SBED) e não quando foram incubadas apenas com PBS, com STC1-HT não conjugada ou com a proteína V2-GST-SBED (uma proteína não relacionada, também conjugada com o *crosslinker* Sulfo-SBED), usados como controles negativos (Figura 21).

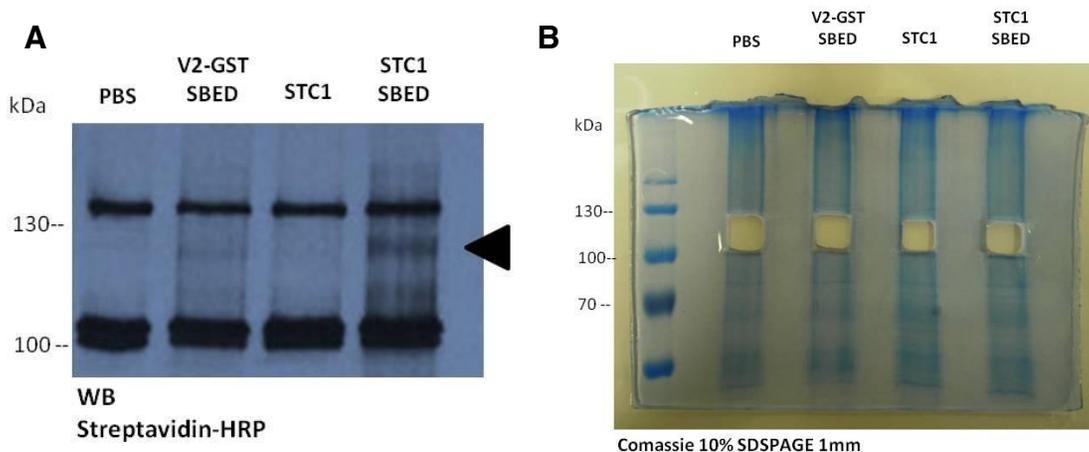


Figura 21. Isolamento do receptor de STC1 humana. (A) *Western blot* utilizando estreptavidina conjugada a HRP, para identificar proteínas ligadas a moléculas de biotina. A cabeça de seta mostra uma banda diferencial que é observada apenas na canaleta que corresponde à proteínas isoladas após a incubação das células com STC1-HT conjugada com o *crosslinker* (STC1-SBED). (B) Gel SDS-PAGE 10% corado com *Comassie blue*, mostrando que as regiões correspondentes as que contêm a banda diferencial no *western blot*, foram recortadas para ser feita a identificação por espectrometria de massas.

As regiões correspondentes a banda diferencial identificada, foram recortadas de gel SDS-PAGE corado com *comassie blue*, armazenadas em tubos secos a -20°C , e trazidas de volta para o Brasil, para que o seu conteúdo pudesse ser digerido e os peptídeos identificados através de espectrometria de massa, no LNBio.

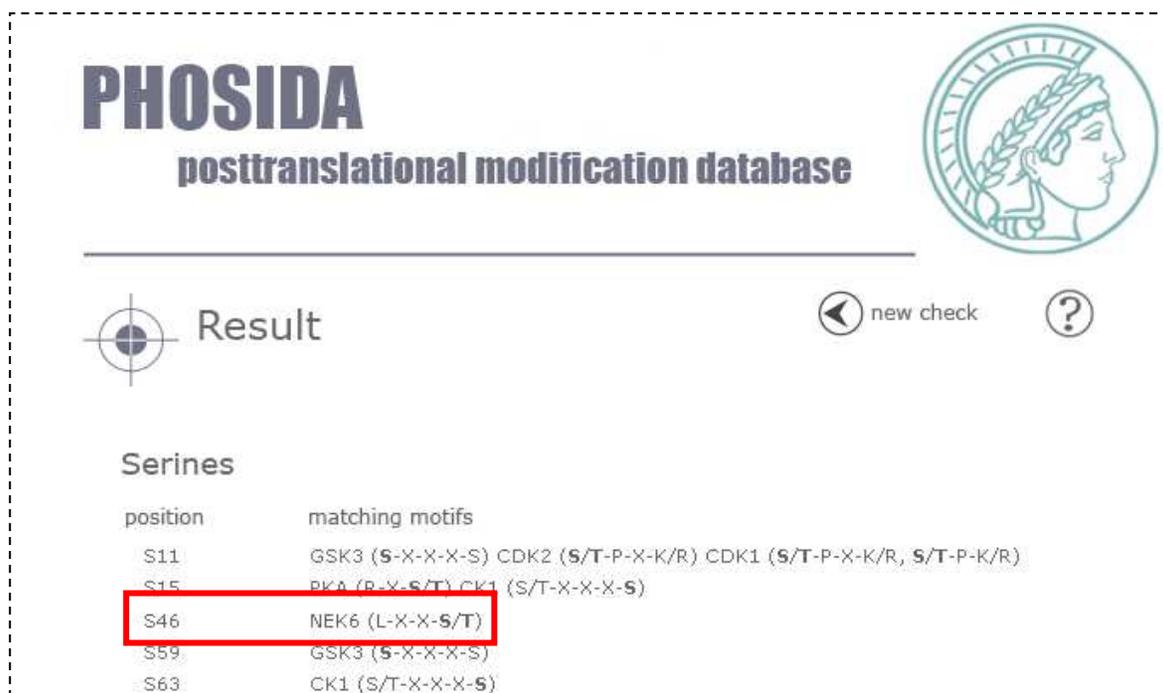
Através da espectrometria de massas, foi possível identificar peptídeos que correspondem a duas diferentes proteínas de membrana, candidatas a receptores de STC1. Estes peptídeos foram encontrados apenas na canaleta correspondente a STC1 SBED e não nos demais controles negativos. Os dados são bastante promissores e animadores mas, apesar de estarem dentro dos parâmetros de confiabilidade desta técnica de proteômica, são preliminares e precisam ser confirmados.

A confirmação da identificação do receptor de STC1 fornecerá dados chave para melhor compreensão da sinalização e vias de atuação desta importante proteína.

3.2.3 – A interação entre Stanniocalcina-1 e NEK6

De acordo com o trabalho publicado pelo nosso grupo (Trindade DM, *et al.*, 2009), existem diversos resíduos de serina e treonina preditos (pelo programa NetPhosK) como prováveis sítio de fosforilação na sequência de STC1. Como introduzido no final do item 1.4 desta tese, sabe-se que STC1 é uma proteína fosforilada e propõe-se que uma das quinases responsáveis pela fosforilação seja PKC (Jellinek DA, *et al.*, 2000).

Nós re-analisamos a sequência primária da proteína Stanniocalcina-1 humana através do programa PHOSIDA (Gnad F, *et al.*, 2007), como ilustrado na figura 22. Este programa, diferente dos demais, não é um preditor de resíduos passíveis de serem fosforilados, é na verdade um enorme banco de dados que contém peptídeos identificados experimentalmente como sendo fosforilados, através de um estudo em larga escala que analisou 8283 proteínas humanas. Portanto, ao realizar uma busca, a plataforma procura por peptídeos dentro da sequência proteica submetida, que sejam idênticos aos peptídeos fosforilados no banco de dados. O *output* retorna a informação que, dentro da sequência submetida, existem (ou não) peptídeos que já foram experimentalmente identificados como alvos de fosforilação. Baseado no sítio/motivo ao redor do resíduo alvo de fosforilação, o programa prediz qual quinase pode ter sido responsável por fosforilar este aminoácido.



PHOSIDA
posttranslational modification database

Result

new check

?

Serines

position	matching motifs
S11	GSK3 (S-X-X-X-S) CDK2 (S/T-P-X-K/R) CDK1 (S/T-P-X-K/R, S/T-P-K/R)
S15	PKA (R-X-S/T) CK1 (S/T-X-X-X-S)
S46	NEK6 (L-X-X-S/T)
S59	GSK3 (S-X-X-X-S)
S63	CK1 (S/T-X-X-X-S)

Figura 22. Identificação de peptídeos fosforilados em resíduos de serinas na sequência de STC1 humana. Como mostrado no *box* vermelho, o PHOSIDA sugere que a fosforilação do resíduo de serina 46, seja feito pela quinase NEK6, baseado no motivo LXXS/T. Adaptado de www.phosida.de

Nós observamos a presença de vários peptídeos fosforilados em resíduos de serina na sequência de Stanniocalcina-1, dentre eles, o que mais nos chamou atenção foi a predição de que a serina 46 pode ser fosforilada pela proteína NEK6.

A proteína NEK6, uma serina/treonina quinase, tem sido descrita como importante reguladora da mitose. Integrante da família proteica *NIMA-related kinases*, que possui 11 NEKs, NEK6, assim como NEK2, NEK7 e NEK9, está intimamente ligada a progressão do processo mitótico, quando ela é ativada e o nível proteico de NEK6 eleva-se consideravelmente. Participa da organização dos microtúbulos, e tem sido relacionada ao processo carcinogênico e provável alvo quimioterápico (O'regan L, *et al.*, 2007). A família das proteínas NEK é amplamente estudada por diversos alunos do grupo do Dr. Jörg Kobarg e NEK6 foi alvo do trabalho de doutorado da Dra. Gabriela Vaz Meirelles, com quem estabelecemos colaboração para investigar a relação de STC1 com NEK6.

O primeiro passo foi analisar se a quinase recombinante NEK6-HT (fusionada a calda de 6 histidinas) é capaz de fosforilar STC1-HT. Nosso ensaio de fosforilação, *in vitro*, utilizando ^{32}P , avaliou não só a capacidade de fosforilação de NEK6wt (*wild type*), mas também testamos a atividade da NEK6 mutante (S206A), cuja serina do *loop* de ativação foi mutada, impedindo assim a ativação completa de NEK6, diminuindo sua atividade. Como STC1 tem em sua seqüência, um domínio de ligação a nucleotídeos (principalmente a ATP - Ellard JP, *et al.*, 2007), a proteína STC1-HT sozinha (sem NEK6) foi usada como controle, para descartarmos a possibilidade de que o sinal observado fosse inespecífico, devido à ligação de ATP diretamente a proteína STC1-HT

A quinase NEK6wt foi capaz de fosforilar STC1-HT *in vitro*, assim como a NEK6 mutante, porém o sinal produzido pela proteína mutada foi significativamente menor do que o sinal observado pela quinase selvagem, o que já era esperado. A proteína STC1-HT sozinha, não produziu sinal (observa-se apenas um *background* comum neste tipo de experimento), mostrando a especificidade do ensaio (Figura 23).

Ao confirmarmos a fosforilação de STC1 por NEK6, buscamos visualizar *in vivo* se a interação entre ambas as proteínas pode ser identificada. Foi possível observar uma co-localização de STC1 e NEK6 endógenas, em células THP-1 (linhagem celular de leucemia monocítica aguda humana), mas interessante, a co-localização de STC1 com NEK6 foi detectada apenas em células que estão em processo de divisão e/ou com núcleo condensado já que não fomos capazes de observar essa co-localização entre as proteínas em células interfásicas (Figura 24).

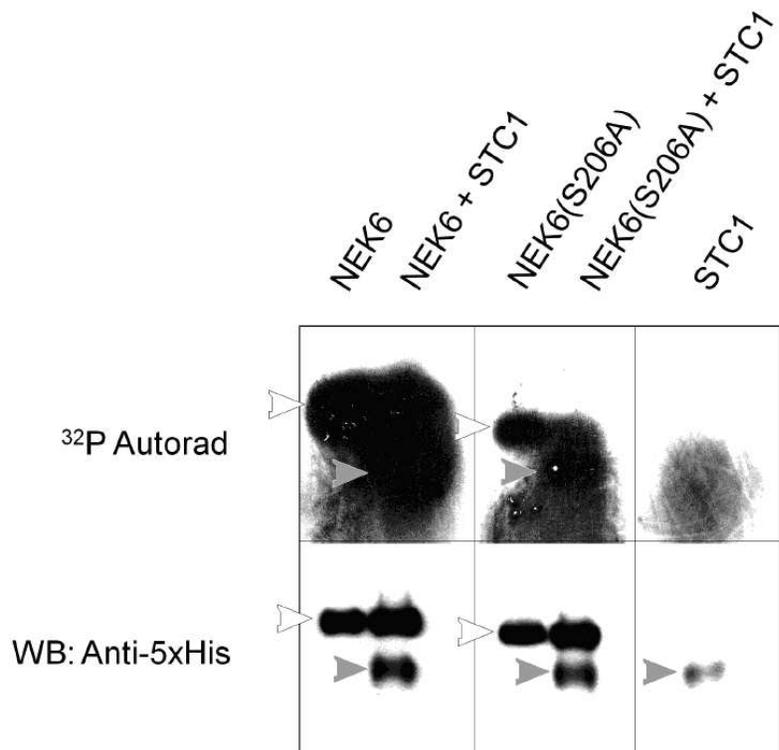


Figura 23 – Fosforilação *in vitro* de STC1 por NEK6. As pontas de seta vazias referem-se à marcação de NEK6, que se auto-fosforila. As pontas de seta cinza, são referentes à marcação de STC1. Apesar de STC1 possuir um sítio de ligação a ATP, este não afeta o resultado do experimento.

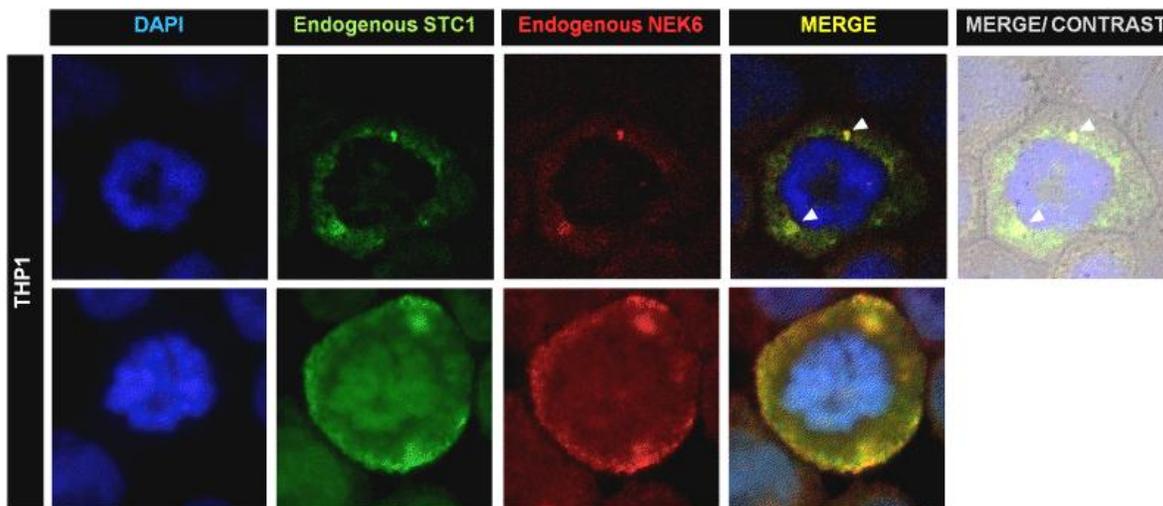


Figura 24 – Co-localização entre STC1 e NEK6 em células THP-1. As imagens a acima, são de microscopia confocal e as abaixo em microscopia de fluorescência comum. A marcação para ambas as proteínas foi observada apenas em células em processo de divisão e/ou com núcleo condensado. As pontas de seta branca destacam pontos de maior acumulo de co-localização entre as proteínas.

Nenhum trabalho até hoje relata o envolvimento de STC1 na regulação ou participação na mitose ou no ciclo celular, porém a co-localização com NEK6, uma proteína que regula o ciclo celular, aponta que STC1 também possa ter implicações funcionais nestes processos. NEK6 mostrou ser uma proteína SUMOilada e tal modificação é requerida para que ocorra sua ativação (Lee EJ, *et al.*, 2007). A ausência desta modificação pós-traducional em mutantes de NEK6, mostrou que existe uma diminuição da atividade quinase e também da sua estabilidade protéica. Além disso, não é possível observar a localização desta proteína mutante em *speckles* nucleares, ao contrário do observado na proteína selvagem em células COS-1.

Talvez a SUMOilação de NEK6 seja requisito necessário para esta atuar na regulação do ciclo celular e, como STC1 possui atividade SUMO E3 ligase, pode estar envolvida na regulação do ciclo de SUMOilação de NEK6. Por outro lado a regulação da SUMOilação de NEK6, por STC1, pode ser dependente da fosforilação de NEK6 em STC1, através de um sistema de *feedback* auto-regulatório.

Apesar de ser apenas uma hipótese, este tipo de relação auto-regulatória entre SUMO E3 ligase e proteína quinase, já é descrito na literatura. Roscic A, e colaboradores (2006), descrevem que Pc2 se liga e co-localiza-se com HIPK2, uma quinase. Pc2 tem atividade SUMO E3 ligase no ciclo de SUMOilação de HIPK2, porém a regulação deste ciclo por parte de Pc2 é dependente da fosforilação que HIPK2 promove sobre a própria Pc2, para que haja uma resposta celular a danos ao DNA.

Os dados que correlacionam STC1 e NEK6 ainda são preliminares, porém promissores. Experimentos serão feitos na direção de elucidar a importância desta interação e sua possível implicação na mitose celular e regulação de STC1 fosforilada por NEK6.

3.2.4 – Outras abordagens na busca de parceiros de interação para STC1

Além das técnicas utilizadas para identificar e caracterizar parceiros de interação para Stanniocalcina-1 humana, foi iniciado o estudo de interações através de outras técnicas, visando não só identificar mais parceiros mas também tentar encontrar interações que sejam sinônimas entre técnicas de *screening* independentes.

A primeira abordagem de *screening*, foi a técnica de *Pull Down* semi *in vivo*. Nesta técnica a proteína recombinante produzida em baculovírus STC1-HT, foi incubada com *beads* carregadas com NiSO₄, de forma a saturar a resina. Em seguida essa resina contendo STC1-HT foi incubada com extrato total protéico proveniente de um baço murino. Como controle, a resina carregada com Ni²⁺, que não continha STC1-HT ligada, também foi incubada com a outra metade deste extrato protéico.

Após o período de incubação e lavagens, o conteúdo das resinas foi eluído e submetido à eletroforese em gel SDS-PAGE, para identificação de bandas/faixas diferenciais, visando identificar proteína que interagiram apenas com STC1-HT e não com a resina (Figura 25).

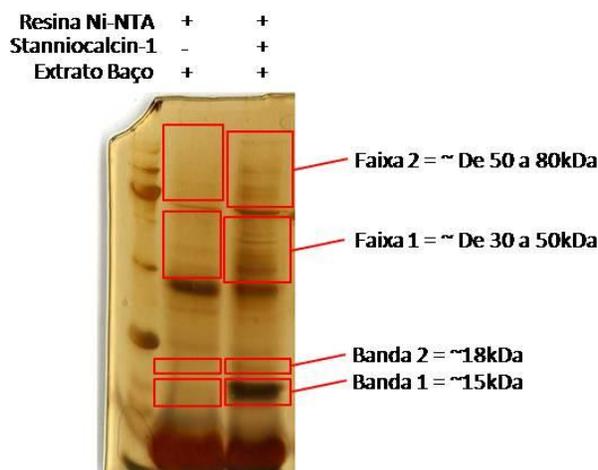


Figura 25 – Pull down semi *in vitro* de baço murino. 50 μ L de resina Ni-NTA, com ou sem 500 μ g de STC1-HT, foram incubadas com extrato protéico solúvel de baço murino. As bandas e faixas das regiões delimitadas pelos boxes vermelhos, foram submetidas à identificação por espectrometria de massas

As bandas e faixas mostradas na figura 25 foram recortadas e processadas para a identificação de seu conteúdo através de espectrometria de massas. A tabela 6 contém os dados finais deste experimento. Para chegarmos às proteínas identificadas na tabela 6, inicialmente subtraíram-se todas as proteínas encontradas no controle negativo (*pull down* só com a resina) das proteínas do experimento com STC1-HT. Além disso, proteínas que compartilhavam domínios conservados entre o controle e o experimento, foram excluídas também. Em seguida, para as proteínas identificadas como sendo de outro organismo,

que não de *Rattus norvegicus* (organismo doador do baço), uma vez que a busca foi realizada contra todo o banco do NCBI, foi realizado um BLASTp, contra o banco de *R. norvegicus*, para excluirmos as proteínas que não compartilhavam homólogos conservados e de alto *e-value*. Finalmente, as proteínas selecionadas que possuíam homólogos em murino, foram submetidas novamente ao BLASTp, contra o banco de *Homo sapiens*, para nos restar apenas proteínas de relevância e alta homologia em humanos. Os peptídeos gerados pela digestão da banda 1, não foram identificados em nenhum banco de dados.

Tabela 6. Resultado final das proteínas identificadas por espectrometria de massas provenientes do pull down semi in vitro. Foram excluídas as proteínas que eram comuns ao controle (*pull down* somente com a resina, sem STC1 ligada), que possuíam domínios conservados encontrados em qualquer proteína do controle e também aquelas que não possuíam alta homologia com *R. norvegicus* e com *H. sapiens*.

Individual ions <u>scores > 51</u> indicate identity or extensive homology (p<0.05)	<u>Banda 02</u>	Similaridade/ identidade com <i>Rattus norvegicus</i>	Similaridade/ identidade com <i>Homo sapiens</i>	Homologo em <i>Rattus norvegicus</i>	Homologo em <i>Homo sapiens</i>
Mass: 17856 Score: 661 Queries matched: 19 emPAI: 1.82	Eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF-5A) [Spodoptera exigua]	Expect = 4e-21 Identities = 45/49 (91%), Positives = 49/49 (100%), Gaps = 0/49 (0%)	Expect = 1e-57 Identities = 105/150 (70%), Positives = 127/150 (84%), Gaps = 1/150 (0%)	eukaryotic translation initiation factor 5A isoform II [Rattus norvegicus]	eukaryotic initiation factor 5A isoform I variant A [Homo sapiens]
Mass: 20053 Score: 211 Queries matched: 7 emPAI: 0.86	cellular nucleic acid binding protein clone 6 [Mus musculus]	Expect = 5e-93 Identities = 169/177 (95%), Positives = 169/177 (95%), Gaps = 7/177 (3%)	Expect = 5e-93 Identities = 169/177 (95%), Positives = 169/177 (95%), Gaps = 7/177 (3%)	similar to cellular nucleic acid binding protein 2 [Rattus norvegicus]	zinc finger protein 9 isoform 3 [Homo sapiens]
Mass: 132234 Score: 79 Queries matched: 2	putative methionine synthase [Prochlorococcus marinus str. NATL2A]	Expect = 7e-134 Identities = 376/1249 (30%), Positives = 620/1249 (49%), Gaps = 122/1249 (9%)	Expect = 3e-135 Identities = 379/1248 (30%), Positives = 617/1248 (49%), Gaps = 121/1248 (9%)	methionine synthase [Rattus norvegicus]	methionine synthase [Homo sapiens]
Individual ions <u>scores > 69</u> indicate identity or extensive homology (p<0.0009).	<u>Faixa 01</u>	Similaridade /identidade com <i>Rattus norvegicus</i>	Similaridade /identidade com <i>Homo sapiens</i>	Homologo em <i>Rattus norvegicus</i>	Homologo em <i>Homo sapiens</i>
Mass: 27842 Score: 222 Queries matched: 9	splicing factor, arginine/serine -rich 1 isoform 1 [Homo sapiens]	Expect = 7e-80 Identities = 195/195 (100%), Positives = 195/195 (100%), Gaps = 0/195 (0%)	100%	splicing factor, arginine/serine -rich 1 [Rattus norvegicus]	splicing factor, arginine/serine -rich 1 isoform 1 [Homo sapiens]
Mass: 42110 Score: 204 Queries matched: 5 emPAI: 0.08	Actina e Beta Actina [Monopterus albus]	Expect = 0.0 Identities = 371/375 (98%), Positives = 374/375 (99%), Gaps = 0/375 (0%)	Expect = 0.0 Identities = 371/375 (98%), Positives = 374/375 (99%), Gaps = 0/375 (0%)	similar to Actin, cytoplasmic 2 (Gamma-actin) [Rattus norvegicus]	actin, gamma 1 propeptide [Homo sapiens]

Mass: 28549 Score: 169 Queries matched: 5 emPAI: 0.12	Tropomiosina [Rattus norvegicus]	100%	Score = 251 bits (642), Expect = 2e-66 Identities = 243/248 (97%), Positives = 245/248 (98%), Gaps = 0/248 (0%)	tropomyosin 4 [Rattus norvegicus]	tropomyosin 4 isoform 2 [Homo sapiens]
Mass: 28231 Score: 331 Queries matched: 8 emPAI: 0.40	stanniocalcin 1 precursor [Homo sapiens]				
Individual ions <i>scores > 58</i> indicate identity or extensive homology (p<0.01).	<u>Faixa 02</u>	Similaridade/ identidade com Rattus norvegicus	Similaridade/ identidade com Homo sapiens	Homologo em Rattus norvegicus	Homologo em Homo sapiens
Mass: 69511 Score: 412 Queries matched: 13 emPAI: 0.20	coagulation factor XII [Bos taurus]	Expect = 0.0 Identities = 401/603 (66%), Positives = 456/603 (75%), Gaps = 25/603 (4%)	Expect = 0.0 Identities = 450/628 (71%), Positives = 495/628 (78%), Gaps = 29/628 (4%)	coagulation factor XII [Rattus norvegicus]	coagulation factor XII precursor [Homo sapiens]
Mass: 42110 Score: 408 Queries matched: 8 emPAI: 0.25	coagulation factor XII [Bos taurus]	Expect = 0.0 Identities = 371/375 (98%), Positives = 374/375 (99%), Gaps = 0/375 (0%)	Expect = 0.0 Identities = 371/375 (98%), Positives = 374/375 (99%), Gaps = 0/375 (0%)	actin, cytoplasmic 2 [Rattus norvegicus]	actin, gamma 1 propeptide [Homo sapiens]
Mass: 53746 Score: 103 Queries matched: 3 emPAI: 0.13	vimentin [Mus musculus]	Expect = 0.0 Identities = 425/427 (99%), Positives = 425/427 (99%), Gaps = 0/427 (0%)	Expect = 0.0 Identities = 417/427 (97%), Positives = 422/427 (98%), Gaps = 0/427 (0%)	vimentin, isoform CRA_b [Rattus norvegicus]	vimentin [Homo sapiens]
Mass: 78143 Score: 88 Queries matched: 3 emPAI: 0.04	CCP modules 3-12, with parts of CCP 2 and 13 [Bos taurus]	Expect = 0.0 Identities = 396/662 (59%), Positives = 493/662 (74%), Gaps = 5/662 (0%)	Expect = 0.0 Identities = 414/669 (61%), Positives = 502/669 (75%), Gaps = 4/669 (0%)	complement factor H [Rattus norvegicus]	complement factor H [Homo sapiens]
Mass: 60062 Score: 79 Queries matched: 2 emPAI: 0.05	catalase [Rattus norvegicus]	100%	Expect = 0.0 Identities = 469/527 (88%), Positives = 500/527 (94%), Gaps = 0/527 (0%)	catalase [Rattus norvegicus]	catalase [Homo sapiens]
Mass: 28105 Score: 134 Queries matched: 2 emPAI: 0.25	stanniocalcin precursor [Mus musculus]				

Nenhuma destas interações ainda foi confirmada por outras técnicas. Porém interações aqui sugeridas entre STC1 e elementos do sistema de contração muscular, como Actina, Miosina e Tropomiosina chamam a atenção, pois é um sistema regulado por Ca^{2+} . De fato, Koizumi K e colaboradores, em 2007, mostraram que STC1 previne o acúmulo de cálcio e a hipercontratura muscular, mostrando alguma relação de STC1 com as interações encontradas. É interessante observar que Stanniocalcina-1 foi identificada tanto na faixa 1 (30 a 50kDa), quanto na faixa 2 (50 a 80kDa), mostrando que sua dimerização não é 100% suscetível a redução química, já que o monômero possui cerca de 28kDa e o dímero cerca de 55kDa.

Porém para selecionar qual(is) proteína(s) será(ão) estudada(s) de forma mais detalhada no contexto de sua interação com STC1, nós decidimos gerar novos dados através de outra abordagem, semelhante, porém menos artificial: realizar experimentos de *pull down in vivo*. Este trabalho contou com a colaboração do aluno de iniciação científica Daniel Seij Saito.

Para tanto, a proteína STC1 foi clonada em vetor de expressão em células de mamíferos, pCDNA5/FTR/TO. Este vetor produz a proteína STC1 fusionada ao peptídeo FLAG. A região correspondente ao peptídeo sinal foi deletada, mimetizando a abordagem do sistema de duplo híbrido, e garantido a permanência intracelular da proteína.

Este vetor clonado foi utilizado no sistema Flip-In T-Rex (Invitrogen). Desta forma, inicialmente é gerada uma linhagem celular hospedeira, através da transfecção dos plasmídeo pFRT/lacZeo, que garante as células resistência a Zeocina e o plasmídeo pcDNA6/TR, que garante as células resistência a Blasticidina. Após a seleção dos clones da linhagem hospedeira, uma nova co-transfecção é feita, contendo o plasmídeo pCDNA5/FTR/TO-FLAG-STC1 e o plasmídeo pOG44, que expressa uma recombinase que vai ser responsável por integrar a construção STC1-FLAG no genoma da célula hospedeira. Após subseqüentes gerações de linhagens estáveis o sistema permite a geração de linhagens isogênicas através de seleção policlonal. O interessante deste sistema é que a expressão da proteína de interesse é induzível por tetraciclina.

Nós fomos capazes de gerar um clone na linhagem celular HEK293 que contém a construção STC1-FLAG integrada em seu genoma. Após vários testes nós observamos que ao adicionarmos 250 ng/mL de tetraciclina, é possível observar a expressão da proteína entre 12 e 24 horas após a indução. Como controle, também geramos um clone da mesma linhagem celular que possui integrado em seu genoma o peptídeo FLAG.

As células do clone estável de STC1-FLAG e de FLAG (controle) estão sendo amplificadas neste momento, para obtermos uma grande quantidade de células. Estas células serão lisadas e os extratos protéicos totais solúveis serão submetidos à imunoprecipitação (IP) com anticorpos anti-FLAG e anti-STC1, para então identificarmos através de espectrometria de massas, as proteínas que estabeleçam interação direta com STC1 ou indireta (complexos).

Tão logo tenhamos resultados do *pull down in vivo* utilizando a construção STC1-FLAG em células humanas, iremos comparar os resultados para melhor selecionarmos os alvos a serem estudados de forma mais específica e para o entendimento da relevância funcional destas interações.

3.3 – Resultados Complementares

Os resultados apresentados nesta seção não tiveram por objetivo, como nas seções anteriores, isolar e identificar parceiros de interação para STC1, mas tentar compreender melhor o comportamento de STC1 no microambiente tumoral leucêmico, através de alguns simples experimentos funcionais.

- Ensaio de marcação intracelular e de MTT

Para verificar se as células do estroma medular e também as células primárias de LLA tem expressão de STC1 a nível protéico, realizamos ensaios de imunofenotipagem intracelular seguido de leitura por citometro de fluxo. Além disso, foi averiguado se a expressão de STC1 nestas células responde ao tratamento pela própria STC1-HT. De fato, observamos que as células do estroma medular e as células leucêmicas expressam STC1, assim como diversos outros autores já observaram super-expressão de STC1 em vários outros tipos de células neoplásicas (vide introdução item 1.6). As células foram incubadas por 24 horas com 0 (veículo), 200 ou 2000 ng/mL de STC1-HT recombinante, purificado de células de inseto pelo sistema de baculovírus. A diferenciação de células LLA e estroma fez-se com anticorpo anti-CD19, expresso apenas na LLA (Tabela 7).

Tabela 7. Marcação da proteína STC1 intracelular de células primárias de leucemia B cultivadas por 24 horas na presença ou ausência de células do estroma medular, e do estroma medular sozinho. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços. As células foram marcadas com anticorpos para marcadores de superfície CD19-Cy5, e permeabilizadas para marcação com anticorpo *goat polyclonal* anti-STC1. A proteína utilizada nos tratamentos foi STC1-HT recombinante, purificada de células de insetos por baculovírus. Os números refletem a média geométrica da intensidade relativa de fluorescência, capitados em aparelho de citometria de fluxo.

Célula ng/mL STC1-HT	Leucemia B em		
	Leucemia B	co-cultivo com Estroma Medular	Estroma Medular
0	674	462	370
200	667	487	458
2000	661	467	504

Os dados captados por citometria de fluxo indicam que as células da leucemia não alteram seu perfil de síntese de STC1 perante a incubação com STC1-HT recombinante, mesmo quando co-cultivadas com células do estroma medular. Interessantemente,

células de leucemia co-cultivadas com células do estroma possuem menores quantidades de STC1-HT (mesmo assim maiores que do estroma medular). Já as células do estroma, parecem elevar a síntese de STC1 de acordo com a quantidade de STC-HT a que foram expostas. De qualquer forma, a quantidade de STC1 intracelular das células leucêmicas é de forma geral maior que a quantidade das células do estroma, mesmo sendo células bem menores e com citoplasma reduzido, o que nos dá indícios de que realmente a leucemia também deva super-expressar STC1.

Considerando uma expressão elevada de STC1 em células leucêmicas, e visto que STC1 é uma proteína secretada, podemos inferir que o aumento da expressão de STC1 nas células do estroma medular (como observado na figura 9) ocorra justamente devido a secreção de STC1 pela célula leucêmica, visto que observamos que a incubação com a proteína recombinante, causa efeito semelhante.

Isso pode ser devido ao fato de a leucemia modular as células do microambiente tumoral (estroma medular) para ganhar vantagens adaptativas e proliferativas. A leucemia estaria modulando o estroma a produzir e secretar mais STC1 para seu benefício, visto que STC1 é um fator angiogênico, envolvido em vias de VEGF e protetor de efeitos de hipóxia. A elevada expressão de STC1 em células estromais multipotentes também foi descrito por exercer efeitos anti-apoptóticos em células cancerígenas do epitélio pulmonar submetidas a hipóxia (Block, GJ, *et al.*, 2008).

Nossos dados mostram também que o contato de linhagens de leucemia B incubadas com doses crescentes de STC1-HT recombinante, promovem a proliferação celular das linhagens, após 24 horas de incubação, em até 16%, utilizando ensaio de redução de MTT (figura 26). Isso confirma que a presença de STC1 promove efeitos proliferativos as células de leucemia. Entretanto, de forma não compreendida, a incubação de STC1 com linhagens de leucemia B co-cultivadas com estroma medular, não promoveu alterações significativas na proliferação celular. Talvez a quantidade de STC1 produzida pelo estroma somada às quantidades da proteína recombinante usadas na incubação ultrapasse os níveis ideais de sinalização necessários.

Em 2001, Schneider P, *et al.*, relata que interação entre células do estroma medular e leucemia, ajudam na sobrevivência da leucemia pela manutenção da expressão de genes anti-apoptóticos, mas descreve também que a proliferação de células da ALL pode ocorrer de forma independente do seu contato com estroma.

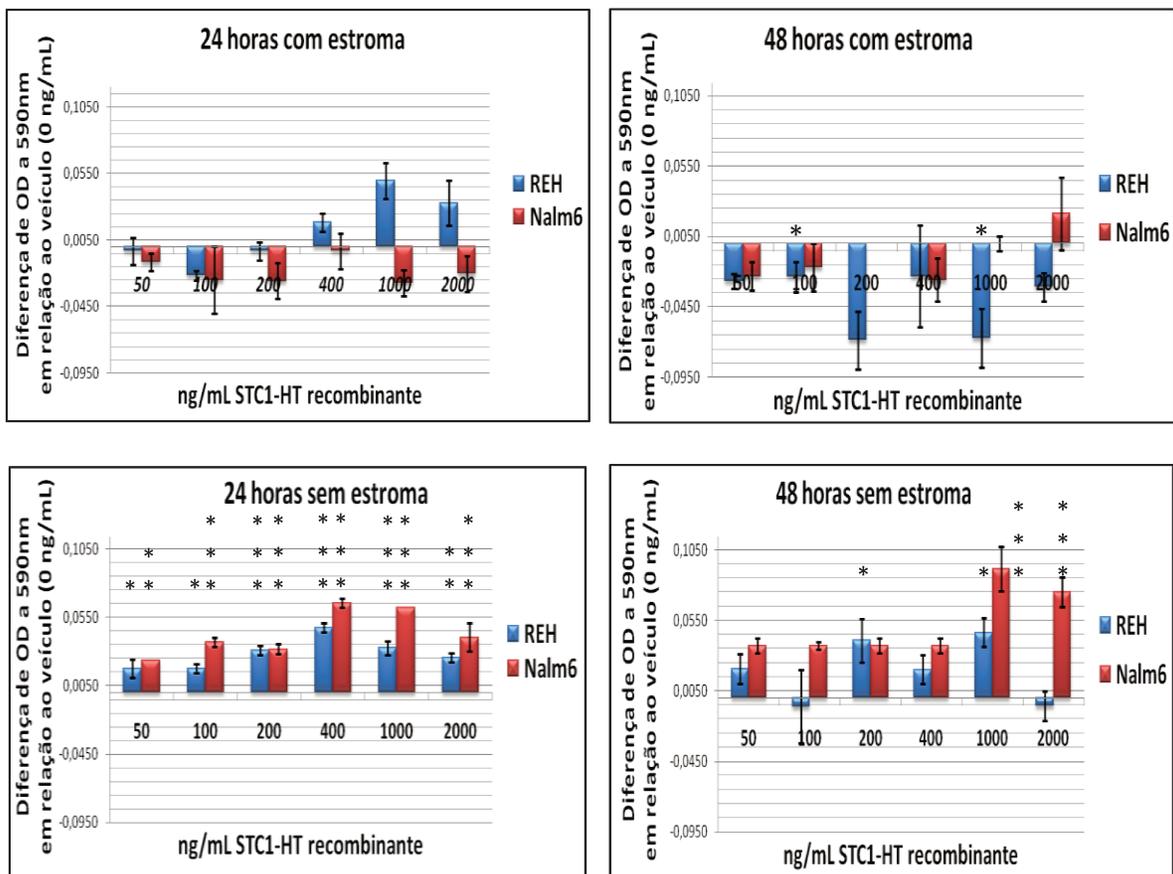


Figura 26. Incubação de diferentes concentrações da proteína recombinantes STC1-HT para análise de proliferação celular pela técnica de MTT. Células das linhagens de leucemia B Nalm6 e REH foram incubadas em placas de 96 wells em poços com ou sem células do estroma medular. Foram tratadas com diferentes concentrações de STC1-HT: 0 (veículo – MES 60mM, NaCl 600mM pH 6,5), 50, 100, 200, 400, 1000 e 2000ng/mL durante 24 e 48 horas. As barras dos gráficos mostram valores da diferença de densidade óptica medidos a 590nm descontado o valor do controle (veículo – 0 ng/mL) após o ensaio de MTT. Os asteriscos sobre as barras mostram quais condições obtiveram valores estatisticamente significativos entre o tratamento e o controle (veículo) baseado nos cálculos do método estatístico *2way ANOVA* fornecido pelo programa GraphPAD versão 5.00. (*) $P < 0,05$. (**) $P < 0,01$. (***) $P < 0,001$.

Como observado no item 3.2.3, STC1 parece ter alguma implicação no processo de divisão celular, uma vez que só interage com a proteína NEK6 (uma quinase que regula o ciclo celular e a mitose, além da formação de microtubulos e fibras do fuso), em células que estão em divisão (linhagem de leucemia). Essa relação, talvez tenha implicações funcionais no aumento da proliferação celular, aqui observado.

4.1 – Conclusões Específicas

1) Stanniocalcina-1 humana apesar de ser uma proteína secretada, interage *in vivo* com diversas proteínas intracelulares, presentes em diferentes compartimentos celulares, principalmente núcleo, mitocôndria, retículo endoplasmático e citoplasma.

2) Algumas dessas interações foram testadas e todas puderam ser reproduzidas e confirmadas em ensaios *in vitro*.

3) A interação de STC1 com seus parceiros ocorre pela região N-terminal, e isso ocorre provavelmente devido a características estruturais do seu homodímero anti-paralelo e por consequência da elevada conservação desta região entre as STCs de outros organismos.

4) STC1 possui localização intracelular ubíqua, com destaque para deposição perinuclear e nuclear puntiforme (*dot-like*).

5) A interação de STC1 com proteínas como SP100, SAP18 e SUMO1, sugere que estes pontos nucleares onde STC1 se localiza sejam corpúsculos nucleares chamados PML-*nuclear bodies*, uma vez que estas proteínas são sabidamente residentes e participam da formação destes corpúsculos.

6) A interação de STC1 e SUMO1 pôde ser observada *in vivo* (duplo híbrido em leveduras e co-imunoprecipitação em células humanas) e *in vitro*.

7) STC1 humana possui um motivo de SUMOilação de alta probabilidade na lisina 83. Este motivo de SUMOilação surge a partir dos organismos tetrápodos e não é encontrado em grupos mais basais como os peixes ósseos, e correlaciona-se com o fato de que neste grupo mais derivado (tetrápodos), STC1 tenha ampliado suas funções. Entretanto, experimentos *in vitro* e *in vivo* mostraram que STC1 não é uma proteína alvo de SUMOilação.

8) STC1 mostrou possuir atividade SUMO E3 ligase, ao regular o nível de SUMOilação de Ki-1/57, RanGAP1 e SP100.

9) Nossos dados sugerem que a atividade SUMO E3 ligase de STC1 ocorra de forma a aumentar o nível de SUMOilação da proteína alvo, quando esta não interage com STC1 e, de forma a diminuir o grau de SUMOilação da proteína alvo, quando esta é um parceiro de interação de STC1.

10) A função de SUMO E3 ligase e participação no ciclo de SUMOilação demonstrada pelo nosso grupo, é a primeira função molecular experimentalmente descrita para proteína Stanniocalcina-1 humana, até a presente data (Westberg JA, *et al.*, 2011).

11) Sendo STC1 uma SUMO E3 ligase, reforça-se ainda mais a idéia de sua presença em PML-NBs, uma vez que estes corpúsculos nucleares são *hotspots* de SUMOilação na célula.

12) STC1 possui receptores na membrana plasmática de linhagens de células leucêmicas K562, mostrando que STC1 secretada é capaz de se ligar a superfície celular.

13) STC1 é fosforilada pela quinase NEK6 *in vitro*.

14) STC1 e NEK6 co-localizam em linhagens de células leucêmicas THP1, apenas em células em processo de divisão e não em células interfásicas, sugerindo que STC1 tenha alguma implicação funcional no processo de divisão celular e mitose.

15) Células primárias de leucemia B, também produzem a proteína STC1 e em quantidade superiores ao estroma medular não co-cultivado.

16) A proteína recombinante STC1-HT parece estimular a produção da própria proteína STC1 em células estromais da medula óssea, mas não em células primárias de leucemia B, sozinhas ou em co-cultivo com o estroma medular.

17) Linhagens celulares de leucemia, tratadas com STC1-HT recombinante durante 24 horas, quando não são co-cultivadas com células de estroma medular, aumentam sua proliferação celular em até 20%.

4.2 - Conclusão Geral

Uma vez STC1 tendo sido validada como potencial marcador molecular do microambiente tumoral leucêmico, nós identificamos uma série de parceiros moleculares para esta proteína em células humanas.

Nossos experimentos identificaram um grande espectro de proteínas interactoras que enfatizam a noção de que STC1 humana é realmente uma proteína multifuncional, capaz de interagir com proteínas dos mais diversos compartimentos celulares, incluindo o núcleo. Os contextos funcionais em que STC1 aparenta estar envolvida são processos celulares essenciais para o desenvolvimento e progressão da leucemia infantil e sua interação com o microambiente tumoral.

Ao focarmos de forma específica na interação entre STC1 e SUMO1 nós fomos capazes de estabelecer a primeira função molecular descrita na literatura para STC1 humana, que mostrou ter atividade SUMO E3 ligase.

Entretanto, muitas outras interações são descritas em nossa discussão e propostas por diferentes técnicas. O maior legado desta tese de doutoramento ao conhecimento científico remete não só as conclusões definitivas obtidas nestes anos de estudo, mas também as diversas novas portas que foram abertas e que exibem implicações funcionais promissoras. Estas podem ser exploradas em estudos futuros, por nós e por toda comunidade científica visando compreender de forma ainda melhor sua atuação na célula e por consequência na leucemia, uma vez que todas as sugestões, hipóteses e resultados aqui apresentados, possuem conexões com estudos funcionais previamente publicados sobre a proteína Stanniocalcina-1 humana.

Dentre a grande quantidade de resultados aqui apresentados, algumas perguntas não puderam ainda ser respondidas. É incontável a quantidade de abordagens e experimentos que podem ser feitos para que seja dada continuidade a este trabalho. Listamos aqui as principais perspectivas a serem abordadas nos próximos passos:

- *Kit* diagnóstico para leucemia através de ELISA

Tão logo seja definitivamente assinado o contrato de transferência de tecnologia e *know-how* pra empresa RheaBiotech, daremos continuidade para finalizarmos o desenvolvimento do *kit*. Forneceremos a proteína recombinante STC1-HT e o anticorpo anti-STC1 para a finalização da padronização do *kit*. O Centrol Infantil Boldrini irá fornecer soro de camundongos com leucemia e saudáveis para realizarmos os primeiros testes, que caso sejam positivos, serão feitos com soro de pacientes, também fornecido pelo Boldrini. Será feita avaliação não somente como ferramenta de diagnóstico para leucemia, mas também para prognóstico, acompanhamento de tratamento e doença residual mínima.

- Atividade SUMO E3 Ligase

Pretendemos estudar, *in vivo*, a atividade SUMO E3 ligase de STC1. Iremos analisar a SUMOilação das proteínas Ki-1/57, RanGAP1 e SP100 nas células (HEK293) de clones estáveis que geramos, que expressam FLAG (controle negativo) e STC1-FLAG.

Uma vez detectado que o nível de SUMOilação de proteínas alvo de SUMO foi alterado devido a super-expressão de STC1, características como proliferação, ciclo celular, apoptose e co-localização sub-celular com outros parceiros, também serão avaliados nestes clones estáveis gerados.

- Novos parceiros de interação

Diversos candidatos a novos parceiros de interação foram identificados através do *pull down* semi *in vivo*. Pretendemos agora, utilizar as células de clone estável que expressam a construção STC1-FLAG para realizar ensaios de imunoprecipitação e identificar os parceiros co-imunoprecipitados, por espectrometria de massas. As proteínas identificadas que forem sinônimas as encontradas pelas outras técnicas, terão sua relevância funcional melhor caracterizadas.

- O Receptor de Stanniocalcina-1

A identificação do receptor precisa ser confirmada através de outras técnicas, como imunoprecipitação, co-localização sub-celular por imunocitoquímica, ensaios de competição, etc. Tão logo isso seja confirmado, pretendemos caracterizar se a ligação de STC1 a este receptor dispara cascatas de sinalização intracelulares *downstream*, se STC1 é de fato uma intracrine e ao interagir com receptor é internalizada para realizar suas funções ou se ambas as situações são passíveis de acontecer.

Essa caracterização do receptor irá possibilitar um melhor entendimento das vias de atuação de STC1 de praticamente todos os trabalhos disponíveis na literatura sobre esta proteína.

6.1 Desenvolvimento de um kit diagnóstico visando a identificação da proteína STC1 em soro de pacientes com leucemia

6.1.1 Co-cultivo de células de estroma de medula óssea e blastos leucêmicos, para avaliação de genes diferencialmente expressos candidatos a marcadores moleculares

6.1.2 PCR em Tempo Real quantitativo (RQ-PCR)

As metodologia utilizadas nesta tese para estas duas técnicas, estão descritas em nosso artigo (Santos MT, et al., 2011) arquivo anexo a esta tese (item 8).

6.1.3 Expressão e purificação de STC1-HT inteira no sistema baculovírus

Todo o processo de clonagem de STC1 no vetor pFastBac-Dual² (junto com GFP, que é utilizada como repórter da infecção e da expressão protéica), transformação em células de *E.coli* DH10Bac para que haja recombinação homóloga para do cDNA de STC1 e de GFP com o DNA do bacmid (Invitrogen - contém o genoma de baculovírus múltiplo nucleopolihedrovirus *Autographa californica* e o plasmídeo helper pMON7124 de 13,2Kb que codifica a transposase Tn7), transfecção de células de inseto *Sf9* com este DNA para haver amplificação viral, tempo ideal de coleta de vírus, estabelecimento de células High FiveTM para serem infectadas, quantidade de células ideal a serem infectadas, tempo de expressão protéica e protocolo de purificação de STC1 do meio de cultura (pois ela é secretada, devido a seu peptídeo sinal) foram contribuições do Dr. Daniel Maragno Trindade (Figura 27) e estão descritas em Trindade DM, *et al.*, 2009.

Células Sf9 (ATCC#: CRL-1711) foram cultivadas durante 48 horas (ou até que a eficiência de infecção fosse avaliada em torno de 70% - baseado na expressão de GFP) depois de infectadas com baculovírus contendo STC-1 e GFP recombinados, em meio TC100 contendo bicarbonato de sódio, glutamina antibiótico e triptose broth (Cultilab), suplementado com 10% de Soro fetal Bovino (SFB) em atmosfera úmida a 28°C na ausência de CO₂. As células foram então centrifugadas 5 minutos a 4000 rpm e o sobrenadante, contendo o vírus amplificado, foi guardado a 4°C.

² O plasmídeo pFastBac DUAL (Invitrogen) expressa duas proteínas recombinantes simultaneamente usando o sistema Bac-to-Bac® Baculovirus Expression. Sua expressão em eucariotos é dirigida por dois promotores: o da polihedrina e o p10. Este plasmídeo utiliza o códon de iniciação ATG do DNA clonado, eliminando a necessidade de clonagem em frame.

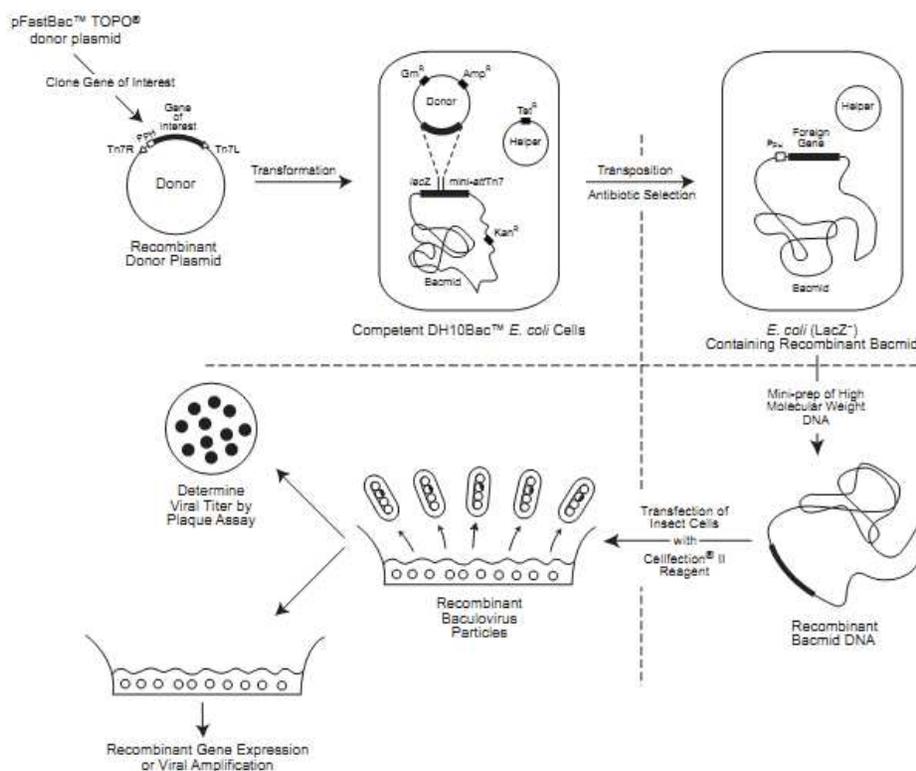


Figura 27. Sistema Baculovirus. O cDNA que codifica a proteína de interesse é subclonado no vetor pFastBac-Htb e então transformado em células de *E. coli* DH10Bac. O cDNA contido entre os dois sítios Tn7 no vetor pFastBac Htb sofre recombinação com o genoma do baculovirus sendo transferido (transposição) para esse, devido a presença de um vetor que codifica a transposase no plasmídeo helper. A partir daí é feita uma preparação plasmidial em larga escala para a posterior transfecção do DNA do vírus em células Sf9. Neste passo o vírus se replica e novas células de inseto são infectadas. Esquema adaptado do manual da Invitrogen: Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System

A linhagem de células High Five™ (BTI-TN-5B1-4) fornece um nível de 5-10 vezes maior de expressão de proteínas secretadas em relação à linhagem Sf9 (Davis TR, *et al.*, 1992). Do mesmo modo que a linhagem Sf9, essa linhagem é cultivada em atmosfera úmida a 28°C, na ausência de CO₂ em meio de cultura Express Five® (suplementado com L-glutamina e Penicilina/Streptavidina), um meio de cultura para células de inseto o qual é livre de proteínas e otimizado para suportar níveis máximos de expressão de proteína e crescimento dessa linhagem. As células foram cultivadas durante 11 dias, sendo que foram feitos 4 repiques. A quantidade ideal de células a ser infectada foi estabelecida com 10⁶ células/mL, e para infectar 1 litro, foi necessário 10⁹ células. A essas células foi adicionado 35mL de sobrenadante contendo vírus recombinantes produzidos em células Sf9 e inoculados em 1L de Express Five® suplementado (2 x 500mL em erlenmeyers de 2L) a 26°C, 140 rpm durante 24 horas.

As células (verdes quando expostas a radiação UV – indicando que houve a infecção das células High Five™ e a expressão das proteínas recombinadas) foram centrifugadas a 500xg por 5 minutos a 4°C e ao 1L de sobrenadante, contendo a proteína STC1 secretada, foi adicionado 52,6 mL de MES 1M para [final] ser de 50mM. Este sobrenadante então foi filtrado a vácuo com filtros Millipore 0,45µm (~150mL por filtro) e o filtrado, após ter seu pH acertado para 6,5, foi submetido às etapas de purificação.

6.1.3.1 Cromatografia de Troca Iônica

O primeiro passo de purificação da proteína STC1-HT, foi através da técnica de troca iônica. Essa técnica baseia-se no simples princípio de que cargas positivas ligam-se a cargas negativas e vice-versa. Tendo por base que o ponto isoelétrico (pI) de STC1-HT, isto é, o pH onde a carga final da proteína é zero, é por volta de 8,5, ao diminuir o pH do meio para 6,5, a proteína irá ser protonada, passando a ter carga total positiva (-COOH e -NH₃⁺). Desta forma, o sobrenadante pH 6,5 foi injetado em uma resina de caráter negativo (*SP Sepharose FF* 11mL – GE Healthcare) previamente equilibrada com tampão A (MES 50mM, pH 6,5), a um fluxo de 1,1mL/minuto utilizando-se uma bomba peristáltica dentro da câmara fria (4°C) por aproximadamente 15 horas. Em seguida a resina foi lavada com cerca de 50mL do tampão A e eluída com um gradiente de 0 a 100% do tampão B (MES 50mM / NaCl 1M, pH 6,5) em um aparelho ÄKTA FPLC (GE Healthcare). As amostras foram coletadas após a eluição atingir uma condutância de 28,5 mS/cm.

6.1.3.2 Cromatografia de Afinidade

A amostra eluída da troca iônica foi injetada a um fluxo de 1mL/minuto em uma coluna *HisTrap FF Crude* de 5mL (GE-Healthcare), previamente carregada com NiSO₄, limpa com Imidazol 2M, regenerada com Guanidina 6M e AcNa 0,2M, e equilibrada com tampão A (MES 50mM, NaCl 500mM, pH6,5). A resina foi lavada com 50mL do tampão A e então eluída com um gradiente de 0 a 100% de tampão B (tampão A + 1M Imidazol). As amostras coletadas foram analisadas por SDS-PAGE e aquelas de igual teor protéico foram unidas (~40mL) e concentradas, usando-se um tubo concentrador Amicon Centrifugal Device (Millipore), com poro de 3500Da, para 500µL. Todo procedimento foi realizado em um aparelho ÄKTA FPLC (GE Healthcare).

6.1.3.3 Cromatografia de Exclusão (Gel Filtração)

Os 500uL concentrados após a purificação por afinidade foram injetados em uma coluna de gel filtração *Sephadex 75 16/60* (GE Healthcare) de 120mL, a um fluxo de 0,1 mL/minuto previamente equilibrada, utilizando o tampão MES 60mM, NaCl 600mM, pH6,5, em um aparelho ÄKTA FPLC (GE Healthcare).

6.1.3.4 Método de quantificação de proteínas por BCA

Para tal quantificação foi utilizado o *BCA Protein Assay Kit* (Termo Fisher Scientific), um método robusto de quantificação proteica baseado na detecção colorimétrica de íons de cobre que são quelados às proteínas. Qualquer peptídeo contendo 3 ou mais aminoácidos podem reduzir cátions de Cu^{2+} para Cu^{1+} em meio alcalino, que resulta na formação do complexo quelado proteína-cobre que possui coloração azul. Um único íon Cu^{1+} pode formar complexos com 4 ou 6 ligações peptídicas ao seu redor. Uma elevação no número de ligações peptídicas resulta na formação de mais quelatos azuis. Portanto, a quantidade de proteína é diretamente proporcional a intensidade da cor azul observada. Adicionalmente, duas moléculas de BCA (ácido bicinônico) reagem com um único íon de Cu^{1+} formando um quelado roxo. Este complexo é solúvel em água e exibe uma forte absorvância linear com a elevação da concentração de proteína a 562nm. As medições e reações foram feitas de acordo com as instruções do fabricante.

6.1.4 Clonagens das porções STC1 C- e N-Terminal em vetores de expressão

As regiões correspondentes a amino-terminal (18-134) e porção carboxi-terminal (129-247) de STC1 (Figura 10A) foram amplificadas por PCR e clonadas no o vetor de expressão em bactéria pET28aTG³, que adiciona uma cauda de GST a proteína recombinante expressa, utilizando os primers específicos (N-terminal sense ggatccA.CCC.ATG.AGG.CGG.AGC.AG, anti-sense gaattotta.CAC.ATT.CAG.CTT.GCT.GTA.G; C-terminal sense ggatccT.ACA.GCA.AGC.TGA.ATG.TGT.G, anti-sense gaattcTTA.TGC.ACT.CTC.ATG.GGA.TG)

³ Vetor de expressão pET28a modificado em nosso laboratório pelo grupo do Prof. Dr. Nilson Zanchin, tendo sido removido o sítio de clivagem pela Trombina e substituído por um sítio de clivagem pela protease TEV em fusão com uma seqüência que codifica para a glutathione S transferase (GST), sendo identificado neste relatório como pET28aTG. Esse plasmídeo possui 5.982 pb e contém um promotor T7 induzível por IPTG e também um gene que confere resistência ao antibiótico kanamicina.

6.1.4.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os primers sintetizados pela IDT (Integrated DNA Technologies) foram diluídos com água MilliQ a estoque 100pmol e utilizados a 10pmol. O procedimento consistiu em 1µL de Taq DNA polimerase Platinum (5 U/µL), 1µL de dNTPS 10mM, 1,0µL de primer flag-Forward STC1 BamHI 10pmol, 1µL de primer flag-Reverse EcoRI STOP/A 10pmol, 1µL de MgCl₂ 50mM, 2,5µL de tampão Taq (10x) e água MilliQ para um volume final de 25µL. As reações foram incubadas por 5 minutos a 94°C e submetidas a 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 59°C, 1 minuto e 30 segundos a 72°C em termociclador PCR System 9700 (Perkin Elmer).

6.1.4.2 Digestões enzimáticas

Todas as digestões, tanto para a obtenção dos insertos desejados e dos vetores linearizados para clonagem, quanto para as análises de restrição dos sub-clones obtidos, foram realizadas seguindo-se as especificações dos fabricantes Gibco, New England ou Promega. As reações sempre foram preparadas em gelo.

6.1.4.3 Eletroforese em gel de agarose

Foram utilizados géis de agarose a 1% (peso/volume) em TAE (Tris-HCl 40mM, ácido acético 20mM, EDTA 1mM), tampão este também utilizado na corrida. Às amostras foi adicionado um sexto do volume de *loading buffer* (azul de bromofenol 25% e sacarose 40%) e para a corrida foi utilizada uma corrente com voltagem fixa entre 50 e 100 Volts, dependendo do aparato de gel utilizado. Para a foto documentação foi utilizado o sistema EDAS de fotografia e análise de imagens (Kodak).

6.1.4.4 Purificação de DNA recortado de gel de agarose

Para a purificação das bandas referentes aos vetores linearizados ou aos insertos digeridos, utilizou-se o *QIAquick Gel Extraction kit* (QIAGEN) conforme especificações do fabricante.

6.1.4.5 Ligação

Através da imagem do gel de agarose contendo os insertos e vetores devidamente digeridos e purificados, foi feita a quantificação relativa (proporção do número de moléculas vetor : inserto). A ligação foi feita em 20µL, sendo 2µL (2U) T4 DNA ligase (Fermentas), 1µL de tampão de ligação 10x (Fermentas), 1µL ATP 100mM, e os 6µL

restantes completados com água miliQ, vetor e inserto de forma que a proporção molar vetor : inserto fosse 1:4. As reações foram incubadas por 24 horas, a 4°C.

6.1.4.6 Preparo de bactérias competentes para transformação pelo choque térmico

O preparo de bactérias competentes foi feito pelo método de Cloreto de Rubídio (RuCl_2), para isso, as bactérias *E. coli* DH5 α ou BL21(DE3) foram semeadas em meio LB-ágar (Lúria-Bertani-ágar: extrato de levedura 0,5%, triptona 1%, NaCl 200mM, bacto-ágar 1,5%, pH 7,4) e incubadas a 37°C por 16 horas. Em seguida, uma das colônias isoladas foi inoculada em 5mL de meio PSI (extrato de levedura 1%, peptona 1,6%, NaCl 200mM, KH_2PO_4 3mM, Na_2HPO_4 2mM, pH 7,6) e incubada, sob agitação de 200rpm, nas mesmas condições descritas anteriormente. Subsequentemente, esta cultura foi inoculada em 200mL de meio PSI incubando-se sob as mesmas condições, até atingir absorbância de aproximadamente 0,6 à 600nm. A cultura foi então transferida para frascos de centrifuga previamente resfriados em gelo, e centrifugada a 2000xg, por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as bactérias ressuspendidas gentilmente em 25 mL do Tampão de transformação I (KOH 30mM, Ácido acético 30mM, MgCl_2 50mM, CaCl_2 10mM, RuCl_2 100mM, glicerol 15% v/v, pH 5,8) estéril e gelado. A suspensão foi incubada por 15 minutos no gelo e depois centrifugada a 2000xg, por 15 minutos a 4°C. As bactérias foram ressuspendidas em 8mL do Tampão de transformação II (MOPS 10mM, CaCl_2 75mM, RuCl_2 10mM, glicerol 15% v/v, pH 7,0) estéril e gelado. Alíquotas de 100 μL em tubos de 1,5mL foram congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e estocadas a -80oC para serem posteriormente utilizadas nas transformações.

6.1.4.7 Transformação de bactéria competentes pelo choque térmico

Para a transformação por choque térmico, ao tubo contendo 100 μL do estoque de bactérias competentes, previamente descongelado e mantido em gelo, foi adicionado todo o volume da ligação ou 1 μL do plasmídeo (~100 ng). As bactérias foram então submetidas ao choque térmico: incubação em gelo por 30 minutos, a 42°C por 90 segundos, e novamente em gelo por dois minutos. Após o choque térmico adicionou-se 900 μL de meio SOC (extrato de levedura 0,5%, triptona 2%, NaCl 2mM, KCl 2,5mM, MgCl_2 1mM, MgSO_4 1mM, glicose 20mM, pH 7,0) e incubou-se a 37°C, sob agitação a 200rpm, por uma hora. Para transformações de plasmídeos foram plaqueados 200 μL desta suspensão, com o auxílio de uma alça Drigalski (rodinho), em uma placa contendo

os antibióticos adequados para seleção dos transformantes; no caso de transformação de ligação a suspensão foi centrifugada 1000xg por 5 minutos e ressuspendida em 200µL do próprio meio. A placa foi então incubada a 37°C, por aproximadamente 14 horas.

6.1.4.8 Mini-preparação de DNA plasmidial

Os plasmídeos recombinantes foram extraídos de *E. coli* DH5α por minipreparações de acordo com as metodologias descritas em Sambrook J, *et al.* (1989) e Ausubel *et al.* (1995) e/ou de acordo com as especificações do fabricante do *kit* para extração de DNA da empresa QIAgen.

6.1.4.9 Análise dos clones obtidos

Após a transformação, os clones obtidos foram selecionados através da análise de restrição de minipreparações de DNA plasmidial com pelo menos duas enzimas diferentes. As construções plasmidiais que apresentaram o padrão esperado para a análise de restrição foram sequenciadas.

6.1.4.10 Sequenciamento automático dos clones obtidos

As reações foram feitas com o uso do reagente Dye *Terminator Cycle Sequencing Kit* (Amersham Biosciences/GE Healthcare) numa reação de 10µL contendo 4µL de Dye Terminator, de 2 a 3 pmol do *primer* (específico para cada vetor) e de 300 a 600ng de DNA plasmidial para vetores de alta cópia ou de 500 a 800ng para vetores de baixa cópia. As reações foram incubadas por 1 minuto a 95°C e submetidas a 35 ciclos de 10 segundos a 96°C, 10 segundos a 50°C, e 4 minutos a 60°C em termociclador PCR System 9700 (Perkin Elmer). As amostras foram analisadas no sequenciador automático de DNA ABI PRISM 377 Genetic Analyser (Applied Biosystems).

6.1.5 Expressão das construções STC1 N- e C-terminal clonadas em bactéria.

Após a confirmação da correta clonagem no vetor de expressão pET28aTG, as bactérias *E. coli* BL21(DE3) (contendo o plasmídeo pRARE4) foram transformadas com os respectivos plasmídeos de expressão.

⁴ O plasmídeo pRARE, codifica tRNAs para códons de mamíferos que ocorrem raramente em *E. coli*, elevando o grau de expressão de proteínas que teriam sua expressão limitada pela ausência de alguns tRNAs. É seletivo para o antibiótico clorofenicol e compatível com qualquer vetor pET.

Colônias isoladas foram pré inoculadas em 5mL de meio TB (Terrific Broth – 1,2g de triptona, 2,4g de extrato de levedura e 0,4mL de Glicerol dissolvidos em 90mL de água miliQ, acrescido de 10mL de tampão 170mM KH_2PO_4 e 720mM de K_2HPO_4) contendo 34ug/mL de clorofenicol (pRARE) e 30ug/mL de canamicina (pET28a) a 37°C, 200rpm *overnight* e foram submetidas a testes de expressão em pequena escala, diluídas 1:100 em um volume final de 100 mL de meio TB com antibióticos, em erlenmeyers de 250mL, a 200rpm de acordo até atingirem a densidade óptica de 0,6 (a 600nm – DO600) e então induzidas de acordo com as condições estabelecidas, que variaram as concentrações do indutor IPTG (0,1 a 1mM), lactose (5 a 10mM) temperatura (18°C, 25°C, 30°C e 37°C) e tempo de indução (2 a 5 horas). Uma alíquota de 2 mL bactérias não induzidas foi separada de cada teste para ser utilizado como controle. Não foi possível estabelecer condição de expressão para construção STC1 N-terminal. A condição de expressão usada para região C-terminal foi quando utilizado a temperatura de 37°C para indução com 0,5mM de IPTG durante 4 horas a 200rpm.

6.1.5.1 Lise Bacteriana

O meio de cultura contendo as bactérias induzidas à expressão das proteínas foi coletado em tubos falcon de 50mL, retirado 1mL para verificar a expressão, e pelletado a 4000 rpm, a 4°C durante 15 minutos. O sobrenadante contendo apenas meio de cultura foi descartado e o pellet armazenado a -80°C.

O *pellet* obtido de 1mL de indução previamente separado (~20uL de células), foi ressuspenso em 1mL de tampão PBS 1X (Phosphate Buffered Saline - 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 4.3mM Na_2HPO_4 , 1.4mM KH_2PO_4 pH 7.4) e submetido a 10 ciclos de congelamento/descongelamento em nitrogênio líquido/banho maria 42°C para lise bacteriana. Após os 10 ciclos centrifugou-se o lisado a 14000 rpm, a 4°C durante 30 minutos para separação das frações solúvel (sobrenadante) e insolúvel (*pellet*).

6.1.5.2 SDS-PAGE

Às amostras da fração solúvel e insolúvel (ressuspensas em Guanidina 6M 1:6) foram acrescentadas de ¼ do volume final do tampão de amostra concentrado 4x (Tris-HCl 250mM pH 6,8, SDS 0,8%, azul de bromofenol 0,2%, glicerol 45,5% e 2-mercaptoetanol 20%) e incubadas por cinco minutos a 95°C em banho seco. As amostras foram então submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida-sódio dodecil sulfato

(SDS-PAGE) ou então estocadas a -80°C , sendo que antes de serem submetidas à eletroforese foram incubadas por cinco minutos a 95°C em banho seco.

Para as SDS-PAGE foram utilizados mini-géis (10x9x0,05cm) constituídos de um gel de empilhamento de 4% e um de separação com 10 ou 12,5 % de poliacrilamida. Para a corrida foi utilizado o tampão de eletrodo (Tris 25mM, glicina 250mM e SDS 0,1%) e a amperagem fixada à 15mA até que as amostras entrassem no gel, passando-se para 20mA até o final da corrida. Os géis que não seriam utilizados para *Western blot* foram então corados com Coomassie Blue R-250 0,25% (Sigma) em ácido acético 10% (v/v) e metanol 50% (v/v), e descorados em solução de ácido acético 5% (v/v) e metanol 12,5% (v/v). O padrão de peso molecular utilizado foi *BenchMark Protein Ladder* (Invitrogen), que é constituído por 15 proteínas engenheiradas e com *tag* de Histidina (que pode ser utilizado para a detecção em *Western blot*) variando o peso molecular total de cada uma entre 10 e 220 kDa, sendo que as bandas de 20 e 50 kDa são as mais proeminentes.

6.1.5.3 *Western Blot*

As proteínas separadas por SDS-PAGE foram transferidas eletroforicamente para membrana de polivinildifluoridina (PVDF) Immobilon-P (Millipore). Para isso o gel foi imerso em Solução Ânodo II (Tris 25mM, metanol 10%, pH 10,4) por 5 minutos, enquanto a membrana foi pré-incubada em metanol absoluto por 15 segundos. A transferência foi realizada utilizando-se o *Semi-Dry Blotting System* (The W.E.P. Company), colocando-se do ânodo do aparelho para o cátodo, a seguinte seqüência: (1) dois papéis Whatman 3M embebidos em solução Ânodo I (300 mM Tris-HCl, pH 10,4 e 10% de metanol), (2) um papel Whatman 3M embebido com tampão Ânodo II, (3) a membrana, preparada como descrito anteriormente, (4) gel, preparada como descrito anteriormente, (5) três papéis embebidos em tampão Cátodo (25 mM Tris-HCl, pH 10,4; 20% de metanol e 40 mM ácido-capróico). A transferência foi feita por um intervalo de 60 a 90 minutos a 1 mA por cm^2 de membrana/gel. Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi corada com Ponceau (Vetec) 0,5% em ácido acético 1% por 5 minutos e lavada com água para remover o excesso de corante e visualizar as bandas. Os sítios inespecíficos da membrana foram neutralizados com a solução de bloqueio (5% leite desnatado em pó em TTBS [TrisHCl 50mM pH8,0, NaCl 150mM e Tween-20 0,1%]) sob agitação contínua por uma hora à temperatura ambiente ou *overnight* a 4°C . A membrana foi lavada 5 vezes durante 1 minuto com TTBS e então foi adicionado o anticorpo primário, e esta foi incubada por uma hora a temperatura ambiente. Em seguida, o anticorpo primário não

ligado foi retirado por 5 lavagens de 5 minutos cada, quando então foi adicionado o anticorpo secundário, incubando a membrana por uma hora à temperatura ambiente, seguido de cinco lavagens de 5 minutos cada. A seguir, em câmara escura, a membrana foi banhada com a solução de revelação que consiste da mistura na proporção 1:1 dos reagentes do *Western Blotting Luminol Regent* (Santa Cruz Biotechnology). A membrana foi protegida entre dois plásticos e exposta ao filme de raios-X (Sigma-Kodak) por vários intervalos de tempo, com o objetivo de se obter a melhor revelação das bandas. Após a exposição o filme foi revelado manualmente em sala escura.

6.1.5.4 Anticorpos Utilizados

Anticorpo monoclonal feito em camundongo contra a glutathione-S-transferase (GST) (sobrenadante de hibridoma clone 5.3.3 gerado no laboratório por imunização de camundongos BALB/c com uma proteína de fusão GST-CGI-55 (Lemos TA, *et al.*, 2003), utilizado numa diluição de 1:5).

Anticorpo monoclonal feito em camundongo contra o tag de poli-histidina (anti-penta His diluição 1:5000).

Anticorpo de cabra contra IgG de camundongo conjugado com peroxidase de rabanete (HRP) (Santa Cruz Biotechnology, utilizado na diluição 1:4000)

6.1.5.5 Quantificação por espectrofotometria

Aminoácidos aromáticos, principalmente o triptofano, podem ser detectados a comprimentos de onda de 280nm. Para isso, as amostras submetidas a análise de quantificação eram diluídas em tampão desnaturante Guanidina 6M e submetidas a leitura em espectrofotômetro, em uma cubeta de quartzo, a 280nm. Para todas as medidas, era descontando a absorbância do tampão (branco), medida no mesmo comprimento de onda.

6.1.6 Refolding e purificação de STC-1 C-terminal-GST dos corpos de inclusão de BL21 (DE3) pRARE

A expressão de STC-1 C-terminal-GST foi feita em 500mL de cultura e seu *pellet* lisado por pressão utilizando-se a prensa *French® Press*. Após separado a fração solúvel e insolúvel por centrifugação, um gel de SDS-PAGE foi feito para análise das frações, detectando, como esperado, após os testes de mini-indução a proteína apenas na fração insolúvel.

O protocolo de refolding de lisado (Liu X, *et al.*,2007), foi usado para purificação de STC1 C-terminal-GST, dividindo-se o *pellet* total (500mL de indução) em dois iguais. O *pellet* de 250mL de indução foi ressuspensão em 50mL de tampão LX-A (NaCl 50mM, Tris-Cl pH8,0 50mM, EDTA 0,5mM, Glicerol 5%, DTT 5mM e Ácido Deoxicolato 2% [p/v]) e incubado a TA durante 30 minutos. A amostra foi centrifugada a 12.000g, a 4°C durante 10 minutos, o sobrenadante descartado e o *pellet* lavado com PBS 1X e ressuspensão em tampão de desnaturação LX-B (Tris-Cl 10mM, NaH₂PO₄ 100mM, Uréia 8M, DTT 5mM, pH 8,0). Após incubação por 30 minutos a TA, a amostra foi centrifugada a 12.000xg por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi diluído 20 vezes em tampão de *refolding* LX-C, gelado (Tris-Cl 25mM, NaCl 100mM, Glicerol 10%, L-arginina 5mM, Glutathione reduzida 1mM, Glutathione Oxidada 0,5mM, Uréia 0,2M, pH 9,0) e incubado durante 24 horas a 4°C. O conteúdo foi dialisado contra 5L de PBS 1X, a 4°C, durante 24 horas (com uma troca de tampão após 12 horas) em saco de dialise de poro de 3500Da. A amostra dialisada então foi incubada com 2,5mL de resina *Glutathione Sepharose* 4B, previamente equilibrada com PBS 1X, durante 1 hora a 4°C em agitador. Após a resina ter sido lavada 3 vezes com tampão PBS 1X, a resina foi incubada por 1,5 hora, a 4°C, com 15mL de tampão de purificação (MES 50mM, NaCl 500mM, Glutathione Reduzida 10mM, pH 6,5). O sobrenadante foi aliqüotado e armazenado a -80°C.

6.1.7 Produção e seleção de anticorpos monoclonais anti-STC1

Foi encomendada à empresa Célula B (UFRGS-RS) a produção de anticorpos monoclonais anti-STC1. Para tanto foi enviado a proteína recombinante STC1-HT, produzida em baculovírus, para imunização dos camundongos e a proteína STC1-Cterminal-GST, produzida em *E. coli* e submetida ao *refolding*, para seleção dos clones. A empresa realizou testes de ELISA para escolha de 3 clones, que foram produzidos e purificados. A nós foram enviados os hibridomas, o sobrenadante, ascites e o purificado de 3 clones.

6.1.8 Biotinilação dos anticorpos monoclonais anti-STC1

Para realização do ensaio de ELISA sanduiche, os 3 clones dos anticorpos monoclonais anti-STC1 encomendados e produzidos no pela empresa Célula B (UFRGS), foram conjugados a moléculas de biotina, para que pudessem ser testados como anticorpos de detecção no ensaio. Para tanto a conjugação dos anticorpos assim como a mensuração do número de moléculas de biotina/molécula de IgG, foi feita através do kit

comercial *EZ-Link Sulfo-NHS-Biotinylation* (Pierce) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração final de cada clone foi determinada por técnica de BCA.

6.1.9 Ensaio de ELISA

Como pode ser visto na tabela 3, diversos testes foram feitos com os 3 clones obtidos, variando os pares de captura e detecção. Para tanto *o coating* da placa de 96 *wells* para captura do antígeno, foi feito com 1, 2, 3 ou 4 μ g/mL de anticorpo (clone 1, 2 ou 3) diluído em 250 μ L de PBS1X, a 4°C, *overnight*. Na manhã seguinte, a placa foi lavada 2 vezes com PBS1X e bloqueada com PBS1X acrescido de 3% de BSA (PBSA) por 2 horas a temperatura ambiente. Após mais 2 passos de lavagens com PBS1X, foi adicionado a todos os poços STC1-HT diluída em PBSA (de 500pg/mL a 500 μ g/mL), durante 1h30 em temperatura ambiente (TA). Mais 4 passos de lavagem foram feitos com PBS1X e então os anticorpos de detecção (clones 1, 2 ou 3 biotinizados) foram adicionados (250, 500, 1000 ou 2000ng/mL) diluídos em PBSA e incubados por 2 horas a TA. Após mais 3 passos de lavagens com PBS1X, foi adicionado estreptavidina-HRP (1:10000 em PBSA) e as placas foram incubadas por 45 minutos a TA. Em seguida, após 3 lavagens com PBS1X, foram adicionados 100 μ L do reagente TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine - LGC Biotecnologia) incubado a TA por 22 minutos. A reação foi paralisada com a adição de 50 μ L de 1N H₂SO₄. As placas foram lidas a 450nm e os valores plotados em MS Excel 2007.

6.2 - Identificar parceiros de interação para STC1 humana, dentro e fora da célula, visando compreender melhor as vias de atuação e possíveis funções

6.2.1 O ensaio de duplo híbrido em leveduras

As técnicas utilizadas nesta seção (Construções plasmidiais e sub-clonagens, ensaio de duplo híbrido em leveduras e análise de sequências de DNA, mapeamento de interações, expressão e purificação de proteínas recombinantes, GST *pull down*, co-imunoprecipitação, análises filogenéticas, SUMOilação *in vitro* e ensaios SUMO E3 ligase, localização sub-celular e construção da rede de interações proteína-proteína) estão descritas em nosso artigo (Santos MT, et al., 2011) arquivo anexo a esta tese (item 7).

6.2.2 Isolamento e identificação do receptor de Stanniocalcina-1 humana

6.2.2.1 Cultura de linhagens celulares humanas

As linhagens celulares foram cultivadas em garrafas de tamanhos variados (Corning), em estufa a 37°C com atmosfera suplementada com 5% de CO₂. O meio de cultura estéril utilizado foi RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos penicilina/estreptomicina.

6.2.2.2 Citometria de Fluxo

Linhagens de células Karpas, K562 e L540, após terem sido incubadas com STC1-HT ou sem nenhuma proteína (controle negativo), foram ressuspensas em tampão FACS (PBS1X, 5% soro fetal bovino e 0.1% azida de sódio) e incubadas com 1ug de anticorpo monoclonal mouse anti-PentaHis (Santa Cruz) ou 1ug isotipo de IgG mouse (controle negativo) em gelo. Após 1h de incubação, as células foram lavadas 3X em tampão FACS (2000g, 2 minutos) e incubadas com 0,4ug de anticorpo secundário goat anti-mouse fusionado ao fluoróforo PE. Após 30 minutos de incubação em gelo, as células foram lavadas 5X com tampão FACS e então analisadas por citometria de fluxo (BD - Becton Dickinson) e os dados analisados pelo *software* CellQuant.

6.2.2.3 *Crosslinking* e isolamento do complexo STC1-receptor

O *crosslinking* de STC1 ao receptor foi feito utilizando o reagente da Pierce Sulfo SBED trifuncional com biotina (Figura 20). Inicialmente faz-se necessário a conjugação de STC1-HT com o *crosslinker*. Para tanto, 100ug de STC1-HT foram dialisados por 4 horas a 4°C contra tampão PBS1X utilizando membrana de poro tamanho 12-14kDa previamente fervida. A proteína então ressuspensa em 500uL de PBS1x foi incubada com 50mM do *crosslinker* (1mg ressuspensa em 22uL de DMSO) no escuro, e em gelo por 2 horas. Em seguida, uma nova diálise idêntica à descrita acima foi realizada para que o excesso de *crosslinker* não conjugado fosse eliminado. A proteína então foi incubada com as linhagens celulares, conforme descrito e as células lavadas 2 vezes com PBS1X gelado, no escuro. Em seguida, as células foram submetidas à fotoativação do *crosslinker*, através da exposição por 15 minutos, a 5 cm de distancia de uma lâmpada UV (312nm), permitido então a estabilização do complexo. As células então foram lisadas com tampão RIPA (*RadiolImmunoPrecipitation Assay* - 50mM Tris HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% , sodium Deoxycholate e 0.1% SDS), centrifugadas 30 minutos a

15 000g a 4°C e o sobrenadante foi incubado com *beads* magnéticas conjugadas com estreptavidina (Boehringer Mannheim) durante 1 hora a 4°C com agitação constante. As *beads* então foram lavadas 3X com tampão PBS1X e ressuspensas em *loading buffer* 2X (com ou sem DTT na composição) e fervidas a 95°C durante 15 minutos. Como controle negativo, fez-se o mesmo processo com STC1-HT não conjugada ao *crosslinker* e com a proteína V2-GST conjugada com o *crosslinker*, além das células não incubadas com nenhuma proteína, apenas com PBS 1X.

6.2.2.4 Espectrometria de massas

As bandas foram recortadas do gel (Figura 21 B) e as proteínas foram reduzidas, alquiladas e digeridas com tripsina. Os peptídeos foram separados por gradiente de hidrofobicidade em coluna C18 (100 µm x 100 mm) (Waters) em nanoAcquity Ultra Performance LC (Waters) acoplado a uma interface de ESI *nanospray* em um espectrômetro de massa do tipo Q-ToF Ultima (MicroMass/Waters). Volume de 4,5 µL dos peptídeos foram injetados automaticamente e os peptídeos foram eluídos da coluna com gradiente de 0-90% de acetonitrila contendo ácido fórmico a 0,1% durante 20 min sob fluxo de 0,6 µL/min. Os arquivos de dados gerados pelo Q-ToF foram processados em programa Mascot Distiller v.2.3.2.0, 2009 (Matrix Science Ltd.). Para a identificação das proteínas foi utilizado o programa Mascot Server v.2.3.01.0 (Matrix Science Ltd.), tendo como parâmetros uma clivagem perdida pela tripsina, modificação fixa de carbamidometilação, modificação variável de oxidação da metionina e 0,1 Da de tolerância de massas para MS e 0,1 Da de tolerância de massas para MSMS. As buscas foram realizadas utilizando o banco de dados de humano do International Protein Index.

6.2.3 A interação entre Stanniocalcina-1 e NEK6

6.2.3.1 Busca por sítios de fosforilação na sequência de STC1

Foi utilizado o programa disponível online PHOSIDA (www.phosida.de).

6.2.3.2 Ensaio de Fosforilação in vitro

O *mix* de reações feito em tampão quinase (50 mM MOPS, pH 7.4, 300 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.1mM PMSF) contendo 100 µM ATP, 185 kBq [γ -³²P] ATP (222 TBq/mmol; NEM) e 0.1 µg/µL de STC1-HT produzida em baculovírus, 6xHis-hNek6 *wide type* ou 6xHis-hNek6 mutante (S206A) foram incubadas a 30°C por 30 minutos. Os produtos de reação foram separados em gel 12,5% SDS-PAGE e as proteínas fosforiladas detectadas por autoradiografia.

6.2.3.3 Ensaio de co-localização de STC1 e NEK6 em células THP-1 e microscopia confocal.

Células THP-1 foram cultivadas em garrafas de 75 cm² com meio RPMI complementado com 10% de soro fetal bovina e 1% de Penicilina/Streptomicina. Cerca de 10⁵ células, diluídas em 100uL foram espotadas em lâminas de vidro com auxílio de um *cytospin* (800g / 5 minutos). Em seguida as células foram fixadas em uma solução contendo 2% (w/v) *paraformal-dehyde*, 50 µM Taxol e 50mM EGTA a temperatura ambiente por 20 minutos. Logo após foram permeabilizadas com e bloqueadas com uma mistura de 0.3% (v/v) Triton-X-100 e 3% (w/v) glicina em PBS1X a temperatura ambiente por 30min. As células THP-1 foram incubadas a temperatura ambiente, por 1 hora, com anticorpos específicos (*mouse* monoclonal anti-STC1 [1:100] e *goat* polyclonal anti-NEK6 [1:100 Santa Cruz Biotechnology]) em solução de PBS1X contendo 0,1% de BSA (w/v). Em seguida, incubou-se por uma hora a temperatura ambiente com os anticorpos secundários *donkey* anti-*mouse* (1:200) FITC e *chicken* anti-*goat* (1:200) Rhodamina. Como controle uma lamina apenas com anticorpos secundários foi feita em paralelo. DAPI (Molecular Probes) foi utilizado para corar o núcleo das células (1:200). As marcações foram examinadas em microscópio de fluorescência Nikon e microscópio confocal a Axioplan Carl Zeiss LSM 510 META.

6.2.4 O ensaio de pull down semi in vivo

6.2.4.1 Extração de baço murino.

Foi utilizado um rato macho adulto *Wistar*, fornecido pelo Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB), Campinas-SP, com peso de 400g. O rato foi anestesiado por via intraperitoneal com uma mistura de Cloridrato de Cetamina (Ketalar, Parke-Davis, Brasil) e Diazepam (União Química Farmacêutica Nacional S/A, Brasil). Esta mistura foi administrada na proporção de 10mg de Cloridrato de Cetamina para 0,07mg de diazepam, e a dose aplicada foi de 0,3mL/100g de peso corporal do animal. Por fim, o animal foi sacrificado com injeção de solução de cloreto de potássio (KCl) pela cânula arterial e o baço foi extraído.

6.2.4.2 Extração de proteínas totais de baço murino

O baço murino extraído foi congelado com nitrogênio líquido e macerado em cadinho até sua pulverização. O pó foi ressuspenso em 2mL de PBS1X contendo cocktail

de inibidores de protease (Roche) e sonicado em 6 ciclos de 5 segundos de pulso / 10 segundos de pausa, a 40% (Sonics). O lisado foi centrifugado a 14000 rpm por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante coletado.

6.2.4.3 Pull-down de proteínas do baço murino

Depois de lavada 3x com PBS1X, 50ul de resina Ni-NTA foram incubadas com 500ug de STC1-HT para garantir sua saturação e lavada mais 3x com PBS1X. Como controle, o mesmo volume de resina, lavada 3x com PBS1X (sem ter sido incubada com STC1-HT) foi utilizada. As resinas foram incubadas *overnight* com 1mL de lisado total de proteínas do baço murino a 4°C com agitação constante. Após a incubação, as resinas foram lavadas com PBS1X por 5x, ressuspensas em tampão de corrida SDS 4x, fervidas durante 15 minutos a 95°C e 30uL de amostra foram submetidas a eletroforese em gel de 12,5% SDS-PAGE. O gel foi corado com prata de acordo com instruções do fabricante, com o *kit Silver Stain* (Invitrogen).

6.2.4.4 Identificação de proteínas que se ligaram a STC1-HT por espectrometria de massas

As bandas e faixas foram recortadas dos géis e as proteínas foram reduzidas, alquiladas e digeridas com tripsina. Os peptídeos gerados foram separados por gradiente de hidrofobicidade em coluna C18 (75 mm x 100 mm) (Waters) em nano Acquity Ultra Performance LC (Waters) acoplado a uma interface de ESI nanospray em um espectrômetro de massa do tipo Q-ToF Ultima (MicroMass/Waters). Volume de 4,5 ml dos peptídeos foram injetados automaticamente e os peptídeos foram eluídos da coluna com gradiente de 0-90% de acetonitrila contendo ácido fórmico a 0,1% durante 45 min sob fluxo de 0,6 mL/min. Os arquivos de dados gerados pelo Q-ToF foram processados em programa Mascot Distiller v.2.2.1.0, 2008 (Matrix Science Ltd.). Para a identificação das proteínas foi utilizado o programa Mascot Server v.2.2 (Matrix Science Ltd.), tendo como parâmetros uma clivagem perdida pela tripsina, modificação fixa de carbamidometilação, modificação variável de oxidação da metionina e 0,1 Da de tolerância de massas para MS e 0,1 Da de tolerância de massas para MSMS. O Decoy de erro suportado foi de 1%. As buscas foram realizadas utilizando o banco de dados não-redundante do *National Center for Biotechnology Information* (NCBIInr).

6.2.5 Flp-In T-Rex Mammalian Expression System – Geração de clones estáveis

O sistema Flp-In T-Rex da Invitrogen permite a geração de linhagens isogênicas de células estáveis de mamíferos com expressão de um gene de interesse induzida por tetraciclina. As linhagens de células hospedeiras Flp-In-293 (*Human embryonic kidney*) T-Rex foram previamente transfectadas, de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante, com os vetores pFRT/lacZeo com seleção por Zeocina (400ug/mL) e o pcDNA6/TR com seleção Blastidina (15ug/mL) e atividade de B-Galactosidase. O vetor de expressão pcDNA5/FRT/TO/FLAG foi digerido e linearizado por enzimas de restrição NotI e BamHI, purificado de gel de agarose e submetido a reação de ligação com inserto STC1, amplificado por PCR com os primers Flag-Forward STC1 BamHI (5' – GGATCCACCCATGAGGCGGAGCAG – 3') e Flag-Reverse STC1 EcoRI STOP/A (5' – GAATTCTTATGCACTCTCATGGGATGTGCGTT – 3').

Foi realizada uma minipreparação de DNA plasmidial dos vetores pcDNA5-STC1-FLAG e pOGG44 que foram co-transfectados em Linhagens de Células Hospedeiras Flp-In-293 T-Rex na proporção de 1:9 (ug) em meio DMEM sem os antibióticos de Zeocina, Higromicina, ou Blastidina numa placa de 6 wells. Após 24 horas, as células foram divididas na proporção de 1:5, 1:10 e 1:20 em placas de petri de 10 cm² e selecionados com meio contendo Higromicina B a 100 ug/mL. Depois de 24 horas o meio foi trocado por meio DMEM contendo Higromicina B a 100 ug/mL e Blastidina a 15 ug/mL, seguindo esta mesma troca entre 3 a 4 dias até que as colônias possam ser vistas a olho nu (~5 mm de diâmetro). Realizamos a seleção policlonal e distribuimos as células na mesma placa de petri até atingir confluência de aproximadamente 80%, então transferimos e expandimos para garrafas de 25cm², 75cm² e 175 cm² em meio contendo Higromicina B e Blastidina. A expressão do gene de interesse foi induzida por diferentes concentrações de tetraciclina (1 mg/mL em 100% etanol).

6.2.6 Resultados Complementares

6.2.6.1 Ensaios de marcação intracelular e de MTT

Placas de 96 poços foram pré-incubadas com células do estroma até sua confluência 37°C. Adicionou-se aos poços $5,0 \times 10^4$ células viáveis das linhagens de leucemia precursor-B Nalm6 e REH aos poços, contendo ou não células primárias do estroma da medula óssea. Adicionou-se então diferentes concentrações da proteína recombinante STC1-HT, originária de células de insetos (baculovírus): 0 (veículo), 50,

100, 200, 400, 1000 e 2000 ng/mL. Todo experimento foi realizado em condições assépticas. As placas foram incubadas em estufa a 37°C e em atmosfera úmida, com 5% de CO₂ durante 24 e 48 horas. Após esse período, a proliferação celular foi avaliada pelo método de MTT. O ensaio colorimétrico do MTT tem como princípio a redução do sal MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromo tetrazólio, Sigma) pela desidrogenase mitocondrial das células vivas, para um produto de reação MTT-formazana de cor azul escuro. Após incubação foi adicionado 20 uL de 0,5 mg/mL de 3-(4,5-dimethylthazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) e incubadas a 37°C por 4,5 h. Então foi adicionado 100 uL SDS 10%/HCL 0,01M. O produto da reação foi mensurado à 590nm usando uma leitora de microplacas. A proliferação celular foi expressa em termos de absorbância. Os testes foram realizados em triplicata.

6.2.6.2 Marcação intracelular de STC1

Placas de 96 poços foram semeadas com células do estroma e incubadas a 37°C até a confluência da camada de estroma. Adicionou-se aos poços $2,0 \times 10^5$ células viáveis de leucemia precursor-B (LLA) de pacientes coletadas no Centro Infantil Boldrini aos poços com e sem células do estroma. Adicionou-se então diferentes concentrações da proteína recombinante STC1-HT, originária de células de insetos (baculovírus): 0 (veículo), 50, 100, 200, 400, 1000 e 2000 ng/mL. Todo experimento foi realizado em condições assépticas. As placas foram incubadas em estufa a 37°C e em atmosfera úmida, com 5% de CO₂ durante 24h. Após 24h, as células foram recuperadas, lavadas em PBS, ressuspensas em PBS gelado e incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente para bloqueio de marcação inespecífica. Após duas lavagens com PBS/BSA 0,5% (PBSB), as células foram incubadas no gelo por 30 minutos com CD19-Cy5 (BD Pharmigen), lavadas com PBSB e fixadas em paraformaldeído 0,5% por 20 minutos. As células foram então lavadas com PBSB, permeabilizadas por 10 minutos com PBSB/saponina 0,5%, centrifugadas e marcadas com anticorpo primário goat polyclonal anti-STC1 por 30 minutos. Após lavagem com PBSB/saponina, as células foram marcadas com anticorpo secundário donkey anti-goat IgG F(ab')-APC por 30 minutos, e posteriormente lavadas duas vezes com PBSB/saponina e uma vez com PBSB antes de serem novamente fixadas com paraformaldeído. As células foram submetidas a citometria de fluxo, e apenas as células viáveis foram utilizadas para avaliar diferenças na quantidade de STC1 intracelular no equipamento BDFACSCanto (Becton Dickinson) usando o *software* BDFACSDiva (Becton Dickinson).

7 Referências Bibliográficas e Patentes

Artigos Científicos

- ABU-FARHA M, NILES J and WILLMORE WG. (2005) Erythroid-specific 5-aminolevulinate synthase protein is stabilized by low oxygen and proteasomal inhibition. *Biochem.Cell Biol.* **83**, 620-630.
- ANDERSSON MK, STAHLBERG A, ARVIDSSON Y, OLOFSSON A, SEMB H, STENMAN G, NILSSON O and AMAN P. (2008) *The multifunctional FUS, EWS and TAF15 proto oncoproteins show cell type-specific expression patterns and involvement in cell spreading and stress response.* *BMC.Cell Biol.* **9**, 37
- AUSUBEL FM. (1995) *Short protocols in molecular biology.* Wiley, New York
- AYALA F, DEWAR R, KIERAN M and KALLURI R. (2009) *Contribution of bone microenvironment to leukemogenesis and leukemia progression.* *Leukemia* **23(12)**, 2233-2241.
- BARLET JP, GAUMET N, COXAM V, DAVICCO MJ. (1998) *Calcitonin and stanniocalcin. Particular aspects of the endocrine regulation of phospho-calcium metabolism in mammals and fish.* *Ann Endocrinol (Paris).* **59(4)**:281-90
- BASINI G, BUSSOLATI S, SANTINI SE and GRASSELLI F. (2009) *Stanniocalcin, a potential ovarian angiogenesis regulator, does not affect endothelial cell apoptosis.* *Ann N Y Acad Sci.* **1171**,94-9.
- BASINI G, BAIONI L, BUSSOLATI S, GROLLI S, KRAMER LH, WAGNER GF and GRASSELLI F. (2010) *Expression and localization of stanniocalcin 1 in swine ovary.* *Gen Comp Endocrinol.* **166(2)**:404-408.
- BHAGWAT SV, LAHDENRANTA J, GIORDANO R, ARAP W, PASQUALINI R and SHAPIRO LH. (2001) *CD13/APN is activated by angiogenic signals and is essential for capillary tube formation.* *Blood*, **97**, 652-659.
- BLOCK GJ, OHKOUCHI S, FUNG F, FRENKEL J, GREGORY C, POCHAMPALLY R, DIMATTIA G, SULLIVAN DE and PROCKOP DJ. (2008) *Multipotent Stromal Cells (MSCs) are Activated to Reduce Apoptosis in Part by Upregulation and Secretion of Stanniocalcin-1 (STC-1).* *Stem Cells.* **27(3)**:670-81
- BLOCK GJ, DIMATTIA GD, PROCKOP DJ. (2010) *Stanniocalcin-1 regulates extracellular ATP-induced calcium waves in human epithelial cancer cells by stimulating ATP release from bystander cells.* *PLoS One.* **20;5(4)**:e10237.
- BOCOCK JP, CARMICLE S, MADAMBA E and ERICKSON AH. (2010) *Nuclear Targeting of an Endosomal E3 Ubiquitin Ligase.* *Traffic.***11(6)**:756-66
- BREITKREUTZ BJ, STARK C and TYERS M. (2003) *Osprey: a network visualization system.* *Genome Biol.*, **4**, R22
- BUTKUS A, ROCHE PJ, FERNLEY RT, HARALAMBIDIS J, PENSCHOW JD, RYA GB, TRAHAIR JF, TREGEAR GW and COGHLAN JP. (1987) *Purification and cloning of a corpuscles of Stannius protein from Anguilla australis.* *Molecular and Cellular Endocrinology* **54** 123–133.
- CHANG AC, JANOSI J, HULSBEEK M, DE JONG D, JEFFREY KJ, NOBLE JR and REDDEL RR. (1995) *A novel human cDNA highly homologous to the fish hormone stanniocalcin.* *Mol.Cell Endocrinol.* **112**, 241-247.
- CHANG ACM and REDDEL RR. (1998) *Identification of a second stanniocalcin cDNA in mouse and human: stanniocalcin 2.* *Molecular and Cellular Endocrinology* **141** 95–99.
- CHANG ACM, JELLINEK DA and REDDEL RR. (2003) *Mammalian stanniocalcins and cancer.* *Endocrine-Related Cancer* **10** 359–373
- COLBY-GRAHAM MF and CHORDAS C. (2003) *The childhood leukemias.* *J.Pediatr.Nurs.***18**,87-95.

- DANIEL AR and LANGE CA. (2009) *Protein kinases mediate ligand-independent derepression of sumoylated progesterone receptors in breast cancer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A. 06(34):14287-92.
- DAVE B, WYNNE R, SU Y, KOROURIAN S, CHANG JC, SIMMEN RC. (2010) *Enhanced mammary progesterone receptor-A isoform activity in the promotion of mammary tumor progression by dietary soy in rats*. Nutr Cancer. 62(6):774-82.
- De STANCHINA E, QUERIDO E, NARITA M, DAVULURI RV, PANDOLFI PP, FERBEYRE G and LOWE SW. (2004) *PML is a direct p53 target that modulates p53 effector functions*. Mol.Cell, **13**, 523-535.
- DHORDAIN P, ALBAGLI O, HONORE N, GUIDEZ F, LANTOINE D, SCHMID M, THE HD, ZELENT A and KOKEN MH. (2000) *Colocalization and heteromerization between the two human oncogene POZ/zinc finger proteins, LAZ3 (BCL6) and PLZF*. Oncogene, **19**, 6240-6250.
- DIAS S, SHMELKOV SV, LAM G and RAFII S. (2002) *VEGF(165) promotes survival of leukemic cells by Hsp90-mediated induction of Bcl-2 expression and apoptosis inhibition*. Blood **99**, 2532–2540.
- DIMATTIA GE, VARGHESE R and WAGNER GF. (1998) *Molecular cloning and characterization of stanniocalcin-related protein*. Molecular and Cellular Endocrinology **146** 137–140
- EDELMANN MJ, IPHÖFER A, AKUTSU M, ALTUN M, DI GLERIA K, KRAMER HB, FIEBIGER E, DHE-PAGANON S and KESSLER BM. (2009) *Structural basis and specificity of human otubain 1-mediated deubiquitination*. Biochem J. **418**(2):379-90.
- EISENHOFER G, HUYNH TT, PACAK K, BROUWERS FM, WALTHER MM, LINEHAN WM, MUNSON PJ, MANNELLI M, GOLDSTEIN DS and ELKAHLOUN AG. (2004) *Distinct gene expression profiles in norepinephrine- and epinephrine-producing hereditary and sporadic pheochromocytomas: activation of hypoxia-driven angiogenic pathways in von Hippel-Lindau syndrome*. Endocr Relat Cancer. 11(4):897-911.
- ELLARD JP, MCCUDDEN CR, TANEGA C, JAMES KA, RATKOVIC S, STAPLES JF and WAGNER GF. (2007) *The respiratory effects of stanniocalcin-1 (STC-1) on intact mitochondria and cells: STC-1 uncouples oxidative phosphorylation and its actions are modulated by nucleotide triphosphates*. Mol Cell Endocrinol **264**:90-101
- FIEDLER W, GRAEVEN U and ERGÜAN S.(1997) *Vascular endothelial growth factor, a possible paracrine growth factor in human acute myeloid leukemia*. Blood 89(6), 1870-1875.
- FONTAINE M. (1964) *Stannius' corpuscles and ionic (Ca, K, Na) of the interior environment of the eel (Anguilla anguilla L.)*. C R Hebd Seances Acad Sci **259**: 875-878
- FRANZEN AM, ZHANG KZ, WESTBERG JA, ZHANG WM, AROLA J, OLSEN HS and ANDERSSON LC. (2000) *Expression of stanniocalcin in the epithelium of human choroid plexus*. Brain Res, **887**:440-443.
- FUJIWARA Y, SUGITA Y, NAKAMORI S, MIYAMOTO A, SHIOZAKI K, NAGANO H, SAKON M and MONDEN M. (2000) *Assessment of Stanniocalcin-1 mRNA as a molecular marker for micrometastases of various human cancers*. Int J Oncol.16(4):799-804.
- GAO C, CHENG X, LAM M, LIU Y, LIU Q, CHANG KS and KAO HY. (2008a) *Signal-dependent regulation of transcription by histone deacetylase 7 involves recruitment to promyelocytic leukemia protein nuclear bodies*. Mol.Biol.Cell **19**, 3020-3027.
- GAO C, HO CC, REINEKE E, LAM M, CHENG X, STANYA KJ, LIU Y, CHAKRABORTY S, SHIH HM and KAO HY. (2008b) *Histone deacetylase 7 promotes PML SUMOylation and is essential for PML nuclear body formation*. Mol.Cell Biol. **28**, 5658-5667.
- GAREAU JR and LIMA CD. (2010) *The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition*. Nat Rev Mol Cell Biol.11(12):861-71.
- GASS JN, JIANG HY, WEK RC and BREWER JW. (2008) *The unfolded protein response of B-lymphocytes: PERK-independent development of antibody-secreting cells*. Mol.Immunol. **45**, 1035-1043.

- GERRITSEN ME, SORIANO R, YANG S, INGLE G, ZLOT C, TOY K, WINER J, DRAKSHARAPU A, PEALE F, WU TD and WILLIAMS PM. (2002) *In silico data filtering to identify new angiogenesis targets from a large in vitro gene profiling data set*. *Physiol Genomic*, **10**, 13-20..
- GILLOT I, MATTHEWS C, PUEL D, VIDAL F and LOPEZ P. (2009) *Ret Finger Protein: An E3 Ubiquitin Ligase Juxtaposed to the XY Body in Meiosis*. *Int J Cell Biol* **2009**, 524858
- GNAD F, REN S, COX J, OLSEN JV, MACEK B, OROSHI M and MANN M. (2007) *PHOSIDA (phosphorylation site database): management, structural and evolutionary investigation, and prediction of phosphosite*. *Genome Biology*, **8**:R250.
- GOUADON E SCHUHMEIER RP, URSU D, ANDERSON AA, TREVES S, ZORZATO F, LEHMANN-HORN F and MELZER W. (2006) *A possible role of the junctional face protein JP-45 in modulating Ca²⁺ release in skeletal muscle*. *J.Physiol*, **572**, 269-280.
- GREENWOOD MP, FLIK G, WAGNER GF and BALMENT RJ. (2009) *The corpuscles of Stannius, calcium-sensing receptor, and stanniocalcin: responses to calcimimetics and physiological challenges*. *Endocrinology*. **150**(7):3002-10.
- HACKL W and LUHRMANN R. (1996) *Molecular cloning and subcellular localization of the snRNP-associated protein 69KD, a structural homologue of the proto-oncoproteins TLS and EWS with RNA and DNA-binding properties*. *J.Mol.Biol.* **264**, 843-851.
- HASILO C., MCCUDDEN CR, GILLESPIE JR, JAMES KA, HIRVI ER, ZAIDI D and WAGNER GF. (2005) *Nuclear targeting of stanniocalcin to mammary gland alveolar cells during pregnancy and lactation*. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* **289**, E634-E642
- HASSELBLATT M, BÖHM C, TATENHORST L, DINH V, NEWRZELLA D, KEYVANI K, JEIBMANN A, BUERGER H, RICKERT CH and PAULUS W. (2006) *Identification of novel diagnostic markers for choroid plexus tumors: a microarray-based approach*. *Am J Surg Pathol.* **30**(1):66-74.
- HE LF, WANG TT, GAO QY, ZHAO GF, HUANG YH, YU LK and HOU YY. (2011) *Stanniocalcin-1 promotes tumor angiogenesis through up-regulation of VEGF in gastric cancer cells*. *J Biomed Sci.*;18(1):39.
- HOFER T, WENGER RH, KRAMER MF, FERREIRA GC and GASSMANN M. (2003) *Hypoxic up- regulation of erythroid 5-aminolevulinic synthase*. *Blood* **101**, 348-350.
- HOLMES DI and ZACHARY IC. (2008) *Vascular endothelial growth factor regulates stanniocalcin-1 expression via neuropilin-1-dependent regulation of KDR and synergism with fibroblast growth factor-2*. *Cell Signal.* **20**, 569-579.
- ISHIBASHI K, MIYAMOTO K, TAKETANI Y, MORITA K, TAKEDA E, SASAKI S and IMAI I. (1998) *Molecular cloning of a second human stanniocalcin homologue (STC2)*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **250** 252–258.
- ISHIBASHI K and IMAI M. (2002) *Prospect of a stanniocalcin endocrine/paracrine system in mammals*. *Am J Physiol Renal Physiol* **282**: F367-75
- ITO D, WALKER JR, THOMPSON CS, MOROZ I, LIN W, VESELITS ML, HAKIM AM, FIENBERG AA and THINAKARAN G. (2004) *Characterization of stanniocalcin 2, a novel target of the mammalian unfolded protein response with cytoprotective properties*. *Mol.Cell Biol.* **24**, 9456-9469.
- IVERSEN PO, SORENSEN DR and BENESTAD HB. (2002) *Inhibitors of angiogenesis selectively reduce the malignant cell load in rodent models of human myeloid leukemias*. *Leukemia*. Mar;16(3):376-81.
- IWAWAKI T, AKAI R, YAMANAKA S and KOHNO K. (2009) *Function of IRE1 alpha in the placenta is essential for placental development and embryonic viability*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*. **106**(39):16657-62
- JAMES K, SEITELBACH M, MCCUDDEN CR and WAGNER GF. (2005) *Evidence for stanniocalcin binding activity in mammalian blood and glomerular filtrate*. *Kidney Int.* **67**, 477-482.

- JELLINEK DA, CHANG AC, LARSEN MR, WANG X, ROBINSON PJ and REDDEL RR. (2000) *Stanniocalcin 1 and 2 are secreted as phosphoproteins from human fibrosarcoma cells*. *Biochem J.* **350** Pt 2:453-461.
- JENSEN PO, MORTENSEN BT, HODGKISS RJ, IVERSEN PO, CHRISTENSEN IJ, HELLEDIE N and LARSEN JK. (2000) *Increased cellular hypoxia and reduced proliferation of both normal and leukaemic cells during progression of acute myeloid leukaemia in rats*. *Cell Prolif.* **33**, 381–395.
- JIANG WQ, CHANG AC, SATOH M, FURUICHI Y, TAM PP, REDDEL RR. (2000) *The distribution of stanniocalcin 1 protein in fetal mouse tissues suggests a role in bone and muscle development*. *J Endocrinol* **165**:457-466.
- JOHNSTON J, RAMOS-VALDES Y, STANTON LA, LADHANI S, BEIER F and DIMATTIA GE. (2010) *Human stanniocalcin-1 or -2 expressed in mice reduces bone size and severely inhibits cranial intramembranous bone growth*. *Trangenic Res.* 19(6):1017-39
- KAHN J, MEHRABAN F, INGLE G, XIN X, BRYANT JE, VEHAR G, SCHOENFELD J, GRIMALDI CJ, PEALE F, DRAKSHARAPU A, LEWIN DA and GERRITSEN ME. (2000) *Gene expression profiling in an in vitro model of angiogenesis*. *Am J Pathol.* 156(6):1887-900.
- KELLY KF and DANIEL JM. (2006) *POZ for effect--POZ-ZF transcription factors in cancer and development*. *Trends Cell Biol* **16**, 578-587.
- KLEIN D, DEMORY A, PEYRE F, KROLL J, GÉRAUD C, OHNESORGE N, SCHLEDZEWSKI K, ARNOLD B and GOERDT S. (2009) *Wnt2 acts as an angiogenic growth factor for non-sinusoidal endothelial cells and inhibits expression of stanniocalcin-1*. *Angiogenesis.*12(3):251-65.
- KLOPFLEISCH R and GRUBER AD. (2009) *Derlin-1 and stanniocalcin-1 are differentially regulated in metastasizing canine mammary adenocarcinomas*. *J Comp Pathol.*141(2-3):113-20.
- KOIDE Y and SASAKI T. (2006) *Stanniocalcin-1 (STC-1) as a molecular marker for human cancer*. *Rinsho Byori.*54(3):213-20.
- KOIZUMI K, HOSHIAI M, ISHIDA H, OHYAMA K, SUGIYAMA H, NAITO A, TODA T, NAKAZAWA H and NAKAZAWA S. (2007) *Stanniocalcin 1 prevents cytosolic Ca²⁺ overload and cell hypercontracture in cardiomyocytes*. *Circ.J.* **71**, 796-801.
- KONOPLEVA M, TABE Y, ZENG Z and ANDREEFF. (2009) *Therapeutic targeting of microenvironmental interactions in leukemia: mechanisms and approaches*. *M. Drug Resist Updat.*;12(4-5):103-13.
- KRIEGHOFF-HENNING E and HOFMANN TG. (2008) *Role of nuclear bodies in apoptosis signalling*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1783**, 2185 –2194
- KROETZ, MB and HOCHSTRASSER M. (2009) *Identification of SUMO-interacting proteins by yeast two-hybrid analysis*. In:Ulrich H.D,editor.SUMO protocols. Human Press. pp. 107-120.
- KUMARAN RI, MURALIKRISHNA B and PARNAIK VK. (2002) *Lamin A/C speckles mediate spatial organization of splicing factor compartments and RNA polymerase II transcription*. *J.Cell Biol.* **159**, 783-793.
- KUMARAN RI, THAKAR R and SPECTOR DL. (2008) *Chromatin dynamics and gene positioning*. *Cell* **132**, 929-934.
- LAFEBER FP, SCHAEFER HI, HERRMANN-ERLEE MP and WENDELAAR BONGA SE. (1986) *Parathyroid hormone-like effects of rainbow trout Stannius products on bone resorption of embryonic mouse calvaria in vitro*. *Endocrinology* **119**: 2249-2255
- LAFEBER FP, FLIK G, WENDELAAR BONGA SE and PERRY SF. (1988) *Hypocalcin from Stannius corpuscles inhibits gill calcium uptake in trout*. *Am J Physiol* **254**,R891-R896.
- LAI KP, LAW AY, YEUNG HY, LEE LS, WAGNER GF and WONG CK. (2007) *Induction of stanniocalcin-1 expression in apoptotic human nasopharyngeal cancer cells by p53*. *Biochem Biophys Res Commun.* 356(4):968-75.

- LAL A, PETERS H, ST CROIX B, HAROON ZA, DEWHIRST MW, STRAUSBERG RL, KAANDERS JH, VAN DER KOGEL AJ and RIGGINS GJ. (2001) *Transcriptional response to hypoxia in human tumors*. J Natl Cancer Inst. 93(17):1337-43.
- LALLEMAND-BREITENBACH V, ZHU J, PUVION F, KOKEN M, HONORE N, DOUBEIKOVSKY A, DUPREZ E, PANDOLFI PP, PUVION E, FREEMONT P and DE THE H. (2001) *Role of promyelocytic leukemia (PML) SUMOylation in nuclear body formation, 11S proteasome recruitment, and As2O3-induced PML or PML/retinoic acid receptor alpha degradation*. J.Exp.Med, **193**, 1361-1371.
- LARANJEIRA ABA E YUNES JA. (2007) *O estroma da medula óssea e a sua influência na expressão de genes de resistência e sensibilidade a quimioterápicos na leucemia linfóide aguda (LLA) pediátrica*. Dissertação de Tese de Mestrado . Ficha Catalográfica L32e – Biblioteca do Instituto de Biologia – UNICAMP
- LAW AY, LAI KP, LUI WC, WAN HT and WONG CK. (2008) *Histone deacetylase inhibitor-induced cellular apoptosis involves stanniocalcin-1 activation*. Exp.Cell Res. **314**, 2975-2984.
- LEE EJ, HYUN SH, CHUN J, SHIN SH, LEE KE, PARK IS and KANG SS. (2007) *Regulation of Nek6 Functions by Its SUMOylation on the K²⁵² Residue*. Integrative Biosciences **11**: 205-213
- LEMO TA, PASSOS DO, NERY FC and KOBARG J. (2003) *Characterization of a new family of proteins that interact with the C-terminal region of the chromatin-remodeling factor CHD-3*. FEBS Lett. 533(1-3):14-20.
- LIU G, YANG G, CHANG B, MERCADO-URIBE I, HUANG M, ZHENG J, BAST RC, LIN SH and LIU J. (2010) *Stanniocalcin 1 and ovarian tumorigenesis*. J Natl Cancer Inst. 2;102(11):812-27.
- LIU X, HE Z, ZHOU M, YANG F, LV H, YU Y and CHEN Z. (2007) *Purification and characterization of recombinant extracellular domain of human HER2 from Escherichia coli*. Protein Expr Purif. 53(2):247-54.
- LOMAX J. (2005) *Get ready to GO! A biologist's guide to the Gene Ontology*. Brief.Bioinform. **6**, 298-304.
- LORETZ CA, POLLINA C, HYODO S and TAKEI Y. (2009) *Extracellular calcium-sensing receptor distribution in osmoregulatory and endocrine tissues of the tilapia*. Gen Comp Endocrinol. 161(2):216-28.
- LUO CW, KAWAMURA K, KLEIN C and HSUEH AJ. (2004) *Paracrineregulation of ovarian granulosa cell differentiation by stanniocalcin (STC) 1: mediation through specific STC1 receptors*. Mol Endocrinol. 18(8), 2085–2096.
- MADSEN KL, TAVERNINI MM, YACHIMEC C, MENDRICK DL, ALFONSO PJ, BUERGIN M, OLSEN HS, ANTONACCIO MJ, THOMSON AB and FEDORAK RN. (1998) *Stanniocalcin: a novel protein regulating calcium and phosphate transport across mammalian intestine*. Am J Physiol **274**:G96-102.
- MALHOTRA JD and KAUFMAN RJ. (2007) *The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response*. Semin.Cell Dev.Biol. **18**, 716-731.
- McCALLUM SA, BAZAN JF, MERCHANT M, YIN J, PAN B, DE SAUVAGE FJ and FAIRBROTHER WJ. (2006) *Structure of SAP18: a ubiquitin fold in histone deacetylase complex assembly*. Biochemistry **45**, 11974-11982.
- McCUDDEN CR, KOGON MR, DIMATTIA GE and WAGNER GF. (2001) *Novel expression of the stanniocalcin gene in fish*. J Endocrinol **171**: 33-44
- McCUDDEN CR, JAMES KA, HASILO C and WAGNER GF. (2002) *Characterization of mammalian stanniocalcin receptors. Mitochondrial targeting of ligand and receptor for regulation of cellular metabolism*. J Biol Chem **277**, 45249-45258.
- McCUDDEN CR, MAJEWSKI A, CHAKRABARTI S and WAGNER GF. (2004) *Co-localization of stanniocalcin-1 ligand and receptor in human breast carcinomas*. Molecular and Cellular Endocrinology **213**, 167–172

- MORTENSEN BT, JENSEN PO, HELLEDIE N, IVERSEN PO, RALFKIAER E, LARSEN JK, and MADSEN MT. (1998) *Changing bone marrow micro-environment during development of acute myeloid leukaemia in rats*. Br. J. Haematol. **102**, 458–464.
- NAKAGAWA T, MARTINEZ SR, GOTO Y, KOYANAGI K, KITAGO M, SHINGAI T, ELASHOFF DA, YE X, SINGER FR, GIULIANO AE and HOON DS. (2007) *Detection of circulating tumor cells in early-stage breast cancer metastasis to axillary lymph nodes*. Clin Cancer Res. 13(**14**):4105-10
- NAKAI K and HORTON P. (1999) *PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization*. Trends Biochem.Sci. **24**, 34-36.
- NERY FC, PASSOS DO, GARCIA VS, and KOBARG J. (2004) *Ki-1/57 interacts with RACK1 and is a substrate for the phosphorylation by phorbol 12-myristate 13-acetate-activated protein kinase C*. J Biol Chem., 279(**12**):11444-55
- OH SM, LIU Z, OKADA M, JANG SW, LIU X, CHAN CB, LUO H and YE K. (2010) *Ebp1 SUMOylation, regulated by TLS/FUS E3 ligase, is required for its anti-proliferative activity*. Oncogene. **29**(7):1017-30.
- OH-HASHI K, NARUSE Y, AMAYA F, SHIMOSATO G and TANAKA M. (2003) *Cloning and characterization of a novel GRP78-binding protein in the rat brain*. J.Biol.Chem. **278**, 10531 10537.
- OLSEN HS, CEPEDA MA, ZHANG QQ, ROSEN CA and VOZZOLO BL. (1996) *Human stanniocalcin: a possible hormonal regulator of mineral metabolism*. Proc Natl Acad Sci USA **93**:1792–6.
- O'REGAN L, BLOT J AND FRY AM. (2007) *Mitotic regulation by NIMA-related kinases*. Cell Div. **29**;2:25
- PACIGA M, WATSON AJ, DIMATTIA GE and WAGNER GF. (2002) *Ovarian stanniocalcin is structurally unique in mammals and its production and release are regulated through the luteinizing hormone receptor*. Endocrinology **143**, 3925-3934.
- PACIGA M, MCCUDDEN CR, LONDOS C, DIMATTIA GE and WAGNER GF. (2003) *Targeting of big stanniocalcin and its receptor to lipid storage droplets of ovarian steroidogenic cells*. J Biol Chem **278**, 49549-49554
- PACIGA M, HIRVI ER, JAMES K and WAGNER GF. (2005) *Characterization of big stanniocalcin variants in mammalian adipocytes and adrenocortical cells*. Am J Physiol Endocrinol Metab, **289**, E197-E205.
- PARMAR K, MAUCH P, VERGILIO, JA, SACKSTEIN R, DOWN JD. (2007) *Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **104**, 5431–5436.
- PASQUALINI R, KOIVUNEN E, KAIN R, LAHDENRANTA J, SAKAMOTO M, STRYHN A, ASHMUN RA, SHAPIRO LH, ARAP W and RUOSLAHTI E. (2000) *Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis*. Cancer Res., **60**, 722-727.
- PAULITSCHKE V, KUNSTFELD R, MOHR T, SLANY A, MICKSCHE M, DRACH J, ZIELINSKI C, PEHAMBERGER H and GERNER C. (2009) *Entering a new era of rational biomarker discovery for early detection of melanoma metastases: secretome analysis of associated stroma cells*. J Proteome Res. 8(**5**):2501-10.
- PEREZ-ATAYDE AR, SALLAN SE, TEDROW U, CONNORS S, ALFRED E and FOLKMAN J. (1997) *Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia*. Am. J. Pathol. 150(**3**), 815-821.
- PULE MA, GULLMANN C, DENNIS D, MCMAHON C, JEFFERS M and SMITH OP. (2002) *Increased angiogenesis in bone marrow of children with acute lymphoblastic leukaemia has no prognostic significance*. J Haematol. Sep 118 (**4**):991-8.
- RABERGER J, SCHEBESTA A, SAKAGUCHI S, BOUCHERON N, BLOMBERG KE, BERGLOF A, KOLBE T, SMITH CI, RULICKE T and ELLMEIER W. (2008) *The transcriptional regulator PLZF induces the development of CD44 high memory phenotype T cells*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **105**, 17919-17924.

- RADMAN DP, McCUDDEN C, JAMES K, NEMETH EM and WAGNER GF. *Evidence for calcium-sensing receptor mediated stanniocalcin secretion in fish* (2002) *Mol Cell Endocrinol.* 15;186(1):111-9.
- RE RN and COOK JL. (2010) *The mitochondrial component of intracrine action.* *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 299(3):H577-83
- RIOS E. (2006) *Calcium signalling in muscle: a milestone for modulation studies.* *J.Physiol,* **572**,1-2.
- ROCH GJ and SHERWOOD NM. (2010) *Genomics reveal ancient forms of stanniocalcin in amphioxus and tunicate.* *Integr Comp Biol.* 50(1):86-97.
- ROSCIC A, MÖLLER A, CALZADO MA, RENNER F, WIMMER VC, GRESKO E, LÜDI KS and SCHMITZ ML. (2006) *Phosphorylation-dependent control of Pc2 SUMO E3 ligase activity by its substrate protein HIPK2.* *Mol Cell.* 6;24(1):77-89.
- ROUX PP and BLENIS J. (2004) ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **68**, 320-344.
- SAMBROOK, J, FRITSCH EF and MANIATIS T. (1989) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, 2nd Edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, NewYork.
- SANTOS MT, TRINDADE DM, GONÇALVES K de A, BRESSAN GC, ANASTASSOPOULOS F, YUNES JA and KOBARG J. *Human stanniocalcin-1 interacts with nuclear and cytoplasmic proteins and acts as a SUMO E3 ligase.* *Mol Biosyst.* 7(1):180-93.
- SAZONOVA O, JAMES KA, McCUDDEN RC, SEGAL D, TALEBIAN A and WAGNER GF. (2008) *Stanniocalcin-1 secretion and receptor regulation in kidney cells.* *Am J Physiol Renal Physiol* **294**, F788–F794
- SCHNEIDER P, VASSE M, SBAA-KETATA E, LENORMAND B, HONG L, SORIA C and VANNIER JP. (2001) *The growth of highly proliferative acute lymphoblastic leukemia may be independent of stroma and/or angiogenesis.* *Leukemia Jul;15(7):1143-5*
- SERLACHIUS M, ALITALO R, OLSEN HS and ANDERSSON LC. (2002) *Expression of stanniocalcin-1 in megakaryocytes and platelets.* *Br.J.Haematol.* **119**, 359-363.
- SERLACHIUS M and ANDERSSON LC. (2004) *Upregulated expression of stanniocalcin-1 during adipogenesis.* *Exp Cell Res* **296**:256-264.
- SERLACHIUS M. (2007) *Stanniocalcin-1 in cell stress and differentiation.* Helsinki University Biomedical Dissertations No. 97. ISBN 978-952-10-4198-3.
- SHARMA NK, DAS SK, MONDAL AK, HACKNEY OG, CHU WS, KERN PA, RASOULI N, SPENCER HJ, YAO-BORENGASSER A and ELBEIN SC. (2008) *Endoplasmic reticulum stress markers are associated with obesity in nondiabetic subjects.* *J Clin Endocrinol Metab.*93(11):4532-41.
- SHEIKH-HAMAD D, ROUSE D and YANG Y. (2000) Regulation of stanniocalcin in MDCK cells by hypertonicity and extracellular calcium. *Am.J.Physiol Renal Physiol,* **278**, F417-F424
- SHEIKH-HAMAD D, BICK R, WU GY, CHRISTENSEN BM, RAZEGHI P, POINDEXTER B, TAEGTMEYER H, WAMSLEY A, PADDA R, ENTMAN M, NIELSEN S and YOUKER K. (2003) *Stanniocalcin-1 is a naturally occurring L-channel inhibitor in cardiomyocytes: relevance to human heart failure.* *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol.,* **285**, H442-H448
- SHEIKH-HAMAD D. (2010) *Mammalian stanniocalcin-1 activates mitochondrial antioxidant pathways: new paradigms for regulation of macrophages and endothelium.* *Am J Physiol Renal Physiol.* (2):F248-54.
- SHEN TH, LIN HK, SCAGLIONI PP, YUNG TM and PANDOLFI PP. (2006) *The mechanisms of PML-nuclear body formation.* *Mol Cell.,* **3**:331-9.
- SINNETT D, LABUDA D, KRAJINOVIC M. (2006) *Challenges identifying genetic determinants of pediatric cancers – the childhood leukemia experience.* *Familial Cancer,* **5**: 35-47.

- SISON EA and BROWN P. (2011) *The bone marrow microenvironment and leukemia: biology and therapeutic targeting*. Expert Rev Hematol. Jun;4(3):271-83
- STANNIUS H. (1839) *Nebennieren bei Knochenfischen*. Arch Anat Physiol **6**: 97-101
- STERNSDORF T, JENSEN K, REICH B and WILL H. (1999) *The nuclear dot protein SP100, characterization of domains necessary for dimerization, subcellular localization, and modification by small ubiquitin-like modifiers*. J Biol Chem. 30;274(18):12555-66.
- SULLIVAN AK. (1998) *Classificação, patogênese e etiologia das doenças neoplásicas do sistema hematopoético*. In: Lee GR et al. *Wintrobe Hematologia clínica*. São Paulo: Manole; . p. 1897-970.
- SUNDELL K, BJÖRNSSON BT, ITOH H and KAWAUCHI H. (1992) *Chum salmon (Oncorhynchus keta) stanniocalcin inhibits in vitro intestinal calcium uptake in Atlantic cod (Gadus morhua)*. J Comp Physiol [B] **162**: 489-495
- SYLVIUS N, BILINSKA ZT, VEINOT JP, FIDZIANSKA A, BOLONGO PM, POON S, MCKEOWN P, DAVIES RA, CHAN KL, TANG AS, DYACK S, GRZYBOWSKI J, RUZYLLLO W, MCBRIDE H and TESSON F. (2005) *In vivo and in vitro examination of the functional significances of novel lamin gene mutations in heart failure patients*. J.Med.Genet. **42**, 639-647.
- SYLVIUS N, HATHAWAY A, BOUDREAU E, GUPTA P, LABIB S, BOLONGO PM, RIPPSTEIN P, MCBRIDE H, BILINSKA ZT and TESSON F. (2008) *Specific contribution of lamin A and lamin C in the development of laminopathies*. Exp.Cell Res. **314**, 2362-2375.
- TAKAHASHI Y, LALLEMAND-BREITENBACH V, ZHU J and DE THE H. (2004) *PML nuclear bodies and apoptosis*. Oncogene, **23**, 2819-2824.
- TAMURA S, OSHIMA T, YOSHIHARA K, KANAZAWA A, YAMADA T, INAGAKI D, SATO T, YAMAMOTO N, SHIOZAWA M, MORINAGA S, AKAIKE M, KUNISAKI C, TANAKA K, MASUDA M and IMADA T. (2011) *Clinical significance of STC1 gene expression in patients with colorectal cancer*. Anticancer Res. **31(1)**:325-9.
- TANEGA C, RADMAN DP, FLOWERS B, STERBA T and WAGNER GF. (2004) *Evidence for stanniocalcin and a related receptor in annelids*. Peptides **25**, 1671–1679
- TEUFEL A, MALIK N, MUKHOPADHYAY M and WESTPHAL H. (2002) *Frcp1 and Frcp2, two novel fibronectin type III repeat containing genes*. Gene, 297(1-2):79-83.
- TOHMIYA Y, KOIDE Y, FUJIMAKI S, HARIGAE H, FUNATO T, KAKU M, ISHII T, MUNAKATA Y, KAMEOKA J and SASAKI T. (2004) *Stanniocalcin-1 as a novel marker to detect minimal residual disease of human leukemia*. Tohoku J Exp Med. 204(2):125-33.
- TREMBLAY G, BERNIER-DODIER P, DELBECCHI L, WAGNER GF, TALBOT BG and LACASSE P. (2009) *Local control of mammary involution: is stanniocalcin-1 involved?* J Dairy Sci. 92(5):1998 2006.
- TRINDADE DM, SILVA JC, NAVARRO MS, TORRIANI IC and KOBARG J. (2009) *Low resolution structural studies on human Stanniocalcin-1*. BMC Struct Biol.2009 Aug **27**;9:57
- VAN DAMME E, LAUKENS K, DANG TH and VAN OSTADE X. (2010) *A manually curated network of the PML nuclear body interactome reveals an important role for PML-NBs in SUMOylation dynamics*. Int J Biol Sci. 12;6(1):51-67.
- VARGHESE R, WONG CK, DEOL H, WAGNER GF and DIMATTIA GE. (1998) *Comparative analysis of mammalian stanniocalcin genes*. Endocrinology **139**, 4714-4725.7
- VINCENT S (1898) *The effects of extirpation of the suprarenal bodies of the eel (Anguilla anguilla)*. Proc Roy Soc London **62**: 354-356
- WAGNER GF, DIMATTIA GE, DAVIE JR, COPP DH and FRIESEN HG. (1992) *Molecular cloning and cDNA sequence analysis of coho salmon stanniocalcin*. Molecular and Cellular Biology **90** 7–15

- WAGNER GF, VOZZOLO BL, JAWORSKI E, HADDAD M, KLINE RL, OLSEN HS, ROSEN CA, DAVIDSON MB and RENFRO JL. (1997) *Human stanniocalcin inhibits renal phosphate excretion in the rat*. J Bone Miner Res., **12**:165-171.
- WAGNER GF, JAWORSKI EM and HADDAD M. (1998) *Stanniocalcin in the seawater salmon: structure, function, and regulation*. Am J Physiol **274**: R1177-85
- WAGNER GF and DIMATTIA GE. (2006) The stanniocalcin family of proteins, J. Exp. Zool. A Comp. Exp. Biol., **305**(9), 769–780.
- WANG Y, LI T, QIU X, MO X, ZHANG Y, SONG Q, MA D and HAN W. (2008) *CMTM3 can affect the transcription activity of androgen receptor and inhibit the expression level of PSA in LNCaP cells*. Biochem.Biophys.Res.Comm., **371**, 54-58.
- WARY KK, THAKKER GD, HUMTSOE JO and YANG J. (2003) *Analysis of VEGF-responsive genes involved in the activation of endothelial cells*. Mol.Cancer, **2**, 25
- WASCHER RA, HUYNH KT, GIULIANO AE, HANSEN NM, SINGER FR, ELASHOFF D and HOON DS. (2003) *Stanniocalcin-1: a novel molecular blood and bone marrow marker for human breast cancer*. Clin.Cancer Res. **9**, 1427-1435.
- WATANABE T, ICHIHARA M, HASHIMOTO M, SHIMONO K, SHIMOYAMA Y, NAGASAKA T, MURAKUMO Y, MURAKAMI H, SUGIURA H, IWATA H, ISHIGURO N and TAKAHASHI M. (2002) *Characterization of gene expression induced by RET with MEN2A or MEN2B mutation*. Am J Pathol.**161**(1):249-56.
- WEIDTKAMP-PETERS S, LENSER T, NEGOREV D, GERSTNER N, HOFMANN TG, SCHWANITZ G, HOISCHEN C, MAUL G, DITTRICH P and HEMMERICH P. (2008) *Dynamics of component exchange at PML nuclear bodies*. J Cell Sci., **15;121** (Pt 16):2731-43.
- WELLMANN S, GUSCHMANN M, GRIETHE W, ECKERT C, VON STACKELBERG A and LOTTAZ C. (2004) *Activation of the HIF pathway in childhood ALL, prognostic implications of VEGF*. Leukemia **18**, 926–933.
- WESTBERG JA, JIANG J and ANDERSSON LC. (2011) *Stanniocalcin 1 binds heme through a partially conserved heme regulatory motif*. Biochem Biophys Res Commun. **3;409**(2):266-9.
- WORTHINGTON RA, BROWN L, JELLINEK D, CHANG AC, REDDEL RR, HAMBLY BD and BARDEN JA. (1999) *Expression and localisation of stanniocalcin 1 in rat bladder, kidney and ovary*. Electrophoresis **20**, 2071-2076.
- XUE Y, ZHOU F, FU C, XU Y and YAO X. (2006) *SUMOsp: a web server for SUMOylation site prediction*. Nucleic Acids Res. **1;34** W254-7.
- YANG SH, GALANIS A, WITTY J and SHARROCKS AD. (2006) *An extended consensus motif enhances the specificity of substrate modification by SUMO*. The EMBO Journal. **25**, 5083 - 5093
- YEUNG HY, LAI KP, CHAN HY, MAK NK, WAGNER GF and WONG CK. (2005) *Hypoxia-inducible factor-1-mediated activation of stanniocalcin-1 in human cancer cells*. Endocrinology. **146**(11):4951-60.
- YOSHIKO Y, MAEDA N and AUBIN JE. (2003) *Stanniocalcin 1 stimulates osteoblast differentiation in rat calvaria cell cultures*. Endocrinology **144**:4134-4143.
- YOSHIKO Y and AUBIN JE. (2004) *Stanniocalcin 1 as a pleiotropic factor in mammals*. Peptides. **(10)**,1663-9
- ZHANG KZ, WESTBERG JA, PAETAU A, VON BOGUSLAWSKY K, LINDSBERG P, ERLANDER M, GUO H, SU J, OLSEN HS and ANDERSSON LC. (1998) *High expression of stanniocalcin in differentiated brain neurons*. American Journal of Pathology **153** 439–445.
- ZHANG Y, IRATNI R, ERDJUMENT-BROMAGE H, TEMPST P and REINBERG D. (1997) *Histone deacetylases and SAP18, a novel polypeptide, are components of a human Sin3 complex*. Cell, **89**(3):357-64.

ZHONG J, WANG Y, QIU X, MO X, LIU Y, LI T, SONG Q, MA D and HAN W. (2006) *Characterization and expression profile of CMTM3/CKLFSF3*. J.Biochem.Mol.Biol **39**, 537-545.

ZIMBER A, NGUYEN QD and GESPACH C. (2004) *Nuclear bodies and compartments: functional roles and cellular signalling in health and disease*. Cell Signal. **16**, 1085-1104.

ZLOT C, INGLE G, HONGO J, YANG S, SHENG Z, SCHWALL R, PAONI N, WANG F, PEALE FV JR and GERRITSEN ME. (2003) *Stanniocalcin 1 is an autocrine modulator of endothelial angiogenic responses to hepatocyte growth factor*. J Biol Chem. ;278(**48**):47654-9.

Patentes

JP/2000/002709

KOIDE YOSHIO (JP); IGARASHI AKIRA (JP); KO TAKEKUNI (JP); SASAKI TAKESHI (JP).

LEUKEMIA DETECTING METHOD AND DETECTION KIT. **07.01.2000**

JP19980181503. IPC: C12N15/02; C12P21/08; G01N33/53; G01N33/68; (IPC1-7): C12N15/02; C12P21/08; G01N33/53; G01N33/68

US/2005/014208

KREHAN ALF-ANDREAS [DE]; STEFFENS PIA [DE]; WASCHUETZA STEFANIE [DE]

METHOD AND KIT FOR DIAGNOSING OR CONTROLLING THE TREATMENT OF BREAST CANCER. **20.01.2005**

DE20011043776. IPC: C07K16/30; G01N33/543; G01N33/569; G01N33/574; (IPC1-7): C12M1/34

WO/2011/060244

PROCKOP, Darwin, J.; (US). BARTOSH, Thomas, W., Jr.; (US). YLOSTALO, Joni; (US).

SPHEROIDAL AGGREGATES OF MESENCHYMAL STEM CELLS. **19.05.2011**

PCT/US2010/056502. IPC: C12N 5/071 (2010.01)

WO/2010/072348

BEHRENS, Joyce; (DE).

BIOMARKERS FOR INHIBITORS WITH ANTI-ANGIOGENIC ACTIVITY. **01.07.2010**

PCT/EP2009/008929. IPC: G01N 33/574 (2006.01)

WO/2008/122936

MEIJER, Gerrit, A.; (NL). PINTO MORAIS DE CARVALHO, Beatriz; (NL).

METHODS AND TOOLS FOR DISCRIMINATING COLORECTAL ADENOMAS AND ADENOCARCINOMAS. **16.10.2008**

PCT/IB2008/051248. IPC: G01N 33/574 (2006.01)

WO/2006/031843

HOON, Dave, S., B.; (US).

DETECTION OF CANCER CELLS IN BODY FLUIDS. **23.03.2006**

PCT/US2005/032631. IPC: C12Q 1/68 (2006.01), C07H 21/04 (2006.01), C12P 19/34 (2006.01)

WO/2005/059179

KASPER, James; (US). PAULOSKI, Nicole; (US). TAYLOR, Ian; (US). ELTING, James; (US). SARR, Ti; (US).

METHODS FOR PREDICTION AND PROGNOSIS OF CANCER, AND MONITORING CANCER THERAPY. **30.06.2005**

PCT/US2004/041882. IPC: C12Q 1/68 (2006.01)

WO/2004/045521

HOON DAVE S B (US) . TAKEUCHI HIROYA (US)

DETECTION OF MICRO METASTASIS OF MELANOMA AND BREAST CANCER IN PARAFFIN-EMBEDDED TUMOR DRAINING LYMPH NODES BY MULTIMAKER QUANTITATIVE RT-PCR. **03.06.2004**

US20020426216P. IPC: C12P19/34; C12Q1/68; G01N33/53; (IPC1-7): A61K

WO/2003/03023059

ALBERT WINFRIED [DE]; STEFFENS PIA [DE]; STEFAN MONICA [DE]; WASCHUETZA STEFANIE [DE]

METHOD AND KIT FOR THE DIAGNOSIS OR TREATMENT CONTROL OF INTESTINAL CARCINOMA. **20.03.2003**

DE20011043775. IPC: B01L3/00; C12Q1/68; (IPC1-7): C12Q1/68

Artigo

**Human stanniocalcin-1
interacts with nuclear
and cytoplasmic proteins
and acts as a SUMO E3 ligase**

Marcos Tadeu dos Santos, Daniel M. Trindade, Kaliandra de A. Gonçalves,
Gustavo C. Bressan, Filipe Anastassopoulos, José A. Yunes and Jörg Kobarg

Molecular BioSystems, 2011, 7, 180–193

Human stanniocalcin-1 interacts with nuclear and cytoplasmic proteins and acts as a SUMO E3 ligase[†]

Marcos Tadeu dos Santos,^{‡,ab} Daniel Maragno Trindade,^{‡,a}
Kaliandra de Almeida Gonçalves,^{ac} Gustavo Costa Bressan,^d
Filipe Anastassopoulos,^a José Andres Yunes^e and Jörg Kobarg^{*abc}

Received 8th July 2010, Accepted 4th October 2010

DOI: 10.1039/c0mb00088d

Human stanniocalcin-1 (STC1) is a glycoprotein that has been implicated in different physiological processes, including angiogenesis, apoptosis and carcinogenesis. Here we identified STC1 as a putative molecular marker for the leukemic bone marrow microenvironment and identified new interacting protein partners for STC1. Seven selected interactions retrieved from yeast two-hybrid screens were confirmed by GST-pull down assays *in vitro*. The N-terminal region was mapped to be the region that mediates the interaction with cytoplasmic, mitochondrial and nuclear proteins. STC1 interacts with SUMO-1 and several proteins that have been shown to be SUMOylated and localized to SUMOylation related nuclear bodies. Although STC1 interacts with SUMO-1 and has a high theoretical prediction score for a SUMOylation site, endogenous co-immunoprecipitation and *in vitro* SUMOylation assays with the purified recombinant protein could not detect STC1 SUMOylation. However, when we tested STC1 for SUMO E3 ligase activity, we found in an *in vitro* assay, that it significantly increases the SUMOylation of two other proteins. Confocal microscopic subcellular localization studies using both transfected cells and specific antibodies for endogenous STC1 revealed a cytoplasmic and nuclear deposition, the latter in the form of some specific dot-like substructure resembling SUMOylation related nuclear bodies. Together, these findings suggest a new role for STC1 in SUMOylation pathways, in nuclear bodies.

Introduction

Triggering of angiogenesis is a fundamental process to tumor–host interaction and essential for cancer progression.¹

Solid tumors, as well as leukemias, benefit from this new vascularization by obtaining oxygen, nutrients, growth factors and survival signals. Some angiogenesis inhibitors showed effective anti-leukemia activity in animal models of human leukemia, indicating leukemia dependence on angiogenesis.² Leukemic cells are able to modulate their bone marrow (BM) microenvironment for their own benefit.³ Microarray analysis, carried out in order to characterize leukemia-modulated genes in BM endothelial cells (BMEC), by stimulation either with primary acute lymphoblastic leukemia (ALL) cells or with the patient's plasma, resulted in the identification of several activated genes. Here, in validating five of these potential BM micro-environmental markers by Quantitative Real-Time PCR (RQ-PCR) we found stanniocalcin-1 (STC1) as a significantly activated gene in BMEC after 6 hours stimulus with plasma of children with ALL.

STC1 is an endocrine hormone originally discovered in bony fishes and later identified in humans by mRNA differential display of genes related to cellular immortalization.⁴ Different from its role in fish, human STC1 seems to play a more complex role in numerous developmental, physiological, and pathological processes, including cancer, pregnancy, lactation, angiogenesis, organogenesis, cerebral ischemia,

^a Laboratório Nacional de Biotecnologia (LNBio), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Rua Giuseppe Máximo Scolfaro 10.000, C.P.6192, 13084-971 Campinas, SP, Brasil. E-mail: marcos.santos@lnbio.org.br, daniel.trindade@lnbio.org.br, kaliandra.goncalves@lnbio.org.br, filipaco82@gmail.com, jorg.kobarg@lnbio.org.br; Fax: +55 19-3512-1006; Tel: +55 19-3512-1125

^b Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970 Campinas, SP, Brasil

^c Departamento de Bioquímica-Programa de Pós-graduação em Biologia Funcional e Molecular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970 Campinas, SP, Brasil

^d Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. E-mail: gustavo.bressan@ufv.br

^e Centro Infantil Boldrini, Campinas, Brasil.

E-mail: andres@boldrini.org.br

[†] Electronic supplementary information (ESI) available: Phylogenetic analyses of putative SUMOylation sites of STC1 from 24 different species. See DOI: 10.1039/c0mb00088d

[‡] MTS and DMT contributed equally to this article.

and hypertonic stress.⁵ The precise role of STC1 in carcinogenesis is still unclear, and in particular, the involvement of cancer cells in the differential STC1 expression remains to be determined. STC1 mRNA was present in the bone marrow and blood of breast cancer patients, whereas no STC1 mRNA was evident in healthy volunteers,⁶ thereby suggesting STC1 as a potential novel marker for human breast cancer. Tumor vasculature may also be responsible for the increased expression of STC1,^{7,8} since VEGF induces STC1 expression.^{9,10} Further studies suggest that STC1 activates antioxidant pathways in endothelial cells and macrophages and displays cytoprotective and anti-inflammatory actions.¹¹

Albeit STC1 has been implicated in so many processes, neither its receptor nor any other interacting molecular partners have been reported to date. In fact its cellular localization is still dubious, since several reports related it to be localized to the cytoplasm, the mitochondria¹² and even the nucleus,¹³ although it is a secreted protein supposed to enter the secretory pathway of the cell.¹⁴ However secreted protein may be absorbed by other cells, possibly resulting in the uptake in cytoplasmic compartments. In view of the lack of information about molecular partners and specific STC1 function, we performed here yeast two hybrid screens in order to trace potential mechanisms underlying its activities in human cells.

Results

Validation of STC1 as a BM microenvironment molecular marker in ALL

Previous microarray data (Jose A. Yunes and Angelo A. Cardoso, unpublished data) showed around an eight-fold increase of STC1 mRNA in BMEC after treatment with ALL patients' plasma. We were able to confirm STC1 mRNA up-regulation during a co-culture of bone marrow stromal cells with leukemic blasts by Real Time Quantitative PCR (RQ-PCR, Table 1, see Materials and Methods for details) and found a similar increase (~7 fold) in stromal cells co-cultured with 3 different primary ALL cells after 24 hours of treatment. After only six hours of treatment STC1 mRNA level was however ~5.4 fold below its initial level (0 h) (Fig. 1).

Identification of STC1 interacting proteins by yeast two hybrid screenings

Before the yeast two-hybrid screening the construction of LexA-STC1ΔSPa (without the signal peptide) was tested for autonomous activation of reporter genes (*HIS3* and *LacZ*) and no auto-activation of reporters was found (not shown). This demonstrates that STC1 alone has no capacity to activate the reporters and to generate false positive clones. The identified interacting clones demonstrate a specific interaction with the STC1 protein. The absence of auto-activation of the bait construct is an absolute prerequisite for the successful performance of a yeast two-hybrid system library screen. We then employed the yeast two-hybrid system to screen human fetal brain, bone marrow and leukocyte cDNA libraries. LexA-STC1ΔSPa construct was used as bait, and a total of about 1.5×10^6 co-transformed clones in the three screenings were assayed for both reporters.

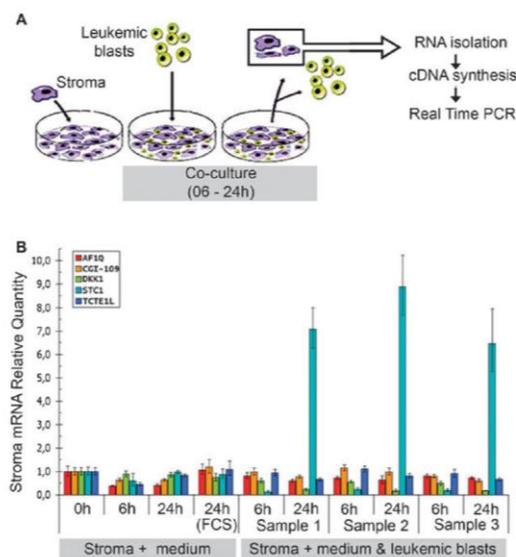


Fig. 1 Analysis of candidate gene expression by quantitative real time PCR (RQ-PCR). (A) Bone Marrow (BM) stromal cells were cultured until they reached confluency and were then subjected to a co-culture with primary B-precursor acute lymphoblastic leukemic cells obtained from different patients for the indicated periods of time. BM stromal cells were separated and processed for RNA extraction, cDNA synthesis and Real-time Quantitative PCR (RQ-PCR). (B) mRNA expression of different candidate genes in BM stromal cells either cultured in fresh media without fetal calf serum (FCS) during 6 hours and 24 hours (both with or without FCS), or stimulated by co-culture with primary leukemic blasts of three different ALL patient's (samples 1, 2 and 3) in fresh media without bovine fetal serum (BFS). The same samples of BM stromal cells before the co-cultivation (0 h) were used for calibration (set to 1.0). Bars indicate standard errors with 95% of confidence. DKK1 and STC1 presented initially a reduction in the expression levels, after 6 hours of co-culture. STC1 demonstrated then, after 24 hours, a great increase in its expression level, validating the microarray data and suggesting that STC1 may serve as tumor microenvironment marker.

An interaction map designed for STC1 interactions exhibits a complex network (Fig. 2). A total of 22 proteins were identified and their retrieved fragments, domain composition as well as their cellular locations according to GeneOntology¹⁵ are presented in Table 2.

Proteins were grouped according to their cellular compartment in seven groups, although some are present in more than one group: nuclear (LMNA, MAPK14, FUS, QRICH1, SAP18, SP100 and SUMO1), endoplasmic reticulum (ERN1, JSRP1, TMEM132A and FLJ20254), mitochondria (MTND1 and ALAS2), cytoplasm (ALDOA, FTL, MAPK14 and SUMO1), plasma membrane (ANPEP, CMTM3, DAGLB, FNDC4 and TMEM132A), extracellular/secreted (ELA2) and red blood cells (HBA1/2). Although QRICH1 and FLJ20254 had no GeneOntology information about their location we used the prediction of PSORT II program¹⁶ to infer their possible localization, and hence be able to group them, too.

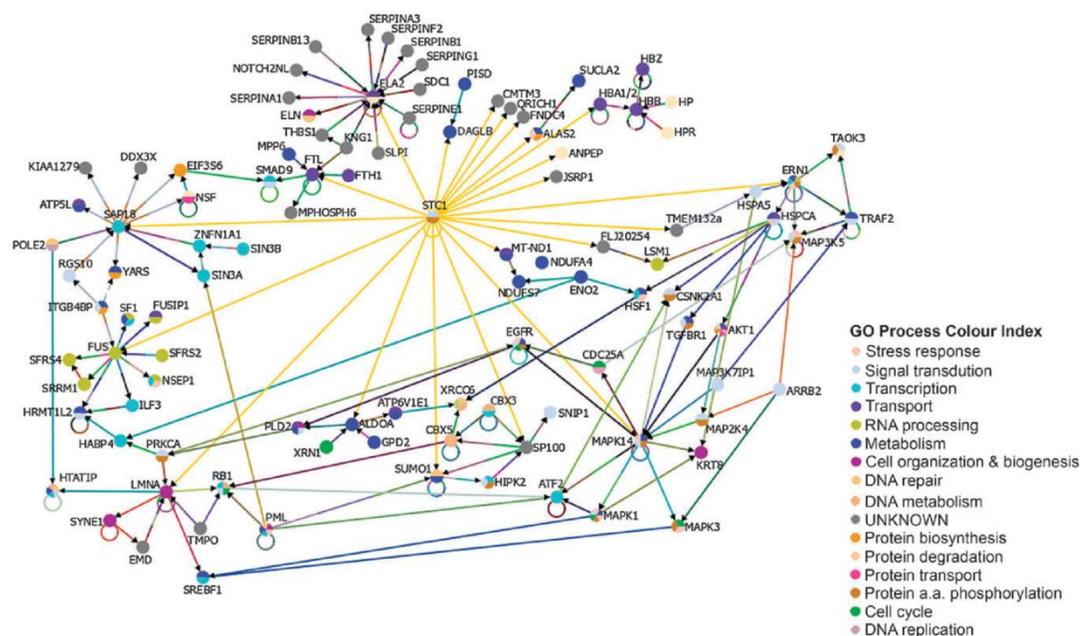


Fig. 2 Protein interaction map of human STC1. Yeast two hybrid screens of bone marrow, leukocyte and fetal brain cDNA libraries were performed. Diagram shows a simplified network of protein interactions found by yeast two hybrid screens (ZBTB16 has been omitted here since it may be a false positive). Lines indicate interactions and each color is indicative of published data about the interaction (the present work new findings are indicated by yellow links of STC1 to its preys). Each protein is represented by a different color code assigned by the Osprey program⁸² according to GeneOntology.

Confirmation of interactions by GST-pull down assays

In order to confirm interactions observed in the yeast two-hybrid screens we performed GST-pull down assays, using prey proteins, retrieved from the screenings, fused to a GST-tag and a His-tagged STC1 (STC1-HT) produced in insect cells.¹⁷ Starting with 22 clones, 18 cDNAs had cloning strategy frame, for direct transfer from pACT2 vector to GST-tag expression vector. From this 18, we could sub-clone 11 and, from those, only seven (presented in Fig. 3—SP100, FUS, JSRP1, SUMO1, TMEM132A, FDNC4-FIII and LMNA) expressed as soluble proteins. In the case of FNDC4 protein, primers were designed to amplify only the extracellular portion (mainly comprising its fibronectin type III

domain [FNIII]). Even using PMSF to inhibit proteases activity, some of the GST-tag proteins expressed showed some degradation in the expression conditions that we were able to establish for the soluble expression of these proteins. Recombinant STC1-HT have bound to all seven GST-tagged proteins but not to GST alone demonstrating the specificity of observed interactions (Fig. 3).

STC1 interacts with partners by its amino-terminus

We further generated two constructs of STC1 fused to LexA DNA binding domain splitting STC1 into approximately two halves (an amino and a carboxyl end construct, named LexA-N STC1ΔPSb and LexA-C STC1 respectively). The

Table 1 Primer sequences and concentrations used in the RQ-PCR

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Product size (bp)	Concentration in RQ-PCR reaction/nM
AF1Q-F	GGCCTGGGTCTGTCAGATACA	72	400
AF1Q-R	TGCTTGCCCGATCATTTTG		
CG1109-F	AGGGAGGAAGAAAATTGCCTTT	95	400
CG1109-R	TCCATAAACTGAACAGTGCAAGAATA		
DKK1-F	AGGAAGCGCCGAAAACG	88	400
DKK1-R	TTTGATCAGAAGACACATATTCCA		
STC1-F	TGAGGCGGAGCAGAATGACT	78	100
STC1-R	CAACGAACCACTTCAGCTGAGT		
TCTE1L-F	ATGCTGAGGAAGCCCACAAT	148	250
TCTE1L-R	TTATAGGCTTTCCCAACTTAACCA		
GAPDH-F	ATGGAAATCCCATCACCATCTT	68	400
GAPDH-R	CAGCATCGCCCACTTG		

Table 2 Proteins retrieved from yeast two hybrid screenings

cDNA library (no. of clones)	Official symbol (Entrez GeneID) ⁸⁷	Protein fragment	Domain(s) present	Component/compartment according to GeneOntology ¹⁵
BM (9)	FUS (2521)	381–526 (526)	ZnF RBZ	- Nucleus - Membrane
BM (8)	HBA1/2 (3039/3040)	1–142 (142)	G	- Cellular component unknown
BM (5)	JSRP1 (126306)	1–314 (331)		- Hemoglobin complex
BM (4)	FLJ20254 (54867)	601–689 (689)	DUF2359	- Undetermined
L (4)	SAP18 (10284)	81–153 (153)		- Undetermined
FB (1) & L (1)	MT-ND1 (4535)	9–60 (318)	NADHdh	- Histone deacetylase complex - Mitochondrial respiratory chain complex I
FB (2)	FNDC4 (64838)	15–234 (234)	FN3	- Integral mitochondrial inner membrane
L (2)	ERN1 (2081)	1–59 (977)	PQQ	- Integral to plasma membrane
L (2)	CMTM3 (123920)	34–182 (182)		- Integral to endoplasmic reticulum membrane - Extracellular space
L (2)	MAPK14 (1432)	1–38 (360)		- Integral to plasma membrane - Cytoplasm
L (2)	ANPEP (290)	875–967 (967)		- Nucleus - Spindle pole - Cytoplasm
BM (2)	ELA2 (1991)	190–267 (267)	Tryp SPc	- Integral to plasma membrane - ER-Golgi intermediate compartment
L (2)	SP100 (6672)	704–852 (879)	HMG, CC	- Cell surface - Extracellular region
BM (1)	LMNA (4000)	439–572 (572)	IF tail	- Nucleus
BM (1)	ALDOA (226)	89–364 (364)	FBP A1a	- Nuclear lamina intermediate filament
BM (1)	FTL (2512)	1–175 (175)		- Undetermined
BM (1)	ZBTB16 (7704)	55–176 (673)	BTP	- Ferritin complex - Nucleus
BM (1)	ALAS2 (212)	341–460 (587)	AAT I PLP	- Nuclear speckles - PML body
L (1)	QRICH1 (54870)	502–667 (776)		- Transcriptional repressor complex - Endoplasmic reticulum
L (1)	SUMO1 (7341)	1–101 (101)	UBQ	- Mitochondrial matrix - Integral to mitochondrial inner membrane
FB (1)	TMEM132A (54972)	808–932 (1024)	CC	- Intracellular - Cytoplasm
L (1)	DAGLB (221955)	613–668 (672)		- Membrane - Nucleus
				- Nuclear pore - Nuclear membrane
				- Nuclear speckles - Endoplasmic reticulum
				- Golgi apparatus - Integral to endoplasmic reticulum membrane
				- Integral to plasma membrane

BM: bone marrow; FB: fetal brain; L: leukocyte; AAT I PLP: aspartate aminotransferase superfamily (fold type I) of pyridoxal phosphate; BTP: bromodomain transcription factors and PHD domain containing proteins; CC: coiled coil; DUF2359: uncharacterized conserved protein; FBP A1a: fructose-1,6-bisphosphate aldolase Ia; FN3: fibronectin type III; G: globin; HMG: high mobility group; IF tail: intermediate filament tail; NADHdh: NADH dehydrogenase; PQQ: beta-propeller repeat occurring in enzymes with pyrrolo-quinoline quinone; Tryp SPc: trypsin-like serine protease; UBQ: ubiquitin homologues; ZnF RBZ: zinc finger domain in ran-binding proteins.

cut between these two arbitrary halves was performed in a region where no disulfide bonds showed cross-connection of distant parts of the primary sequence (Fig. 4A), and both constructs were tested against the prey constructs retrieved from yeast two hybrid screenings. The great majority of the proteins interacted with the amino terminus of STC1 but not with its carboxy terminal end. Interestingly, FNDC4 interacted with both the N- and C-terminal constructs of STC1 (Fig. 4B).

During the mapping of the interaction between ZBTB16 and STC1 N- and C-terminal constructs this prey construct alone also presented non-specific β -galactosidase activity with a LexA-only construct (data not shown). The confirmation

assay of all prey plasmids alone is therefore essential to rule out that the prey has transcriptional activation characteristics *per se* which do not depend on its productive interaction with the bait protein (STC1). In the case of the transcription regulatory ZBTB16 the potential auto-activation of the reporter genes was almost expected.^{18,19} Accordingly, ZBTB16 was regarded as a false positive and discarded further on.

The role of stanniocalcin-1 and SUMO-1 interaction

Since SUMO-1 was retrieved as one of the preys from our yeast two hybrid screen and because we were able to confirm this interaction by GST-pull down (Fig. 3), we decided to

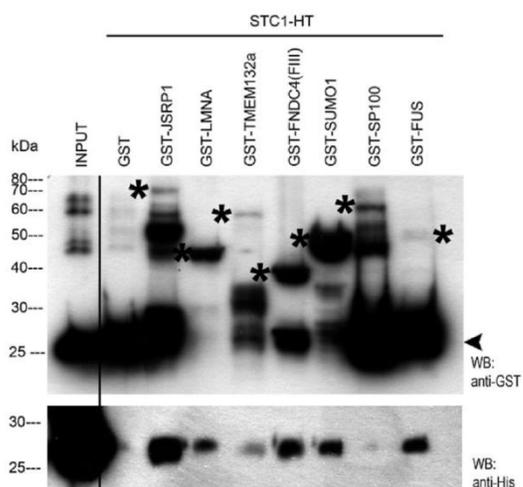


Fig. 3 *In vitro* confirmation of STC1 interaction with selected retrieved proteins. GST-pull down assay between STC1-HT produced in the baculovirus system and fragments of selected prey proteins retrieved from the yeast two-hybrid screen. All preys were GST fusion proteins. Asterisks indicate theoretically expected GST fusion recombinant protein sizes. Arrow head indicates GST. INPUT indicates GST input in the top Western-blot (WB: anti-GST) and STC1-HT in the bottom Western-blot (WB: anti-6xHis).

analyze if the STC1 has a predicted posttranslational SUMOylation site using the SUMOplot™ web available tool

from Abgent (<http://www.abgent.com/doc/SUMOplot>). This analysis showed that lysine 83 in motif AK₈₃FD of STC1 is likely a target site of SUMOylation, with a relatively high score of 79%. By comparing this motif with the motifs of other known SUMOylated proteins and their scores, we speculated that STC1 not only interacts with SUMO-1 but may be also a target of SUMOylation. Furthermore, it has been previously shown that around 23% of SUMOylated proteins have a non-canonical SUMOylation motif (*i.e.* motifs that do not follow the rule: $\Psi Kx D/E$ —Fig. 5A).²⁰ As SUMOylated proteins acquire novel functions, localization, activity or interactions with other proteins,²¹ we studied the conservation of the predicted SUMOylation motif AK₈₃FD in different STC1 orthologs from different species. We discovered by analyzing the phylogenetic tree, that this SUMOylation site does not appear until the appearance of tetrapodes, but is 100% conserved in this group (Fig. S1, ESI†). This finding matches well with the fact that in bony fish the function of STC1 has been strictly and solely associated to the calcium/phosphate homeostasis.²² However in tetrapodes, especially in mammals,^{23,24,25} there seems to have been a gain or change of functions for STC1, since several new functions were related in mammalian species that include lactation, hypoxia, bone size regulation and no significant effects on mineral homeostasis have been related in mammals.¹¹

So, we attempted to identify if STC1 is a target of SUMOylation either by performing co-immunoprecipitations of endogenous STC1 from HEK293 cells or by *in vitro* SUMOylation assay using recombinant STC1-HT as a target. As shown in Fig. 5B and C, we could not detect any SUMO-1

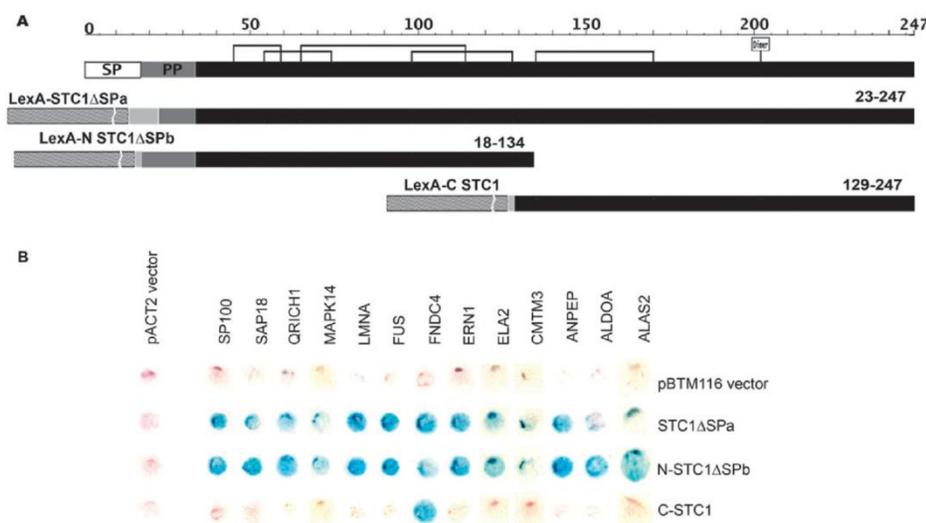


Fig. 4 Mapping of the STC1 interaction site with the prey proteins using the yeast two-hybrid system. (A) Schematic representation of full-length human STC1 and different constructs with LexA DNA binding domain used here. A linear representation of STC1-HT amino acid sequence is shown with indication of the different portions (signal peptide [SP] in white, pro-peptide [PP] in dark gray, and mature protein chain in black), its disulfide bonds intra- (brackets) and inter-chain (Dimer box). All constructs were produced as chimeric proteins with LexA fused to the N-terminus. LexA-STC1ΔSPa was used initially as a bait in the yeast two-hybrid screens and all three constructs were used to map the interaction site of STC1. Light gray bar indicates a linker region derived from cloning. (B) Colony lift β -galactosidase assay of the yeast L40 strain co-transformed with pBTM116 constructs expressing LexA fusion protein baits (indicated on the right side) and Gal4 activation domain fusion preys (indicated on the top) as retrieved from the screens.

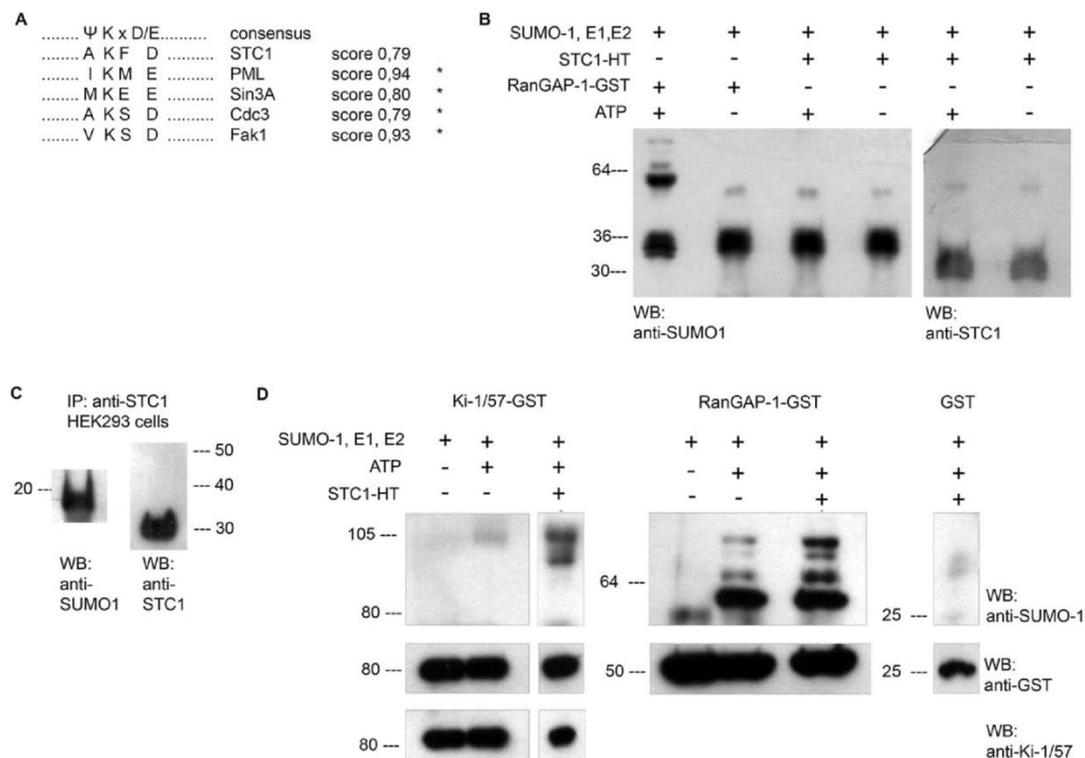


Fig. 5 Stanniocalcin-1 is not SUMOylated but acts as an E3 SUMO-1 ligase. (A) Bioinformatics analysis of human STC1 protein sequence with the SUMOplot™ web tool. The consensus motif $\Psi KxD/E$ (where Ψ represents a bulky aliphatic residue and x represents any amino acid)⁸⁵ is used by the program to analyze the sequences. The program retrieved the shown scores for the different shown input sequences. Sequences with a (*) are experimental identified SUMOylation sites: PML and Sin3A,⁸⁶ Cdc3 and Fak1.²⁰ The score for STC1 is classified as a high probability motif. (B) *In vitro* SUMOylation assay. The recombinant STC1-HT from baculovirus was submitted to the SUMOylation reaction provided by the BIOMOL kit. As a positive control the RanGAP-1 protein was used. The negative controls are the same reactions, without ATP. The *in vitro* SUMOylation reaction could not detect SUMOylation of STC1. (C) HEK293 cells were used for the co-immunoprecipitation assay. The co-immunoprecipitation could also not detect endogenous STC1 SUMOylation, but on the other hand confirmed the interaction between both proteins. The total lysate was loaded onto the gels and analyzed by Western blots, but we could not detect neither STC1 nor SUMO-1 (not shown). This was probably because there was not enough specific protein in the lysate lanes, compared to the IP lanes, where all antibody bound protein was concentrated at only one place. (D) SUMO E3 ligase activity of STC1. The *in vitro* SUMOylation reactions were done with two different proteins, with or without STC1. The reactions in which STC1 was present had a significant increase of the target protein SUMOylation (WB anti SUMO-1), showing that STC1 displayed a SUMO E3 ligase activity. GST protein was used as a negative control, and the WBs anti-GST and the WB anti-Ki 1/57 showed that the same quantities of proteins were loaded.

attachment to the STC1 protein. However, since STC1 and SUMO-1 interacted, we also tested whether STC1 could increase the SUMOylation level of two other known SUMOylated proteins. Most interestingly we observed that STC-1 acted as a SUMO E3 ligase capable of promoting a significant enhancement of SUMOylation, in a ATP dependent fashion, of both test proteins Ki-1/57-GST and RanGAP-1-GST, but not of the control protein GST (Fig. 5D).

Cytoplasm and nuclear sub-cellular localizations for STC1

The proteins identified in the yeast two-hybrid screenings, as described here, are localized both in the cytoplasm and nucleus, suggesting that STC1 may also localize to the same

compartments. Some nuclear proteins, especially SP100, SUMO-1 and SAPI8 further suggest a localization of STC1 to nuclear bodies, possibly PML bodies, in which all of these interacting proteins have been found [SP100;²⁶ SUMO-1;²⁷ SAPI8²⁸]. We checked this by subcellular immunolocalization experiments. Confocal microscopic analysis of both K562 leukemia cell and a monoclonal antibody against STC1 to detect the endogenous protein or HEK293 cells transfected with pEGFPN₂-STC1 plasmid, revealed that STC1 localizes to the cytoplasm and the nucleus, where it appears, as expected, in dot shaped fashion, thereby reinforcing the idea of a localization to specific nuclear bodies (Fig. 6). Moreover, both endogenous and transfected STC1 showed a characteristic perinuclear deposition (Fig. 6).

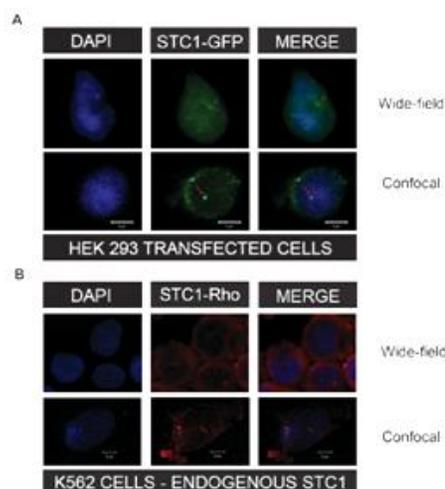


Fig. 6 Stanniocalcin-1 localizes to the cytoplasm and to dot like structures in the nucleus. Fluorescence microscope analyses suggested that STC1 was localized preferentially in the cytoplasm and also to the nucleus in a dot like fashion. Confocal analyses confirmed the nuclear corpuscles, suggesting, according to the proteins retrieved from yeast two-hybrid screen, that this dots may be nuclear corpuscles. For both cell types we observe the same patterns. (A) HEK293 cells transfected with STC1-GFP. (B) K562 leukemic cell type, marked for endogenous STC1. The arrows (red in A and green in B) points out the nuclear corpuscles that co-localizes in the DAPI stained area.

Discussion

Looking for genes that may be activated at the cross talk between the bone marrow microenvironment and leukemia cells we identified by microarray data and validated by real time PCR a molecular marker, STC1, which has been previously suggested to be involved in angiogenesis⁵ and was described as a minimal residual disease marker in ALL.²⁹

Although STC1 has been implicated in diverse cellular processes, its molecular partners have not been characterized yet. Here we tried for the first time to identify protein interaction partners for STC1 in order to better understand its cellular role. Among all retrieved STC1 interactors, there were proteins from different cellular compartments such as the nucleus, the cytoplasm, mitochondria, endoplasmic reticulum (ER) Golgi complex, plasma membrane and from the extracellular space. Although STC1 has been described to be a secreted hormone, that is present in all secretory compartments from ER onward, through the Golgi complex to the extracellular space, it has also been shown to have high affinity 'receptors' at the plasma and mitochondria membranes¹² and was found in the nuclei of mammary gland alveolar cells.¹³ By confocal microscopy analysis we were able to confirm the cytoplasmic and nuclear localizations of STC1. It remains to be determined if, and how the secreted protein is able to be internalized in an auto- or paracrine fashion by cells. STC1 may however in addition also bind to specific, although yet unknown, receptors in the plasma membrane, possibly triggering cell signaling cascades. In the following sections we will address in more detail the possible implications of STC1

interaction with proteins from the different mentioned compartments.

Nuclear proteins

The interphasic nucleus is a highly compartmentalized organelle, in which chromosomes occupy discrete territories and various regulatory proteins are present in specific nuclear bodies (NBs) and or are diffusely distributed throughout the nucleoplasm.³⁰ The lamins, which belong to the intermediate filament family of proteins, are the major components of a filamentous network underlying the inner nuclear membrane, termed the nuclear lamina. Among roles attributed to lamins are maintenance of nuclear envelope integrity, chromatin anchoring sites supply and determination of interphase nuclear architecture. STC1 interactor Lamin A C (encoded by LMNA gene) seems to have a role in spatial organization of the speckles, one of the ever-increasing number of NBs, where it seems to organize RNA splicing factors and polymerase II transcription.^{31–33}

STC1 interactor FUS, also known as TLS, is a member of the FET family of RNA binding proteins, which also includes EWS and TAF15 (TAFII68, TAF2N, RBP56) proteins, that had been found in the nucleus as well as in the cytoplasm and was shown to shuttle between these locations. FET proteins are targeted to stress granules induced by heat shock and oxidative stress and FUS required its RNA binding domain for this translocation.³⁴ Also, the small nuclear ribonucleoprotein (snRNP)—associated protein of 69 kDa (69 KD), a protein that shares structural similarity with members of FET (TLS and EWS, 95% and 65% identity, respectively), has been shown to be present in speckles.³⁵ Interestingly FUS was one of the most abundant proteins retrieved in our STC1 yeast two hybrid screenings. Most interestingly, STCs have been previously implicated in hypoxia³⁶ and oxidative stress,³⁷ so it is likely that it could be found in stress granules together with FUS and LMNA. FUS TLS protein has been described as acting not only in nucleus–cytoplasm shuttling but also as a SUMO1 E3 ligase for Ebp1, a putative tumor suppressor protein.³⁸ Once interacting with STC1, FUS can be involved in STC1 shuttling and both may act in a concerted fashion to enhance protein SUMOylation as E3 ligases. The fact that STC1 could increase Ki-1.57 SUMOylation maybe linked to the identified complex of OTUB1 protein, which participates in a protein complex composed of FUS TLS, CHOP and RACK1.³⁹ RACK1 and Ki 1.57 have been previously described to interact with each other.⁴⁰ There are no SUMO E3 ligase described that co-localize with nuclear lamins, but two different Ubiquitin E3 ligases, Ret Finger Protein⁴¹ and RNF13⁴² have been described to do so. Since SUMOylation and ubiquitination process are very similar, we suggest that probably the SUMO E3 ligase activity of STC1 occurs at the lamins. All the analyzed confocal slices (endogenous or transfected STC1) show a characteristic perinuclear deposition of STC1.

Other nuclear sub domains are the promyelocytic leukemia nuclear bodies (PML-NBs), which recruit and locally accumulate a large number of proteins, many of which are key regulators of various processes, including splicing and transcription. PML is present both in the nucleoplasm and in NBs, which

also are nuclear matrix associated,⁴³ and plays a role in the organization of these PML-NBs, targeting proteins such as STC1 interacting protein SP100, CBP, or Daxx to these domains.⁴⁴ SUMOylation was first proposed to target PML toward NBs, behaving as an NB-targeting signal but recently SUMOylation is not anymore seen as an NB-targeting signal, but rather as a consequence of the proteins localization to the NB, although the functional significance of the presence of so many SUMOylated proteins in the NBs remains to be obscure.^{43,44} Curiously, STC-1 interactor ZBTB16, although discarded during our mapping experiments as a putative false positive, has also been described as a component of PML-NBs.⁴⁵

Interestingly, most of PML-NB proteins are transient residents and are recruited or released upon different cellular stress signals. An example is p53 protein that during different kinds of stresses is stabilized and activated at the PML-NB and then can induce the transcription of its targets genes leading to cell cycle arrest, senescence or apoptosis.^{46,47} Another link connecting STC1 to PML-NB is the observation that during cell death generated by iodoacetamide-induced oxidative stress, p53 is stabilized and acetylated, ultimately resulting in upregulated STC1 gene expression.⁴⁸

Also, exposure of cells to high concentrations of heavy metal affects SP100 and PML proteins of PML-NB altering their number and distribution within the cell.²⁶ Turnover dynamics of PML and SP100 at NBs is modulated by SUMOylation⁴⁹ and some studies hypothesize that PML-NBs are SUMOylation hotspots.⁵⁰

Another STC1 interacting protein retrieved in yeast two-hybrid screen, SAPI8 (Sin3-associated polypeptide of 18 kDa), has been shown to play a key role in the gene-specific recruitment of the HDAC complex by a number of transcription factors, acting as a protein-protein adapter module bridging the Sin3-HDAC complex to transcription factors, which is supported by its ubiquitin-like fold.⁵¹ The transcription of STC1 has already been described to occur under HDAC3 regulation in breast cancer cells. When the progesterone receptors (PR), binding at the promoter region of STC1, are SUMOylated, HDAC3 is able to bind to PR and inhibit the transcription. Alternatively, when the PR are phosphorylated, SUMO-1 cannot attach to PR allowing for HDAC3 to promote STC1 transcription.⁵² Recently HDAC7 has been shown to act as a SUMO E3 ligase promoting PML SUMOylation, in a deacetylase independent fashion, and playing an important role in regulation of PML-NB formation.^{53,54}

The fact that STC1 interacted with its partners predominantly by its amino-terminal region (Fig. 4B) may have interesting structural implications. In previous SAXS experiments¹⁷ we had postulated that STC1 forms an anti-parallel dimer mediated through its carboxy-terminal end, leaving both of its amino-termini exposed, which can possibly give the ability to STC1 to interact with two partners at the same time. This may also be crucial for STC1 capacity to act as a SUMO E3 ligase, which would have to bind at one point in time simultaneously to both SUMO1 and the target protein of SUMOylation.

It is now widely accepted that SUMOylation is a process that is required for PML-NB formation. Therefore the SUMO

E3 ligase activity of STC1 in these bodies could be relevant for its interactions with several important proteins associated with PML-NB that may be targets of SUMOylation.

Endoplasmic reticulum proteins

Among the four ER retrieved proteins interacting with STC1 two are related to the unfolded protein response (UPR), like another member of the STC family, itself: STC2. The first is the UPR transducer ERN1 and the second is TMEM132a, which has also been renamed to HSPA5 binding protein (HSPA5BP) by its high homology to its rat ortholog.⁵⁵ The UPR is activated by a variety of insults that disrupt protein folding in the ER lumen thus preventing accumulation of unfolded proteins in the ER lumen. Among these insults are changes in intraluminal calcium, altered glycosylation, nutrient deprivation, pathogen infection, expression of folding-defective proteins, and changes in redox status.⁵⁶ The mammalian UPR has been shown to be activated by three interconnected signaling proteins: activating transcription factor 6 (ATF6), IRE1 (first identified in a yeast mutant with inositol-requiring phenotype, and also known as ERN1), and double-stranded RNA-activated kinase (PRK)-like ER kinase PERK. Each of these proteins are localized to the ER membrane bound to glucose-regulated protein 78 (Grp78, also known as BIP and HSPA5), a soluble ER-resident molecular chaperone that upon ER stress conditions is released from the trio of UPR transducers.⁵⁷

Most interestingly the other member of STC family of proteins, STC2, has been shown to be induced by ER and oxidative stress agents, and its knockdown was shown to promote thapsigargin-induced N2a cell death. Thapsigargin is an inhibitor of SERCA (sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase) *via* UPR.³⁵ IRE1 has been related to participate in the relationship between ER stress and angiogenesis in the placenta during pregnancy in mammals.⁵⁸ Furthermore the nuclear targeting of stanniocalcin-1 during pregnancy and lactation, together with its role in angiogenesis has been previously reported, emphasizing the functional connections between STCs and IRE1.¹³

The other two ER proteins retrieved with STC1 as bait are the junctional sarcoplasmic reticulum protein 1 (JSRP1), and the FLJ20254 protein (recently named TMEM214) of unknown function. JSRP1 plays a modulatory role in the calcium turnover in muscle, as shown by its interaction to both dihydropyridine receptor (DHPR) voltage sensors and inside the sarcoplasmic reticulum's lumen, where it binds to calsequestrin which in turn is linked to Ryanodine receptors family of calcium release channels of the reticulum.^{59,60} In bony fish STC1 has been well characterized to play roles in calcium and phosphate homeostasis.⁶¹⁻⁶³ Increasing evidences have been showing that the human STC1 may also have a role in stress related to calcium-overload.⁶⁴⁻⁶⁶ Therefore, it is a mechanistic possibility that STC1 may interact with and therefore inhibit JSRP1.

Mitochondrial proteins

STC1 has been previously found to localize within the mitochondrial matrix, exerting a concentration-dependent

stimulatory effect on NADH oxidation.¹² This was shown to be attenuated upon occupancy of the STC1 ATP binding cassette by purine nucleotides such as ATP and GTP.⁶⁷ STC1 effect on the electron transport chain may be mediated through its binding to its interacting protein MT-ND1 (Table 2), possibly by enhancing its activity. In fact, high affinity receptors of STC1 have already been observed.¹²

Cytoplasmatic proteins

STC-1 interactor mitogen-activated protein kinase 14 (MAPK14 or p38 α ^{MAPK}) is a key kinase that responds to activation by environmental stress and pro-inflammatory cytokines by phosphorylating a number of transcription factors and several downstream kinases. Another branch of the mitogen activated protein kinases are the extracellular signal regulated kinases (ERKs) 1 and 2 (ERK1/2), which are part of the classical mitogen kinase cascade, regulating proliferation, differentiation, and cell cycle progression.⁶⁸ Another study proposed that STC1 expression induced by VEGF-A₁₆₅ would be mediated primarily by PKC, ERK and calcium signaling pathways.⁶⁹ Since MAPK14 interacted with STC1 we speculate that STC1 may act in a modulatory fashion inhibiting the stress-related signaling pathway of MAPK by binding to it.

Red blood cell and secreted proteins

The second more abundant protein retrieved from the STC1 yeast two hybrid screenings were the two hemoglobin beta chain genes (HBA1 and HBA2), which code for the same protein. Circulating STC1 is usually not detected, except in pregnancy,⁵ however James and coworkers⁷⁰ demonstrated a high binding of STC1 to red blood cells postulating that the inability of STC1 detection in serum may be due to its sequestration by red blood cells, which either could represent a mechanism of delivery, storage or removal of STC1 from blood circulation and in any case HBA1/2 may serve as the binding site.

Membrane proteins

STC1 interactor Aminopeptidase N (ANPEP, CD13) is a broad specificity aminopeptidase that plays a role in the final digestion of peptides generated from hydrolysis of proteins by gastric and pancreatic proteases and serves as receptor for human coronavirus and cytomegalovirus infections, as well as for tumor-homing peptides, more specifically NGR peptides. In addition ANPEP seems to be an important regulator of endothelial morphogenesis during angiogenesis.^{71,72}

Chemokine-like factor superfamily 3 (CMTM3; CKLF-like MARVEL transmembrane containing motif protein 3, CKLFSF3) belongs to a novel family of proteins that play important roles in the immune system and participate in tumorigenesis. Retrieved as an STC1 interactor, CMTM3 in particular is highly expressed in the testes along with leukocytes and placenta.^{73,74}

STC1 interactor fibronectin domain containing protein 4 (FNDC4, FRCP1) is a protein that is strongly expressed in brain and liver, and like fibronectin type III (FNIII) and Arg-Gly-Asp (RGD) containing plasma membrane proteins

might serve either as cell adhesion molecules or as receptors with no identified ligand, yet.⁷⁵

Taking into account that STC1 does not have a biochemically characterized receptor on the cell surface it would be interesting to perform further experiments in order to test whether any of these three transmembrane proteins may function as a functional STC1 receptor *in vivo*.

Conclusions

Once we have validated STC1 as a potential molecular marker of the bone marrow tumor microenvironment we set out to identify its molecular interaction partners in human cells. Our yeast two hybrid screen identified a broad spectrum of candidate protein interactors and emphasized the notion that STC1 is a truly multifunctional protein (Fig. 2, Table 2), capable of interacting with proteins from different cellular compartments, including the nucleus. By focusing on a specific interaction of STC1 with SUMO1 we were able to establish a new specific function for STC1, which we show here, can act as a SUMO E3 ligase. However, many of the other interactions briefly described in our discussion, open promising new avenues to be explored in future detailed studies, since they all show interesting connections with previous functional studies on STC1.

Author's contribution

DMT conceived and designed, under JAY and JK supervision, the real time PCR and the yeast two hybrid screens. MTS conceived and designed, under JK supervision and with help of DMT, the confirmation of interactions by GST-pull down, the mapping interactions in yeast, all SUMOylations analyses and assays and the sub-cellular localization assays. KAG helped with *in vitro* SUMOylation of Ki-1/57-GST and GCB expressed and purified Ki-1/57-GST protein. FA established expression protocol for FNDC4 protein. MTS, DMT and JK discussed all the results and wrote the paper. JK supervised the project. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Materials and methods

Co-culture assay for the validation of the molecular marker candidate genes differential expression in BM stromal cells

Primary leukemia samples used for *in vitro* assays were obtained from patients with a newly diagnosed B-lineage acute lymphoblastic leukemia (ALL). Co-culture experiments were done with cryopreserved mononuclear cells from leukemic BM aspirates. Normal BM samples were obtained from healthy transplant donors included as controls. The study was approved by the Research Ethics Committee from Centro Infantil Boldrini. Bone marrow stromal cells (BMSCs) were obtained by culturing donor BM mononucleated cells in Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM) high glucose (Sigma) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 1 μ M hydrocortisone and penicillin-streptomycin, at 37 °C and 5% CO₂. After one week, plates were washed to remove non-adherent cells, and the culture was continued until confluence

was reached. Cells were detached by the addition of a solution containing 0.25% trypsin. Cells at passages 1 to 3 were used in the experiments.

In order to validate previous microarray data we performed co-culture of BM stromal cells with leukemic blasts. BM stromal cells were cultured in DMEM media with 10% fetal calf serum (FCS) in six-well plates until they reached around 70% of confluency. At this point the medium was changed either to fresh media (control) or fresh media containing 3×10^6 primary leukemic cells (three patient samples were used in three parallel experiments). Samples were collected from non-treated BM stromal cells (0 h) and from those treated with fresh medium alone, containing or not, the leukemic blasts. Cells were then washed with HBSS 1× in order to wash of most leukemic blasts from the stromal layer that tightly adhere to the plastic surface of the tissue culture flasks. Ultimately the stromal cells were trypsinized, collected and their total RNA was extracted.

Real-time quantitative PCR (RQ-PCR)

For RQ-PCR, total RNA was extracted from samples of treated or untreated stromal cells using TRIZOL reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol and quantified by spectrophotometrical methods. 2 µg of total RNA were treated with DNase (GE Healthcare) and then transcribed into first strand cDNA using First Strand cDNA Synthesis Kit (Amersham Biosciences/GE Healthcare) modified as previously described.⁷⁶ Briefly, RNA was treated with 20 U of DNase I (Amersham Biosciences/GE Healthcare) in Tris-HCl 40 mM pH 7.5, MgCl₂ 6 mM buffer, after 15 minutes DNase was inactivated by heating at 80 °C for 10 minutes. For the cDNA synthesis, we proceeded similar to manufacturer's protocol except that 500 ng of random hexamers were used.

RQ-PCR assays were performed using the Applied Biosystems 7500 Systems (Applied Biosystems) and each sample was run in triplicates. All PCR reactions were carried out in a final volume of 25 µL containing 1X of SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), a previously determined concentration of each gene specific primers (Table 1), 1 µL stromal cell cDNA, and sterile deionized water. The standard cycling condition was 50 °C for 2 min, 90 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. Data were analyzed by relative quantification using GAPDH as endogenous control and non-treated BM stromal cell cDNA as the calibrator sample.

Plasmid constructs

In order to obtain all STC1 constructs we used pGEMT-STC1 full length (1–247)¹⁷ construct as template. To generate pBTM116-STC1ΔSPa (STC1 lacking the first 22 amino acids, including the signal peptide), a construct used in the yeast two-hybrid screen as a bait, which encodes a LexA fused protein, we PCR amplified STC1 (23–247) with STC1ΔSPa F (5'-aagatgccCAGAATGACTCTGTGAGCCC-3') and STC1 Rev (5'-ccgaattCCTCTCCCTGGTTATGCAC-3') primers, cloned it into plasmid pUC18 (Fermentas) and then sub-cloned it into yeast bait vector pBTM116 plasmid. For pBTM116-STC1NtermΔPSb (STC1 amino-termini lacking the signal peptide, but coding residues 18 to 134) and

pBTM116Cterm (STC1 carboxy end, coding residues 129 to 247), we PCR amplified the inserts with STC1ΔPSb F2 (5'-gaattcACCCATGAGGCGGAGCAG-3') and NSTC1 + stop R2 (5'-ggatccttaCACATTCAGCTTGCTGTAG-3') primers for the amino-terminus and with CSTC1 F2 (5'-gaattcTACAGCAAGCTGAATGTGTG-3') and CSTC1 R2 (5'-ggatccTTATGCACTCTCATGGGATG-3') primers for the carboxyl end fragment. The PCR products were cloned into pGEM plasmid and then sub-cloned into the pBTM116 yeast plasmid.

In order to obtain constructs used in the GST-pull down assays, all nucleotide sequences encoding the proteins retrieved to interact with the STC1 (except that encoding FNDC4) were sub-cloned from the vector pACT2 (Clontech) to the modified bacterial expression vector pET28a-GST-Tev⁷⁷ resulting in GST fusion protein constructs. The FNDC4 sequence was PCR amplified from the pACT2 vector with FNDC4 F (5'-aagatgccCGGCCTCCCTCTCCTGTG-3') and FNDC4 R (5'-gggaattcACTCAAACGTCGATGGT-GTTG-3') primers and the obtained construct (GST-FNDC4 [FIII]) lacks the carboxyl terminus portion, which encodes its transmembrane and cytoplasmic domains, and which had been present in the clone retrieved in the yeast two hybrid screen. It had to be removed in order to allow soluble protein expression in *E. coli*.

Full length Ki-1/57 cDNA was cloned into the bacterial expression vector pGEX 2TK to allow its expression as a GST-tagged fusion protein.

For the pEGFPN₂-STC1 construct, used for the HEK293 cell transfections, we perform a sub-cloning of the STC1 gene from pGEM-STC1, resulting in fluorescent GFP fusion recombinant protein construct.

Yeast two-hybrid screen and DNA sequence analyses

The yeast two-hybrid screens of three human cDNA libraries (Clontech) from fetal brain, bone marrow and leukocytes were performed using the yeast strain L40 (trp1-901, his3del200, leu2-3, ade2 LYS2::(lexAop)4-HIS3 URA3::(lexAop)8-lac GAL4) and STC1ΔPSa as a bait in pBTM116 vector. L40 was transformed according to the protocols supplied by Clontech and *HIS3* and *LacZ* reporters were assayed as previously described.⁷⁸

The screens were performed on Synthetic Dropout minimal medium plates (SD) without tryptophan, leucine, and histidine, according to the library screening protocols supplied by Clontech. Recombinant pACT2 plasmids of positive clones for activation of both reporters genes were isolated. The obtained DNA sequence data were annotated using Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) web interface⁷⁹ and clones aligning to genomic contigs or untranslated regions were discarded. All the constructions in this article were verified by DNA sequencing in order to ascertain the correct nucleotide sequences by DNA ABI PRISM 377 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Mapping of interactions

Both constructs, amino (LexA-N STC1ΔPSb) and carboxy end (LexA-C STC1) were tested against prey constructs

retrieved from yeast two hybrid screenings additionally to the full length construction (LexA-STC1 Δ PSa) as a positive control and to the empty pACT2 plasmid, as a negative control, assayed in the same way that we described above.

Protein expression and purification

Bacterial expression of yeast two hybrid retrieved proteins and of Ki-1/57 was obtained expressing GST fusion protein constructs in *Escherichia coli* BL21 (DE3) pRARE cells at the following conditions: (1) 37 °C using 0.5 mM isopropyl 1-thio- β -D-galactopyranoside (IPTG) for 4 h (GST-FNDC4[FIII], GST-JRSP1 and GST-SUMO1), (2) 25 °C using 10 mM lactose for 16 hours (GST-FUS, GST-LMNA, GST-SP100 and GST-TMEM132A) and (3) 37 °C using 0.5 mM of isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) for 4 hours (GST control and GST-Ki-1/57). After harvest and lysis the resulting suspension was cleared by centrifugation. The obtained supernatant was loaded onto a *GST-Trap* (Amersham) and eluted in buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0; 50 mM NaCl; 0.1 mM EDTA; 20 mM reduced glutathione). The obtained GST-affinity purified fractions were pooled and dialyzed against the buffer: 50 mM Tris-HCl pH 8.0; 50 mM NaCl; 0.1 mM EDTA (GST-Ki-1/57). STC1-HT was expressed in insect cells and purified as previously described.¹⁷

GST pull-down assay

For each construct, 25 mL of transformed *E. coli* BL21(DE3) pRARE culture were harvested by centrifugation at 4500 \times g for 10 min, and the cell pellet was resuspended and incubated for 1 hour on ice in 1 mL of lysis buffer (PBS [137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4] containing 0.2 mg mL⁻¹ lysozyme, 1 μ g mL⁻¹ DNaseI, 1 μ g mL⁻¹ RNase, 1mM PMSF and 6 mM MgCl₂) and lysed by sonication. Samples were centrifuged at 20000 \times g for 30 min at 4 °C and the supernatant was used as soluble total lysate.

One millilitre of total lysate of all GST tagged constructs or of GST alone was allowed to bind to 25 μ L of Glutathione-Union Resin (Clontech) for 1 h at 4 °C. After incubation, the beads containing bound recombinant proteins were washed three times with ice cold PBS. Twenty-five μ g of purified STC1-HT protein were added to the resins containing GST fusion proteins or GST alone and further incubated in 0.1 mL of PBS for 4 h at 4 °C to allow protein-protein interactions to occur. Beads were then washed three times with 0.5 mL of PBS, followed by three washes with 0.5 mL of PBS containing 0.2% Triton-X-100, then three washes with 0.5 mL of PBS without Triton X-100. Resin-bound protein complexes were resolved on two separate 12.5% SDS-PAGE polyacrylamide gels and after electrophoresis, the proteins were transferred to PVDF membranes by semi-dry electroblotting. Membranes were blocked with 5% BSA in TTBS (0.15 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 0.05% Tween-20, pH 7.2) for 1 hour, then incubated either with a mouse monoclonal anti-His tag (1 : 5000; QIAgen) or mouse monoclonal anti-GST⁸⁰ in blocking solution for 1 h. After three washes with TTBS membranes were incubated with the HRP-conjugated anti-mouse antibody (1 : 5000; Santa Cruz Biotechnology) for 1 h and washed

again three times with TTBS. Blots were developed by Luminol reagent (Santa Cruz).

Co-immunoprecipitation

HEK293 cells from three 175 cm² flasks cultivated under 37 °C and 5% CO₂ (~70% confluency) were washed 3 times with PBS and lysed with 500 μ L lysis buffer (Triton-X100 0.5%, NaCl 150 mM, Tris 10 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, PMSF 0.5 mM) at 4 °C under agitation for 1 hour. The lysate was sonicated in 6 cycles of 5 seconds pulse/15 seconds paused, under 40% pulse intensity and centrifuged at 14000 rpm at 4 °C for 15 minutes. For pre-clearing the supernatant was incubated at 4 °C for 30 minutes, first with 30 μ L of Protein G Resin (Amersham).

30 μ L of new beads were then washed 3 times with lysis buffer (without Triton-X-100) and then incubated for 1 h at 4 °C with 5 μ g of goat polyclonal anti-STC1 antiserum (Santa Cruz Biotechnology) and finally washed 3 times with lysis buffer (without Triton-X-100). After 3 hours of incubation with the pre-cleared lysate from above, the beads were recovered and washed 3 times with the lysis buffer (without Triton-X-100). To these beads, 30 μ L of SDS 4X buffer were added (Tris-HCl 250 mM pH 6.8, SDS 0.8%, bromophenol blue 0.2%, glycerol 45.5%, 2-mercaptoethanol 20%). This mix was heated to 95 °C for 15 minutes to recover the antibody-protein complexes. The eluates were analyzed by Western blot using mouse monoclonal anti-STC1 (1 : 5000—Abnova Corporation) or against rabbit polyclonal anti-SUMO-1 (1 : 650—Abgent).

Phylogenetic analyses

The complete protein sequence of human STC1 was submitted to the PSI-BLAST web tool. After 5 subsequent submissions excluding alignments with synthetic, hypothetical and predicted sequences, we obtained alignment with STC1 orthologs from 23 different species. The 24 sequences were aligned using the COBALT platform (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/>) and a phylogenetic tree was built using the Fast Minimum evolution tree method, with a maximum difference among sequences of 0.85 using the Kimura protein distance.

In vitro SUMOylation and SUMO E3 ligase assays

For *in vitro* SUMOylation assays of STC1 we use a SUMOylation Kit (BIOMOL) according to the manufacturer's instructions. For *in vitro* SUMO E3 ligase assays, we used 200 nM of RanGAP1-GST protein provided by the kit as well as 200 nM Ki-1/57-GST. GST (200 nM) was used as control. The reactions were performed in the presence or absence of 2 pmol of STC1-HT to evaluate its SUMO E3 ligase activity towards RanGAP1-GST or Ki-1/57-GST, two known SUMO-1 modified proteins. For controls all reactions were carried out in the absence of ATP.

The reactions were analyzed by Western blot using rabbit polyclonal anti-SUMO1 (1 : 1000—BIOMOL), or mouse monoclonal anti-Ki-1/57 (A26),⁸¹ followed by membrane stripping and analysis by mouse monoclonal anti-GST antibody.

Sub-cellular localization of STC1

For the sub-cellular localization assays, HEK293 cells were grown on glass coverslips with DMEM culture + 10% FCS medium and transfections were performed by using the calcium phosphate method, using pEGFPN₂-STC1 construct and empty pEGFPN₂ as control. K562 cells were grown on 75 cm² flasks with the required medium and 10⁵ cells were pelleted on the slices by the cytospin technique, at 800× g for 5 minutes. Cells were fixed in a solution containing 2% (w/v) paraformaldehyde, 50 μM Taxol and 50 mM EGTA at room temperature for 20 min, and then permeabilized and blocked in a mixture of 0.3% (v/v) Triton-X-100 and 3% (w/v) glycine solution in PBS at room temperature for 30 min. The K562 cells were incubated at room temperature for 1 h with a specific mouse monoclonal anti-STC1 (1 : 100) (that had been generated by three subsequent immunizations of mice with 1 mg STC1-HT protein), in PBS containing 0.1% BSA (w/v). Subsequently, the K562 cells were incubated at room temperature for 1 h, with rhodamine conjugated secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology) goat anti-mouse (1 : 200). As a control we used, a slide with K562 cells incubated only with the secondary antibody. DAPI (Molecular Probes) dye was used to stain the nuclei of cells. Cells were examined on a Nikon fluorescence microscope. Confocal microscopy analysis was performed on a Axioplan Carl Zeiss LSM 510 META microscope.

Protein–protein interaction network construction

The Osprey program⁸² was used for STC1 interaction network construction and complemented by searches on the Biological General Repository for Interaction Datasets (BioGRID).^{83,84}

Acknowledgements

Financially supported by: FAPESP (www.fapesp.br), CNPq (www.cnpq.br) and CNPEM (www.lnls.br/site/home.aspx). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. We thank Maria Eugenia R. Camargo for technical assistance, Zildene D. Correa for DNA sequencing support, Dr Silvia Regina Brandalise for providing patient samples, Angelo B. A. Laranjeira for assistance with the co-culture of ALL cells onto BM stromal layers and with cytospin technique and Prof. Dr Sara T. O. Saad for access to confocal microscopy facilities and Janine S. Schincariol and Pedro Bordeaux-Rego for technical support with the confocal.

References

- 1 J. Folkman, Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease, *Nat. Med.*, 1995, **1**, 27–31.
- 2 P. O. Iversen, D. R. Sorensen and H. B. Benestad, Inhibitors of angiogenesis selectively reduce the malignant cell load in rodent models of human myeloid leukemias, *Leukemia*, 2002, **16**, 376–381.
- 3 J. P. Veiga, L. F. Costa, S. E. Sallan, L. M. Nadler and A. A. Cardoso, Leukemia-stimulated bone marrow endothelium promotes leukemia cell survival, *Exp. Hematol.*, 2006, **34**, 610–621.
- 4 A. C. Chang, J. Janosi, M. Hulsbeek, D. de Jong, K. J. Jeffrey, J. R. Noble and R. R. Reddel, A novel human cDNA highly homologous to the fish hormone stanniocalcin, *Mol. Cell. Endocrinol.*, 1995, **112**, 241–247.
- 5 A. C. Chang, D. A. Jellinek and R. R. Reddel, Mammalian stanniocalcins and cancer, *Endocr. Relat. Cancer*, 2003, **10**, 359–373.
- 6 R. A. Wascher, K. T. Huynh, A. E. Giuliano, N. M. Hansen, F. R. Singer, D. Elashoff and D. S. Hoon, Stanniocalcin-1: a novel molecular blood and bone marrow marker for human breast cancer, *Clin. Cancer Res.*, 2006, **9**, 1427–1435.
- 7 M. E. Gerritsen, R. Soriano, S. Yang, G. Ingle, C. Zlot, K. Toy, J. Winer, A. Draksharapu, F. Peale, T. D. Wu and P. M. Williams, *In silico* data filtering to identify new angiogenesis targets from a large *in vitro* gene profiling data set, *Physiol. Genomics*, 2002, **10**, 13–20.
- 8 (a) D. M. Anderson, B. J. Beres, J. Wilson-Rawls and A. Rawls, The homeobox gene *Mohawk* represses transcription by recruiting the sin3A/HDAC co-repressor complex, *Dev. Dyn.*, 2009, **238**, 572–580; (b) J. Kahn, F. Mehraban, G. Ingle, X. Xin, J. E. Bryant, G. Vehar, J. Schoenfeld, C. J. Grimaldi, F. Peale, A. Draksharapu, D. A. Lewin and M. E. Gerritsen, Gene expression profiling in an *in vitro* model of angiogenesis, *Am. J. Pathol.*, 2000, **156**, 1887–1900.
- 9 D. Liu, H. Jia, D. I. Holmes, A. Stannard and I. Zachary, Vascular endothelial growth factor-regulated gene expression in endothelial cells: KDR-mediated induction of *Egr3* and the related nuclear receptors *Nur77*, *Nurr1*, and *Nor1*, *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.*, 2003, **23**, 2002–2007.
- 10 K. K. Wary, G. D. Thakker, J. O. Humtsoe and J. Yang, Analysis of VEGF-responsive genes involved in the activation of endothelial cells, *Mol. Cancer*, 2003, **2**, 25.
- 11 D. Sheikh-Hamad, Mammalian stanniocalcin-1 activates mitochondrial antioxidant pathways: new paradigms for regulation of macrophages and endothelium, *Am. J. Physiol.: Renal Physiol.*, 2010, **298**, F248–F254.
- 12 C. R. McCudden, K. A. James, C. Hasilo and G. F. Wagner, Characterization of mammalian stanniocalcin receptors. Mitochondrial targeting of ligand and receptor for regulation of cellular metabolism, *J. Biol. Chem.*, 2002, **277**, 45249–45258.
- 13 C. P. Hasilo, C. R. McCudden, J. R. Gillespie, K. A. James, E. R. Hirvi, D. Zaidi and G. F. Wagner, Nuclear targeting of stanniocalcin to mammary gland alveolar cells during pregnancy and lactation, *Am. J. Physiol.: Endocrinol. Metab.*, 2005, **289**, E634–E642.
- 14 D. A. Jellinek, A. C. Chang, M. R. Larsen, X. Wang, P. J. Robinson and R. R. Reddel, Stanniocalcin 1 and 2 are secreted as phosphoproteins from human fibrosarcoma cells, *Biochem. J.*, 2000, **350**(Pt 2), 453–461.
- 15 J. Lomax, Get ready to GO! A biologist's guide to the Gene Ontology, *Briefings Bioinf.*, 2005, **6**, 298–304.
- 16 K. Nakai and P. Horton, PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization, *Trends Biochem. Sci.*, 1999, **24**, 34–36.
- 17 D. M. Trindade, J. C. Silva, M. S. Navarro, C. Torriani and J. Kobarg, Low-resolution structural studies of human Stanniocalcin-1, *BMC Struct. Biol.*, 2009, **9**, 57.
- 18 K. F. Kelly and J. M. Daniel, POZ for effect—POZ-ZF transcription factors in cancer and development, *Trends Cell Biol.*, 2006, **16**, 578–587.
- 19 J. Raberger, A. Schebesta, S. Sakaguchi, N. Boucheron, K. E. Blomberg, A. Berglof, T. Kolbe, C. I. Smith, T. Rulicke and W. Ellmeier, The transcriptional regulator PLZF induces the development of CD44 high memory phenotype T cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2008, **105**, 17919–17924.
- 20 Y. Xue, F. Zhou, C. Fu, Y. Xu and X. Yao, SUMOsp: a web server for SUMOylation site prediction, *Nucleic Acids Res.*, 2006, **34**(1), W254–W257.
- 21 M. B. Kroetz and M. Hochstrasser, *SUMO protocols*, Human Press, 2009, vol. 1, pp. 107–120.
- 22 G. F. Wagner and G. E. Dimattia, The stanniocalcin family of proteins, *J. Exp. Zool. A Comp. Exp. Biol.*, 2006, **305**(9), 769–780.
- 23 G. Tremblay, P. Bernier-Dodier, L. Delbecchi, G. F. Wagner, B. G. Talbot and P. Lacasse, Local control of mammary involution: is stanniocalcin-1 involved?, *J. Dairy Sci.*, 2009, **92**(5), 1998–2006.
- 24 G. Basini, L. Baioni, S. Bussolati, S. Grolli, L. H. Kramer, G. F. Wagner and F. Grasselli, Expression and localization of stanniocalcin 1 in swine ovary, *Gen. Comp. Endocrinol.*, 2010, **166**(2), 404–408.

- 25 J. Johnston, Y. Ramos-Valdes, L. A. Stanton, S. Ladhani, F. Beier and G. E. Dimattia, Human stanniocalcin-1 or -2 expressed in mice reduces bone size and severely inhibits cranial intramembranous bone growth, *Transgenic Res.*, 2010, DOI: 10.1007/s11248-010-9376-7.
- 26 A. Zimmer, Q. D. Nguyen and C. Gespach, Nuclear bodies and compartments: functional roles and cellular signalling in health and disease, *Cell. Signalling*, 2004, **16**, 1085–1104.
- 27 T. H. Shen, H. K. Lin, P. P. Scaglioni, T. M. Yung and P. P. Pandolfi, The mechanisms of PML-nuclear body formation, *Mol. Cell*, 2006, **3**, 331–339.
- 28 Y. Zhang, R. Iratni, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and D. Reinberg, Histone deacetylases and SAP18, a novel polypeptide, are components of a human Sin3 complex, *Cell*, 1997, **89**(3), 357–364.
- 29 Y. Tohmiya, Y. Koide, S. Fujimaki, H. Harigae, T. Funato, M. Kaku, T. Ishii, Y. Munakata, J. Kameoka and T. Sasaki, Stanniocalcin-1 as a novel marker to detect minimal residual disease of human leukemia, *Tohoku J. Exp. Med.*, 2004, **204**(2), 125–133.
- 30 R. I. Kumaran, R. Thakar and D. L. Spector, Chromatin dynamics and gene positioning, *Cell*, 2008, **132**, 929–934.
- 31 R. I. Kumaran, B. Muralikrishna and V. K. Parnaik, Lamin A/C speckles mediate spatial organization of splicing factor compartments and RNA polymerase II transcription, *J. Cell Biol.*, 2002, **159**, 783–793.
- 32 N. Sylvius, Z. T. Bilinska, J. P. Veinot, A. Fidzianska, P. M. Bolongo, S. Poon, P. McKeown, R. A. Davies, K. L. Chan, A. S. Tang, S. Dyack, J. Grzybowski, W. Ruzyllo, H. McBride and F. Tesson, *In vivo* and *in vitro* examination of the functional significances of novel lamin gene mutations in heart failure patients, *J. Med. Genet.*, 2005, **42**, 639–647.
- 33 N. Sylvius, A. Hathaway, E. Boudreau, P. Gupta, S. Labib, P. M. Bolongo, P. Rippstein, H. McBride, Z. T. Bilinska and F. Tesson, Specific contribution of lamin A and lamin C in the development of laminopathies, *Exp. Cell Res.*, 2008, **314**, 2362–2375.
- 34 M. K. Andersson, A. Stahlberg, Y. Arvidsson, A. Olofsson, H. Semb, G. Stenman, O. Nilsson and P. Aman, The multi-functional FUS, EWS and TAF15 proto-oncoproteins show cell type-specific expression patterns and involvement in cell spreading and stress response, *BMC Cell Biol.*, 2008, **9**, 37.
- 35 W. Hackl and R. Luhrmann, Molecular cloning and subcellular localization of the snRNP-associated protein 69 KD, a structural homologue of the proto-oncoproteins TLS and EWS with RNA and DNA-binding properties, *J. Mol. Biol.*, 1996, **264**, 843–851.
- 36 H. Y. Yeung, K. P. Lai, H. Y. Chan, N. K. Mak, G. F. Wagner and C. K. Wong, Hypoxia-inducible factor-1-mediated activation of stanniocalcin-1 in human cancer cells, *Endocrinology*, 2005, **146**, 4951–4960.
- 37 D. Ito, J. R. Walker, C. S. Thompson, I. Moroz, W. Lin, M. L. Veselits, A. M. Hakim, A. A. Fienberg and G. Thinakaran, Characterization of stanniocalcin 2, a novel target of the mammalian unfolded protein response with cytoprotective properties, *Mol. Cell Biol.*, 2004, **24**, 9456–9469.
- 38 S. M. Oh, Z. Liu, M. Okada, W. Jang, X. Liu, C. B. Chan, H. Luo and K. Ye, Ebp1 SUMOylation, regulated by TLS/FUS E3 ligase, is required for its anti-proliferative activity, *Oncogene*, 2010, **29**(7), 1017–1030.
- 39 M. J. Edelmann, A. Iphöfer, M. Akutsu, M. Altun, K. di Gleria, H. B. Kramer, E. Fiebiger, S. Dhe-Paganon and B. M. Kessler, Structural basis and specificity of human otubain 1-mediated deubiquitination, *Biochem. J.*, 2009, **418**(2), 379–390.
- 40 F. C. Nery, D. O. Passos, V. S. Garcia and J. Kobarg, Ki-1/57 interacts with RACK1 and is a substrate for the phosphorylation by phorbol 12-myristate 13-acetate-activated protein kinase C, *J. Biol. Chem.*, 2004, **279**(12), 11444–11455.
- 41 I. Gillot, C. Matthews, D. Puel, F. Vidal and P. Lopez, Ret Finger Protein: An E3 Ubiquitin Ligase Juxtaposed to the XY Body in Meiosis, *Int. J. Cell Biol.*, 2009, 524858.
- 42 J. P. Boccock, S. Carmicle, E. Madamba and A. H. Erickson, Nuclear Targeting of an Endosomal E3 Ubiquitin Ligase, *Traffic*, 2010, **11**(6), 756–766.
- 43 Y. Takahashi, V. Lallemand-Breitenbach, J. Zhu and H. de The, PML nuclear bodies and apoptosis, *Oncogene*, 2004, **23**, 2819–2824.
- 44 V. Lallemand-Breitenbach, J. Zhu, F. Puvion, M. Koken, N. Honore, A. Doubeikovsky, E. Duprez, P. P. Pandolfi, E. Puvion, P. Freemont and H. de The, Role of promyelocytic leukemia (PML) SUMOylation in nuclear body formation, 11S proteasome recruitment, and As₂O₃-induced PML or PML/retinoic acid receptor alpha degradation, *J. Exp. Med.*, 2001, **193**, 1361–1371.
- 45 P. Dhordain, O. Albagli, N. Honore, F. Guidez, D. Lantoine, M. Schmid, H. D. The, A. Zelent and M. H. Koken, Colocalization and heteromerization between the two human oncogene POZ/zinc finger proteins, LAZ3 (BCL6) and PLZF, *Oncogene*, 2000, **19**, 6240–6250.
- 46 E. de Stanchina, E. Querido, M. Narita, R. V. Davuluri, P. P. Pandolfi, G. Ferbeyre and S. W. Lowe, PML is a direct p53 target that modulates p53 effector functions, *Mol. Cell*, 2004, **13**, 523–535.
- 47 E. Kriehhoff-Henning and T. G. Hofmann, Role of nuclear bodies in apoptosis signaling, *Biochim. Biophys. Acta*, 2008, **1783**, 2185–2194.
- 48 K. P. Lai, A. Y. Law, H. Y. Yeung, L. S. Lee, G. F. Wagner and C. K. Wong, Induction of stanniocalcin-1 expression in apoptotic human nasopharyngeal cancer cells by p53, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2007, **356**, 968–975.
- 49 S. Weidtkamp-Peters, T. Lenser, D. Negorev, N. Gerstner, T. G. Hofmann, G. Schwanitz, C. Hoischen, G. Maul, P. Ditttrich and P. Hemmerich, Dynamics of component exchange at PML nuclear bodies, *J. Cell Sci.*, 2008, **121**(16), 2731–2743.
- 50 E. van Damme, K. Laukens, T. H. Dang and X. van Ostade, A manually curated network of the PML nuclear body interactome reveals an important role for PML-NBs in SUMOylation dynamics, *Int. J. Biol. Sci.*, 2010, **6**(1), 51–67.
- 51 S. A. McCallum, J. F. Bazan, M. Merchant, J. Yin, B. Pan, F. J. de Sauvage and W. J. Fairbrother, Structure of SAP18: a ubiquitin fold in histone deacetylase complex assembly, *Biochemistry*, 2006, **45**, 11974–11982.
- 52 A. R. Daniel and C. A. Lange, Protein kinases mediate ligand-independent derepression of sumoylated progesterone receptors in breast cancer cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2009, **106**(34), 14287–14292.
- 53 C. Gao, X. Cheng, M. Lam, Y. Liu, Q. Liu, K. S. Chang and H. Y. Kao, Signal-dependent regulation of transcription by histone deacetylase 7 involves recruitment to promyelocytic leukemia protein nuclear bodies, *Mol. Biol. Cell.*, 2008, **19**, 3020–3027.
- 54 C. Gao, C. C. Ho, E. Reineke, M. Lam, X. Cheng, K. J. Stanya, Y. Liu, S. Chakraborty, H. M. Shih and H. Y. Kao, Histone deacetylase 7 promotes PML SUMOylation and is essential for PML nuclear body formation, *Mol. Cell Biol.*, 2008, **28**, 5658–5667.
- 55 K. Oh-Hashi, Y. Naruse, F. Amaya, G. Shimosato and M. Tanaka, Cloning and characterization of a novel GRP78-binding protein in the rat brain, *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 10531–10537.
- 56 J. D. Malhotra and R. J. Kaufman, The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response, *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2007, **18**, 716–731.
- 57 J. N. Gass, H. Y. Jiang, R. C. Wek and J. W. Brewer, The unfolded protein response of B-lymphocytes: PERK-independent development of antibody-secreting cells, *Mol. Immunol.*, 2008, **45**, 1035–1043.
- 58 T. Iwakaki, R. Akai, S. Yamanaka and K. Kohno, Function of IRE1 alpha in the placenta is essential for placental development and embryonic viability, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2009, **106**(39), 16657–16662.
- 59 E. Gouadon, R. P. Schuhmeier, D. Ursu, A. A. Anderson, S. Treves, F. Zorzato, F. Lehmann-Horn and W. Melzer, A possible role of the junctional face protein JP-45 in modulating Ca²⁺ release in skeletal muscle, *J. Physiol.*, 2006, **572**, 269–280.
- 60 E. Rios, Calcium signalling in muscle: a milestone for modulation studies, *J. Physiol.*, 2006, **572**, 1–2.
- 61 H. S. Olsen, M. A. Cepeda, Q. Q. Zhang, C. A. Rosen and B. L. Vozzolo, Human stanniocalcin: a possible hormonal regulator of mineral metabolism, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1996, **93**, 1792–1796.

- 62 G. F. Wagner, B. L. Vozzolo, E. Jaworski, M. Haddad, R. L. Kline, H. S. Olsen, C. A. Rosen, M. B. Davidson and J. L. Renfro, Human stanniocalcin inhibits renal phosphate excretion in the rat, *J. Bone Miner. Res.*, 1997, **12**, 165–171.
- 63 K. L. Madsen, M. M. Tavernini, C. Yachimec, D. L. Mendrick, P. J. Alfonso, M. Buerger, H. S. Olsen, M. J. Antonaccio, A. B. Thomson and R. N. Fedorak, Stanniocalcin: a novel protein regulating calcium and phosphate transport across mammalian intestine, *Am. J. Physiol.*, 1998, **274**, G96–G102.
- 64 D. Sheikh-Hamad, R. Bick, G. Y. Wu, B. M. Christensen, P. Razeghi, B. Poindexter, H. Taetmeyer, A. Wamsley, R. Padda, M. Entman, S. Nielsen and K. Youker, Stanniocalcin-1 is a naturally occurring L-channel inhibitor in cardiomyocytes: relevance to human heart failure, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2003, **285**, H442–H448.
- 65 D. Sheikh-Hamad, D. Rouse and Y. Yang, Regulation of stanniocalcin in MDCK cells by hypertonicity and extracellular calcium, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 2000, **278**, F417–F424.
- 66 K. Koizumi, M. Hoshiai, H. Ishida, K. Ohyama, H. Sugiyama, A. Naito, T. Toda, H. Nakazawa and S. Nakazawa, Stanniocalcin 1 prevents cytosolic Ca^{2+} overload and cell hypercontracture in cardiomyocytes, *Circ. J.*, 2007, **71**, 796–801.
- 67 J. P. Ellard, C. R. McCudden, C. Tanega, K. A. James, S. Ratkovic, J. F. Staples and G. F. Wagner, The respiratory effects of stanniocalcin-1 (STC1) on intact mitochondria and cells: STC1 uncouples oxidative phosphorylation and its actions are modulated by nucleotide triphosphates, *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2007, **264**, 90–101.
- 68 P. P. Roux and J. Blenis, ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2004, **68**, 320–344.
- 69 D. I. Holmes and I. C. Zachary, Vascular endothelial growth factor regulates stanniocalcin-1 expression via neuropilin-1-dependent regulation of KDR and synergism with fibroblast growth factor-2, *Cell. Signalling*, 2008, **20**, 569–579.
- 70 K. James, M. Seitelbach, C. R. McCudden and G. F. Wagner, Evidence for stanniocalcin binding activity in mammalian blood and glomerular filtrate, *Kidney Int.*, 2005, **67**, 477–482.
- 71 S. V. Bhagwat, J. Lahdenranta, R. Giordano, W. Arap, R. Pasqualini and L. H. Shapiro, CD13/APN is activated by angiogenic signals and is essential for capillary tube formation, *Blood*, 2001, **97**, 652–659.
- 72 R. Pasqualini, E. Koivunen, R. Kain, J. Lahdenranta, M. Sakamoto, A. Stryhn, R. A. Ashmun, L. H. Shapiro, W. Arap and E. Ruoslahti, Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis, *Cancer Res.*, 2000, **60**, 722–727.
- 73 J. Zhong, Y. Wang, X. Qiu, X. Mo, Y. Liu, T. Li, Q. Song, D. Ma and W. Han, Characterization and expression profile of CMTM3/CKLFSF3, *J. Biochem. Mol. Biol.*, 2006, **39**, 537–545.
- 74 Y. Wang, T. Li, X. Qiu, X. Mo, Y. Zhang, Q. Song, D. Ma and W. Han, CMTM3 can affect the transcription activity of androgen receptor and inhibit the expression level of PSA in LNCaP cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2008, **371**, 54–58.
- 75 A. Teufel, N. Malik, M. Mukhopadhyay and H. Westphal, Frcp1 and Frcp2, two novel fibronectin type III repeat containing genes, *Gene*, 2002, **297**(1–2), 79–83.
- 76 E. Beillard, N. Pallisgaard, d. V. V. Van, W. Bi, R. Dee, S. E. van der, E. Delabesse, E. Macintyre, E. Gottardi, G. Saglio, F. Watzinger, T. Lion, J. J. van Dongen, P. Hokland and J. Gabert, Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR)—a Europe against cancer program, *Leukemia*, 2003, **17**, 2474–2486.
- 77 F. R. Carneiro, T. C. Silva, A. C. Alves, T. Haline-Vaz, F. C. Gozzo and N. I. Zanchin, Spectroscopic characterization of the tumor antigen NY-REN-21 and identification of heterodimer formation with SCAND1, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006, **343**, 260–268.
- 78 E. M. Assmann, M. R. Alborghetti, M. E. Camargo and J. Kobarg, FEZ1 dimerization and interaction with transcription regulatory proteins involves its coiled-coil region, *J. Biol. Chem.*, 2006, **281**, 9869–9881.
- 79 M. Johnson, I. Zaretskaya, Y. Rayselis, Y. Merezukh, S. McGinnis and T. L. Madden, NCBI BLAST: a better web interface, *Nucleic Acids Res.*, 2008, **36**, W5–W9.
- 80 T. A. Lemos, D. O. Passos, F. C. Nery and J. Kobarg, Characterization of a new family of proteins that interact with the C-terminal region of the chromatin-remodeling factor CHD-3, *FEBS Lett.*, 2003, **533**, 14–20.
- 81 J. Kobarg, S. Schnittger, C. Fonatsch, H. Lemke, M. A. Bowen, F. Buck and H. P. Hansen, Characterization, mapping and partial cDNA sequence of the 57 kDa intracellular Ki-1 antigen, *Exp. Clin. Immunogenet.*, 1997, **14**, 273–280.
- 82 B. J. Breitkreutz, C. Stark and M. Tyers, Osprey: a network visualization system, *Genome Biol.*, 2003, **4**, R22.
- 83 B. J. Breitkreutz, C. Stark, T. Reguly, L. Boucher, A. Breitkreutz, M. Livstone, R. Oughtred, D. H. Lackner, J. Bahler, V. Wood, K. Dolinski and M. Tyers, The BioGRID Interaction Database: 2008, *Nucleic Acids Res.*, 2008, **36**, D637–D640.
- 84 C. Stark, B. J. Breitkreutz, T. Reguly, L. Boucher, A. Breitkreutz and M. Tyers, BioGRID: a general repository for interaction datasets, *Nucleic Acids Res.*, 2006, **34**, D535–D539.
- 85 H. D. Ulrich, *The SUMO system: an Overview, SUMO protocols*, Human Press, 2009, vol. 1, pp. 3–16.
- 86 S. H. Yang, A. Galanis, J. Witty and A. D. Sharrocks, An extended consensus motif enhances the specificity of substrate modification by SUMO, *EMBO J.*, 2006, **25**, 5083–5093.
- 87 D. Maglott, J. Ostell, K. D. Pruitt and T. Tatusova, Entrez Gene: gene-centered information at NCBI, *Nucleic Acids Res.*, 2007, **35**, D26–D31.

Campinas, 19 de agosto de 2011

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins, que a tese de doutorado defendida por Marcos Tadeu dos Santos, intitulada "*O interactoma de Stanniocalcina-1 humana sugere novas funções e vias de atuação celulares*" é vinculada ao projeto "*Interação de LLA com as células endoteliais da medula óssea. Validação de genes marcadores da ativação do endotélio pela LLA*" aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Infantil Boldrini (CEP/Boldrini) em 13/05/2005, conforme documento anexo a este.

Cordialmente,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'J. Yunes', is written over a horizontal line.

Dr. José Andrés Yunes

Pesquisador do Centro Infantil Boldrini

Co-orientador desta tese de doutorado



**CENTRO INFANTIL DE INVESTIGAÇÕES HEMATOLÓGICAS
DR. DOMINGOS A. BOLDRINI**

Rua Dr. Gabriel Porto, 1270 - Cid. Universitária - Barão Geraldo - Campinas/SP - CEP 13083-210
Fone: (19) 3787-5000 - Fax: (19) 3289-3571 - www.boldrini.org.br

Campinas, 13 de maio de 2005.

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. JOSÉ ANDRÉS YUNES
Laboratório de Biologia Molecular
Centro Infantil Boldrini

Prezado Senhor ,

Informamos que seu projeto intitulado "Interação da LLA com as células endoteliais da medula óssea. Validação de genes marcadores da ativação do endotélio pela LLA" foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Infantil Boldrini (CEP/Boldrini) em 13/05/2005.

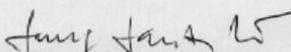
Informamos que a cada 6 meses, deverá ser apresentado um relatório parcial sobre o andamento da pesquisa em questão ao Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Infantil Boldrini (CEP/Boldrini).

Solicitamos que, após a conclusão do estudo, o mesmo seja encaminhado à Secretaria do CEP/Boldrini e apresentado aos profissionais do Centro Infantil Boldrini.

Colocamo-nos à disposição para maiores esclarecimentos.

Desejando-lhe sucesso, subscrevemo-nos.

Cordialmente,


Dr. Sérgio Santos Mühlen
Coordenador do CEP / Boldrini

☞ **P.S.: Pedimos a gentileza de acusar o recebimento desta.**

Formulário de encaminhamento de projetos de pesquisa para análise pela CIBio - Comissão Interna de Biossegurança da ABTLuS – Associação Brasileira de Tecnologia de Luz Síncrotron

Título do projeto: Estudos funcionais de Stanniocalcina-1, uma proteína marcadora do microambiente tumoral, e desenvolvimento de um ensaio para sua detecção em soros de pacientes

Pesquisador responsável: Jörg Kobarg,
Co-orientador: Prof. Dr. Andres Yunes (Centro Boldrini)
Experimentador: Marcos Tadeu dos Santos

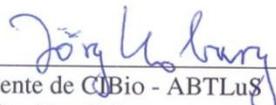
Nível do treinamento do experimentador: -Iniciação científica, -mestrado, -doutorado, -doutorado direto, -pós-doutorado, -nível técnico, -outro, especifique: _____

Resumo do projeto:

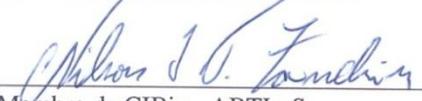
O estudo dos mecanismos de ação, proliferação e estabelecimento de células cancerígenas tem avançado significativamente nos últimos anos, devido principalmente às novas descobertas científicas. A busca por métodos de tratamentos e diagnósticos alternativos tem levado a uma melhoria na qualidade de vida dos pacientes, que são tratados com técnicas cada vez mais eficientes e mais rápidas. A leucemia infantil merece um enfoque especial, não somente devido sua agressividade, mas também por ser a neoplasia mais freqüente na infância. Num contexto maior de uma colaboração inter-institucional entre o Boldrini e o LNLS, propomos neste presente projeto de doutoramento estudar o microambiente tumoral da leucemia, desvendando a ação da proteína secretada, paracrina, humana STC-1 através da identificação de receptores ou outros ligantes com quais ela interaja, utilizando para isso estudos de espectrometria de massas e de duplo híbrido em levedura. A STC-1 foi identificada como uma boa molécula candidata de marcador do microambiente tumoral em ensaios de QRT-PCR previamente realizados no nosso grupo. Além da identificação do receptor da STC-1, pretendemos estudar as modificações celulares e moleculares que a super-expressão e/ou a inibição da expressão (iRNA silenciamento) da STC-1 venham a gerar nas células leucêmicas. Finalmente, pretendemos ainda desenvolver um novo método diagnóstico e possivelmente prognóstico da leucemia, baseado na técnica de ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) através da identificação da proteína marcadora STC1 no soro dos pacientes, utilizando anticorpos monoclonais específicos.

A CIBio analisou este projeto em reunião realizada no dia: 28/11/2008 .

Parecer final: -projeto aprovado, -projeto recusado, -projeto com deficiências, favor comentários abaixo:


 Presidente de CIBio - ABTLuS
 Prof. Dr. Jörg Kobarg


 Membro da CIBio - ABTLuS
 Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti


 Membro da CIBio - ABTLuS
 Prof. Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin