

ÂNGELA SAITO

Estudos funcionais da proteína reguladora Ki-1/57 em células e camundongos

Functional studies of the regulatory protein Ki-1/57 in cells and mice

CAMPINAS

2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS INSTITUTO DE BIOLOGIA

Ângela Saito

Estudos funcionais da proteína reguladora Ki-1/57 em células e camundongos

Functional studies of the regulatory protein Ki-1/57 in cells and mice

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Biologia Funcional e Molecular, na área de Bioquímica.

Thesis presented at the Biology Institute of the State University of Campinas as part of the requirements for obtaining the title of Doctor in Functional and Molecular Biology, Biochemistry area.

Orientador: Prof. Dr. Jörg Kobarg

Coorientador: Dr. José Xavier Neto

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida pela aluna Ângela Saito, e orientada pelo Prof. Dr. Ling Kabara

Prof. Dr. Jörg Kobarg.

CAMPINAS

2015

Agência de fomento: FAPESP Nº processo: 2010/15760-2

> Ficha catalográfica Universidade Estadual de Campinas Biblioteca do Instituto de Biologia Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

Sa28e	Saito, Ângela, 1988- Estudos funcionais da proteína reguladora Ki-1/57 em células e camundongos / Ângela Saito. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.
	Orientador: Jörg Kobarg. Coorientador: José Xavier Neto. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
	1. Proteína Ki-1/57. 2. Sumoilação. 3. Camundongos knockout. 4. Recombinação homóloga. 5. Sistema CRISPR/Cas9. I. Kobarg, Jörg, 1965 II. Xavier-Neto, José. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Functional studies of the regulatory protein Ki-1/57 in cells and mice Palavras-chave em inglês: Ki-1/57 protein Sumoylation Mice knockout Homologous recombination CRISPR/Cas9 system Área de concentração: Bioquímica Titulação: Doutora em Biologia Funcional e Molecular Banca examinadora: Jörg Kobarg [Orientador] Deborah Schechtman Alisson Campos Cardoso Claudio Chrysostomo Werneck Juliana Helena Costa Smetana Data de defesa: 13-08-2015 Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 13 de Agosto de 2015

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jörg Kobarg (Orientador)

Profa. Dra. Deborah Schechtman

Dr. Alisson Campos Cardoso

Dra. Juliana Helena Costa Smetana

Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck

Dra. Ângela Maria Sousa Costa

Dra. Talita Miguel Marin

Profa. Dra. Carmen Veríssima Ferreira Halder

Assinatura De An er

Assinatura

Inoca

Assinatura

mita

Assinatura

are made 4

Assinatura

Assinatura

Assinatura

Assinatura

À minha família, pelo apoio, incentivo e amor.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Jörg Kobarg, pela orientação e apoio; suas palavras motivadoras foram fundamentais para o andamento desse trabalho;

Ao Dr. José Xavier-Neto, co-orientador dessa tese; seus ensinamentos e apoio constantes foram imprescindíveis para este trabalho;

À equipe do Laboratório de Modificação do Genoma (LMG); à Dra. Carolina Fernanda Manfredi Zambon Clemente, pelo apoio, principalmente nas microinjeções em embrião de camundongo; ao veterinário Michel Vaz de Oliveira, por toda a ajuda e por prezar pelo bem-estar dos animais; ao Juliano Pereira Dias, pelo cuidado diário com o biotério;

Aos animais utilizados nesse trabalho; meus agradecimentos e respeito;

À Dra. Hozana Andrade Castillo, pelos preciosos ensinamentos e ajuda nos experimentos de hibridação de RNA *in situ*; À Luana Nunes Santos, pelo suporte nos experimentos de *in situ* e coletas de embriões; À Dra. Angela Maria Sousa Costa, por fornecer um pouco de reagente ácido retinóico;

À Dra. Deborah Schechtman (IQ-USP), por fornecer linhagens de células-tronco embrionárias murinas e pelos ensinamentos sobre cultivos das mesmas; À sua aluna Nicole, por dividir seus conhecimentos em manutenção e diferenciação de células-tronco embrionárias e, em produção de células MEFs; Agradeço também à Dra. Deborah e ao Dr. Alexander Henning Ulrich (IQ-USP) pela doação de alguns anticorpos;

Ao Dr. Henrique Marquez-Souza (IB/Unicamp), pela ajuda com as células-tronco embrionárias; pelas conversas e troca de experiências;

Ao Dr. Richard Behringer, por ter me recebido em seu laboratório durante quatro meses, pelas valorosas sugestões, apoio e ensinamentos; À Jenny Deng, membro da equipe do Dr. Richard, pelo seu suporte constante, dicas singulares e agradável convivência durante minha estadia no laboratório; Aos outros membros, Shuo-Ting Yen, Zer Vue, Allison Stewart, Rachel Mullen, pelo apoio, ensinamentos e por me fazerem sentir parte do grupo;

Aos colaboradores dos artigos e manuscrito: Kaliandra de Almeida Gonçalves, Gustavo Costa Bressan, Gabriela Vaz Meirelles, Fernanda Costa, Marcos Tadeu dos Santos, Edmárcia Elisa de Souza, Mateus B. Cardoso e Jéssica Oliveira do LNLS, Larissa Capeletti;

À Maria Eugenia Camargo, por seus valorosos cuidados técnicos e conselhos;

A todos os colegas do grupo do Jörg que, de alguma forma, me ajudaram durante meu percurso. Aos membros atuais: Arina Marina Perez, Bruno Aquino, Edmárcia Elisa de Souza, Mariana Bertini Teixeira, Priscila Ferreira Papa, Talita Diniz Melo Hanchuk e Vanessa Bonfim Cardoso; e aos exintegrantes (alguns ainda no laboratório) do grupo: Aline Monticelli Cardoso, Ariane Furlan, Bárbara Biatriz de Godoy, Daniel Maragno Trindade, Deivid Migueleti, Diogo Ventura Lovato, Eduardo Moraes, Fernanda Luisa Basei, Germanna Lima Righetto, Juliana Smetana, Marcel Nakahira, Marcos Rodrigo Alborghetti, Mayra Bento Lemos, Priscila Pini Zenatti, pelo apoio, ensinamentos, sugestões e agradável convivência desde meus primórdios no grupo;

Um agradecimento especial à Dra. Fernanda C. Costa, pós-doutoranda e minha duplinha durante dois anos. Obrigada por fazer parte deste trabalho, pelas sugestões, companhia e amizade;

Às amigas da nova geração do LNBio, Fernanda Büchli, Samira Zouhir, Mayara Miyachiro, Arina e Tabata Cardoso, pelos conselhos, por dividir conversas e momentos de descontração nos almoços e, por me lembrar que, momentos de relaxamento são fundamentais para o andamento saudável de um projeto;

Aos amigos, Douglas Adamoski, Daniel Maragno Trindade e Silvio Consonni, pelas valiosas sugestões, algumas imprescindíveis no desenvolvimento deste trabalho;

Ao Alisson Cardoso e à Ana Helena Pereira, pelos ensinamentos e por fornecerem o vetor 3xMEF2-Luc e alguns primers utilizados nos ensaios de qRT-PCR;

Ao Carlos Paier, por fornecer o plasmídeo pcDNA3.1-Myc;

Ao Állan Ferrari e seu orientador, Dr. Fábio Gozzo (IQ-Unicamp), pela colaboração com os experimentos de espectrometria de massas;

Ao Leandro Assis e Jéssica Oliveira, pela companhia, sugestões e amizade;

À Amanda Araújo, aluna do Prof. Henrique, pela amizade, conversas, apoio e troca de experiências sobre nosso trabalho;

À Valéria Yukari e ao Caio Cesar, pela agradável companhia dentro e fora do laboratório;

Ao grupinho de corrida, Flávia Zandonadi, Carol Moretto, Sami Yokoo e Rebeca Kawahara, também integrantes do grupo de espectrometria de massas do LNBio; Agradeço a companhia muito divertida durante as corridas pela Unicamp, fundamentais para aliviar o estresse de final de tese.

Às amigas, Amanda Petrina Scotá e Larissa Menezes dos Reis, pelo carinho e companhia nos períodos de alegria e de dificuldade; Dividimos conversas e risadas tomando sorvete e nos almoços de finais de semana;

À minha mãe, Maria José Bet, pelo carinho e amor incondicional, por sempre prezar pela minha educação e dos meus irmãos; Agradeço o incentivo e compreensão durante muitos momentos deste projeto e na elaboração da tese; À Lollinha, muito querida na família; agradeço por me receber com muita alegria e carinho;

À minha querida irmã, Érika Saito, companheira desde sempre; são indescritíveis todos os bons momentos que passamos juntas durante nossa jornada. Obrigada pela compreensão quando não pude estar presente; o seu apoio e companhia foram fundamentais para o andamento desse trabalho;

Aos meus irmãos, André Saito e Eiki Saito, que me orgulham muito pelo exemplo de caráter e esforço. Obrigada por sempre me apoiarem em minhas escolhas;

À Isabela, a mais nova integrante da família, por trazer muita alegria à nossa família;

À Renata Lima Moretto, Emily Magrini e Tabata Almeida; pela amizade de longa data; agradeço a companhia e os momentos de descontração;

A todos do LNBio que, de alguma forma, contribuíram neste trabalho, seja por cuidar da manutenção do laboratório, por dividir um equipamento ou reagente, ou pela troca de ideias e experiências. Obrigada a todos!

Aos membros da banca por terem aceitado participar da avaliação desse trabalho;

Ao apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (Processo 2010/15760-2);

Ao Laboratório Nacional de Biociências, LNBio, e Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, CNPEM;

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular do IB, UNICAMP;

SUMÁRIO

AGI	AGRADECIMENTOSix		
LIS	TA DE A	ABREVIAÇÕES E SIGLAS xvii	
RES	SUMO	xix	
ABS	STRACT	xxi	
1.	INT	RODUÇÃO1	
	1.1.	A descoberta da proteína Ki-1/57 humana e os primeiros estudos 1	
	1.2.	Ki-1/57 e a proteína paráloga CGI-551	
	1.3.	Estudos em busca do papel funcional de Ki-1/57 e CGI-55	
	1.4.	Ki-1/57, CGI-55 e a resposta celular a estresses	
	1.5.	Ki-1/57 é uma proteína intrinsecamente desestruturada	
	1.6.	A SUMOilação de proteínas	
	1.7.	PML-NBs e a SUMOilação11	
	1.8.	O fator de transcrição MEF2C 12	
	1.9.	Abordagens clássicas e contemporâneas para geração de animais modificados 13	
	1.9.1	. Método clássico de recombinação homóloga em células-tronco embrionárias 14	
	1.9.2	. Modificação do genoma utilizando o sistema CRISPR/Cas9 20	
2.	OB.	JETIVOS	
Obj	etivo ger	al	
Obj	etivos esj	pecíficos	
3.	MA	TERIAL E MÉTODOS	
	3.1.	Aprovação da Comissão de Ética e Biossegurança27	
	3.2.	Técnicas de biologia molecular	
	3.3.	Cultura de células-tronco embrionárias (CTE) E14TG2A	
	3.4.	Cultura de células de mamíferos HEK293T	

3.5. (Construção do vetor alvo	28
3.5.1.	Extração de DNA genômico de células-tronco embrionárias E14TG2A	28
3.5.2.	Desenho dos oligonucleotídeos	29
3.5.3.	Amplificação dos braços de homologia 5' e 3'; e do gene MC1-tk-pA	29
3.5.4.	Descrição das etapas de construção do vetor alvo	. 31
3.6.	Geração de células-tronco embrionárias deficientes em Ki-1/57	. 33
3.6.1.	Eletroporação, seleção e congelamento dos clones	33
3.6.2.	Preparação de DNA genômico de células da placa de 96 poços	34
3.6.3.	Digestão com XbaI de DNA genômico em placa de 96 poços	34
3.6.4.	Eletroforese em gel de agarose	35
3.6.5.	Transferência neutra de DNA para a membrana	. 35
3.6.6.	Marcação radioativa da sonda de DNA	35
3.6.7.	Hibridação da membrana com a sonda marcada	. 36
3.6.8.	Confirmação do clone recombinante por PCR	36
3.6.9.	Descongelamento dos clones, expansão e congelamento dos estoques	36
3.7. 0	Cariotipagem	37
3.8. I	Ensaios de proliferação celular	37
3.9. I	RT-PCR quantitativo	37
<i>3.10</i> . I	Diferenciação de células-tronco embrionárias pelo método de Hanging drop	. 38
3.11. I	munofluorescência de corpos embrióides	. 39
3.12. I	munofluorescência de células-tronco embrionárias	39
3.13.	O sistema CRISPR/Cas9 para modificação do genoma	40
3.13.1.	Desenho das sequências alvo	40
3.13.2.	Clonagem do sgRNA no vetor px330	40
3.13.3.	Microinjeção do plasmideo circular em embrião de C57BL/6	. 41
3.13.4.	Extração de DNA genômico (gDNA) de cauda de camundongo	41

	3.13.	5. Amplificação da região do exon 1 no gene <i>Habp4</i>
	3.13.	6. Genotipagem baseada no ensaio com T7 Endonuclease I 42
	3.13.	7. Genotipagem baseada no ensaio com enzima de restrição NruI 42
	3.13.	8. Clonagem no vetor pGEM-T Easy ou pGEM-T Vector e sequenciamento 43
	3.14.	Ensaio de Hibridação de RNA in situ (ISH) 43
	3.15.	Transfecção de células HEK293T com PEI 44
	3.16.	Ensaios de transativação do gene repórter da luciferase 45
	3.17.	Curva padrão para quantificação do número de cópias dos transcritos de Habp4 45
4.	RES	SULTADOS
prolife	4.1. Ar eration a	tigo I: Ki-1/57 and CGI-55 ectopic expression impact cellular pathways involved in nd stress response regulation
PML r	4.2. nuclear	Artigo II: The human regulatory protein Ki-1/57 is a target of SUMOylation and affects bodies distribution
	4.3.	Geração de linhagem de camundongo nocaute para Ki-1/57
pote	4.3.1 encial en	Cultivo e subclonagem de células-tronco embrionárias murinas para testar seu n contribuir para geração de camundongos
	4.3.2	Recombinação homóloga no <i>locus Habp4</i>
	4.3.3	Sistema CRISPR/Cas9 para geração de linhagens de camundongo nocaute 101
5.	RES	SULTADOS COMPLEMENTARES 113
:	5.1.	Variantes de transcrito no gene <i>Habp4</i> 113
:	5.2.	A relação de Ki-1/57 e o fator de transcrição MEF2C 118
camun	5.3. Idongo	Padrões de expressão de Ki-1/57 e CGI-55 durante o desenvolvimento de embriões de
e 11	5.3.1	Análise histológica dos padrões de expressão de Ki-1/57 em embriões aos 10.5 dpc
6.	DIS	CUSSÃO

	6.1.	O envolvimento de Ki-1/57 e CGI-55 em processos de regulação da expressão gênica
	6.2.	As proteínas Ki-1/57 e CGI-55 participam de vias de proliferação e regulação da
re	esposta con	tra o estresse
	6.3.	Ki-1/57 e CGI-55 são proteínas parálogas 131
	6.4.	Ki-1/57 é modificada por SUMO e influencia na distribuição de PML no núcleo132
	6.5.	As diferenças funcionais entre as regiões N- e C-terminal de Ki-1/57 135
	6.6.	A geração do nocaute de Ki-1/57 136
	6.7.	Ki-1/57 participa da regulação transcricional de MEF2C 138
7	7. CO	DNCLUSÃO e PERSPECTIVAS 141
8	3. RI	EFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 143
9). AI	PÊNDICES

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS

Aa	Aminoácidos			
Actc1	α-actina cardíaca			
Actn2	α-actinina			
As ₂ O ₃	Trióxido de arsenico			
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridine			
CamK	calcium/calmodulin-dependent kinases			
cDNA	DNA complementar			
CGI-55	Proteína identificada por comparação genômica 3 (<i>Comparative Genome Identified 55</i>)			
CHD3	Proteína com domínios cromo-helicase e de ligação ao DNA-3 (<i>chromo-domain helicase dna binding domain protein 3</i>)			
CRISPR/Cas9	Repetições Palindrômicas Curtas Regularmente Interespaçadas e Aglomeradas (<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i> /CRISPR-associated)			
Ct	threshold cycle			
CTE	Células-tronco embrionárias			
DAXX	Proteína associada à morte (<i>Death-associated protein</i>)			
dpc	dias pós-coito			
DSB	Quebra de dupla-fita de DNA (DNA double strand break)			
E1A	Encoding region 1 of Adenoviral			
EdU	5-ethynyl-2'-deoxyuridine			
EGFP	Proteína de Fluorescência Verde (enhanced green fluorescence protein)			
EMSA	electrophoretic mobility shift assays			
FXRP/ FMRP	Proteína do retardamento mental do X frágil (Fragile X mental retardation protein)			
GADD45	Growth Arrest and DNA Damage-inducible 45			
gDNA	DNA genômico			
gRNA	RNA guia (guide RNA)			
Habp4	Hyaluronan-binding protein 4			
HDAC II	Deacetilases de Histonas de classe II			
HDR	Reparo direcionado por homologia (homology-directed repair)			
hnRNPQ	Ribonucleoproteína heterogênea nuclear Q (Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein Q)			
HSP90B1	heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1			
IHABP4	Proteína que se liga a hialuronato 4 (hyaluronan-binding protein 4)			
indels	inserções ou deleções			
kDa	kiloDalton			
Ki-1/57	Antígeno de 57 kDa do anticorpo Ki-1 (Ki-1 antigen of 57 KDa)			
LIF	Fator indutor de leucemia (Leukemia Inhibitory Factor)			
MAPK	mitogen-activated protein kinases			
MCK	Muscle creatine kinase			
MCI	Massa celular interna			
MEF2C	Myocyte-specific enhancer factor 2C			
Myh6	α-Cardiac myosin heavy chain			
mg	miligrama (<i>milli gram</i>)			

mRNA	RNA mensageiro (messenger RNA)			
NHEJ	nonhomologous end joining			
NMD	Non-sense mediated decay			
p21/Cdkn1a	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)			
p53/TP53	Proteína supressora de tumor de 53 kDa (tumor protein p53)			
PAI-1	Inibidor do ativador do plasminogeno 1 (plasminogen activator inhibitor 1)			
PAIRBP1	Proteína que se liga ao RNA do inibidor do ativador de plasminogênio (<i>plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein</i>)			
PAM	Motivo adjacente ao protospacer (Protospacer Adjacent Motif)			
pb	Pares de base			
PGRMC1	Componente de membrana do receptor de progesterona 1 (<i>Progesterone Receptor Membrana Component 1</i>)			
PIAS	Proteína inibidora de STAT ativada (Protein inhibitor of activated STAT)			
РКС	Proteina quinase C (protein kinase C)			
PMA	4 α -Forbol 12-miristato 13-acetato (4 α -phorbol 12-myristate 13-acetate)			
PML	Proteína da leucemia promielocítica (<i>protein of promielocytic leukemia</i>)			
PML-NB	Corpúsculo nuclear PML (PML nuclear bodies)			
PRMT1	Proteína arginina metiltransferase 1 (protein Arginine Methyltransferase 1)			
qRT-PCR	PCR em tempo real quantitativo (quantitative real time PCR)			
RACK-1	Proteína adaptadora para proteíno-quinase C-1 (<i>Receptor for activated C Kinase-1</i>)			
RanGAP1	Proteína ativadora de Ran GTPase (Ran GTPase-activating protein)			
RFLP	Polimorfismo de fragmento de restrição (<i>Restriction fragment length polymorphism</i>)			
RGG-box	Motivo rico em argininas e glicinas			
RPL38	Proteína ribossomal 1 L38 (ribosomal protein L38)			
S1P	Esfingosina 1-fosfato			
SENP	sentrin-specific proteases			
Serbp1	SERPINE1 mRNA Binding Protein 1			
SERCA	sarco/endoplasmic reticulum Ca2+-ATPase			
SFRS9	Fator de splicing rico em arginina/serina (splicing factor argine/serine rich 9)			
SG	Grânulos de estresse (stress granules)			
sgRNA	pequeno RNA guia (short-guide RNA)			
SIM	Motivo de interação com SUMO (SUMO-interacting motif)			
snRNP	small nuclear ribonucleic proteins			
SUMO	small ubiquitin-like modifier			
T7EI	T7 endonuclease I			
TALENS	Transcription activator-like effector nucleases			
TOPORS	Proteína que se liga a topoisomerase I (topoisomerase I binding protein)			
tracrRNA	trans-activating crRNA			
UBC9	Enzima conjugada a ubiquitina E2I (ubiquitin-conjugating enzyme E2I)			
ZFN	nucleases Zinc-finger			
μg	Micrograma (microgram)			
3'UTR	Three-prime untranslated regions			
5'UTR	Five-prime untranslated regions			

RESUMO

A proteína Ki-1/57 foi descoberta por reação cruzada do anticorpo monoclonal Ki-1 em células do linfoma de Hodgkin. A interação de Ki-1/57 com proteínas que participam da transcrição, processamento e estabilidade de RNA e tradução sugeriu seu envolvimento em mecanismos de regulação da expressão gênica. Uma proteína paráloga, CGI-55, possui alto grau de similaridade de sequência com Ki-1/57 e foi inicialmente identificada como uma proteína que regula a estabilidade de mRNA. Ki-1/57 e CGI-55 apresentam alguns parceiros de interação em comum, são metiladas por PRMT1 e podem localizar em pequenas estruturas nucleares e citoplasmáticas sob a ação de diferentes estímulos. Neste trabalho, realizou-se estudos funcionais em células humanas para o melhor entendimento do papel de Ki-1/57 e CGI-55 na regulação da expressão gênica e em mecanismos de resposta celular a estresse. Também, uma linhagem nocaute para Ki-1/57 utilizando o sistema CRISPR/Cas9 foi gerada e estudos de expressão de Ki-1/57 em tecidos murinos foram realizados. Por meio de análise de expressão gênica global em microarranjos de DNA, observou-se um papel predominantemente repressor de Ki-1/57 e CGI-55 após a superexpressão dessas proteínas em células humanas. Muitos dos genes alterados estão relacionados com vias de proliferação, apoptose e controle do ciclo celular, sugerindo uma possível relação funcional de ambas as proteínas com mecanismos de resposta celular a estresse. A superexpressão de Ki-1/57 e CGI-55 em células causou redução na proliferação, possivelmente devido a uma parada na fase G1 do ciclo celular. Ademais, quando Ki-1/57 foi superexpressa, observou-se um efeito protetor contra a apoptose após o tratamento com o indutor de estresse de retículo endoplasmático, tapsigargina. Também, observou-se que Ki-1/57 e CGI-55 são SUMOiladas, sendo que, a modificação de Ki-1/57 por SUMO foi importante para sua correta atividade de seleção do sítio de splicing do gene E1A. Ensaios de imunofluorescência mostraram que a superexpressão de Ki-1/57 em células HeLa afetou a distribuição de PML-NBs, importantes estruturas subnucleares formadas em resposta à estresses e funcionalmente relacionadas a SUMOilação e a regulação da transcrição. Em outra parte do trabalho, gerou-se uma linhagem de camundongos nocautes para Ki-1/57 através do sistema CRISPR/Cas9. O plasmídeo, que contém as informações para expressão da endonuclease hSpCas9 e do RNA guia para o exon um do gene Habp4, foi injetado em pró-núcleo de embrião de camundongo e gerou animais mosaicos. Esses animais foram acasalados com camundongos selvagens para segregar os alelos mutantes e originar as linhagens de heterozigotos. O intercruzamento entre dois heterozigotos gerou nocautes homozigotos viáveis e férteis. Ensaios de transativação do gene repórter da luciferase pelo fator de transcrição responsivo a estresse MEF2C foram realizados em cultura de células e a caracterização inicial de animais mutantes por qRT-PCR demonstram o potencial papel de Ki-1/57 na modulação da atividade transcricional de MEF2C. Portanto, essas descobertas, em conjunto, são evidências do papel de Ki-1/57 na regulação da expressão gênica e em mecanismos de resposta celular a estresse. O animal nocaute para Ki-1/57, desenvolvido neste trabalho, contribuirá para estudos futuros acerca da função de Ki-1/57 diante de diferentes estímulos e situações estresses.

ABSTRACT

The Ki-1/57 protein was discovered by cross-reactivity of the monoclonal antibody Ki-1 in cells of Hodgkin's lymphoma. The interaction of Ki-1/57 with proteins that participate in transcription, RNA processing and stability, and translation suggested its involvement in regulatory mechanisms of gene expression. A paralog protein, CGI-55, has high degree of sequence similarity with Ki-1/57 and was initially identified as a protein that regulates mRNA stability. Ki-1/57 and CGI-55 have some mutual interaction partners, they are methylated by PRMT1 and can locate in small nuclear and cytoplasmic structures under the action of different stimuli. In this study, functional assays were conducted in human cells for the better understanding of the Ki-1/57 and CGI-55 function to the regulation of gene expression and in the mechanisms of cellular stress response. Also, a knockout lineage for Ki-1/57 using the CRISPR/Cas9 system was generated and Ki-1/57 expression studies in mouse tissues were performed. Through global gene expression analysis on DNA microarray, it was observed a predominantly repressive role of Ki-1/57 and CGI-55 after the overexpression of these proteins in human cells. Many of the altered genes are related to proliferation pathways, apoptosis and cell cycle control, suggesting a possible functional relationship of both proteins with cellular stress response mechanisms. Overexpression of Ki-1/57 and CGI-55 in cells caused a reduction in proliferation, possibly due to an arrest in the G1 phase of the cell cycle. Moreover, when K-1/57 was overexpressed, there was a protective effect against apoptosis after treatment with the endoplasmic reticulum stress inductor, thapsigargin. In addition, it was observed that Ki-1/57 and CGI-55 are SUMOylated, wherein the modification of Ki-1/57 by SUMO was important for its right activity in the splicing site selection of the E1A gene. Immunofluorescence assays showed that overexpression of Ki-1/57 in HeLa cells affect the distribution of PML-NBs, an important subnuclear structure formed in response to a variety of stresses and functionally related SUMOylation and to transcriptional regulation. Also in this work, a knockout mice lineage for Ki-1/57 was generated through the CRISPR/Cas9 system. A plasmid, containing the information for expression of the hSpCas9 endonuclease and a guide RNA to the exon one of Habp4 gene, was injected into the pro-nucleus of mouse embryo and mosaic animals were generated. These animals were crossed with wild-type mice to segregate the mutant alleles and create the heterozygous lines. The intercrossing between two heterozygous generated viable and fertile homozygous knockouts. Luciferase reporter gene assays activated by the stress-responsive transcription factor MEF2C were performed in cell culture and initial characterization of mutant animals by qRT-PCR showed the potential role of Ki-1/57 on the MEF2C transcriptional activity modulation. Therefore, these findings together point out to the role of Ki-1/57 on the regulation of gene expression and cellular stress response mechanisms. The knockout mice for Ki-1/57, developed in this study, will contribute for future studies on the role of Ki-1/57 at different stimuli and stress situations.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A descoberta da proteína Ki-1/57 humana e os primeiros estudos

O anticorpo monoclonal Ki-1 foi o primeiro a ser utilizado na detecção específica de células malignas de linfoma de Hodgkin através da ligação com CD30, uma glicoproteína de 120 kDa localizada na superfície de células de Hodgkin (Schwab et al., 1982). A observação de que este anticorpo apresentou reação cruzada com uma proteína de 57 kDa foi um marco para a descoberta da proteína Ki-1/57 (Hansen et al., 1989).

As primeiras investigações sobre o antígeno Ki-1/57 em células análogas ao linfoma de Hodgkin, L540, revelaram que Ki-1/57 é fosforilada em resíduos de serina e treonina. A imunoprecipitação com o anticorpo Ki-1 mostrou que Ki-1/57 estava associada com atividade de quinase, o que indicou que poderia ser uma proteíno-quinase ou ainda estar associada a outras proteínas que possuíam esta atividade (Hansen et al., 1989; Kobarg et al., 1997). No entanto, não foi encontrado nenhum domínio catalítico de quinase na seqüência de Ki-1/57 (Kobarg et al., 1997). Análises de microscopia eletrônica demonstraram que Ki-1/57 é localizada no citoplasma, poros nucleares e, no núcleo associada ao nucléolo e à estruturas da cromatina (Rohde et al., 1992). Experimentos de marcação *in vivo* e de *"Pulse-chase"* revelaram que somente a forma citoplasmática da proteína Ki-1/57 é fosforilada em resíduos de serina-treonina, enquanto que a forma nuclear não parecia ter essa modificação pós-traducional (Hansen et al., 1990).

Subsequentemente, peptídeos do antígeno Ki-1/57 derivados de digestão tríptica foram sequenciados, o que permitiu a clonagem de seu cDNA que compreendia aproximadamente 60% de seu C-terminal. A sequência parcial de Ki-1/57 não revelou homologia significativa com nenhuma outra proteína de função conhecida, sugerindo uma nova proteína com função desconhecida (Kobarg et al., 1997). Através de experimentos de FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) foi possível mapear o gene de Ki-1/57 nas bandas 9q22.3-q31 no braço longo do cromossomo 9 humano (Kobarg et al., 1997). O anticorpo monoclonal A26 foi produzido para o C-terminal de Ki-1/57 e foi utilizado em análises de imunohistoquímica, revelando que esta proteína é expressa em células derivadas de vários tipos de tumores, tais como linfoma de células T, adenocarcinoma, carcinoma de próstata e carcinoma de bexiga (Kobarg et al., 1997).

1.2. Ki-1/57 e a proteína paráloga CGI-55

Foi observado que outra proteína, CGI-55, apresenta 40,7% de identidade e 67,4% de similaridade com Ki-1/57, o que sugeriu que poderiam ser proteínas parálogas e apresentar funções similares ou redundantes em células humanas (Lemos et al., 2003). Assim como Ki-1/57, CGI-55 também possui

uma localização citoplasmática e nuclear, onde pode ser observada em regiões perinucleares e nucléolo (Lemos and Kobarg, 2006).

CGI-55 foi denominada PAI-RBP1 (*PAI RNA binding protein 1*), pois foi descrita inicialmente como uma proteína envolvida com estabilidade de RNA mensageiro (mRNA), através de ligação à região 3'-UTR do mRNA do inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1 (PAI, *plasminogen activator inhibitor*) (Heaton et al., 2001). O sistema ativador de plaminogênio tem sido considerado um importante contribuidor em mecanismos de invasão e metástase de tumores sólidos, o que possibilitou a verificação da superexpressão de CGI-55 em cortes histológicos de câncer de ovário e a correlacionou com estágio avançado de tumor (Koensgen et al., 2007).

Alto nível de expressão de CGI-55 também foi descrito em tecidos de câncer de pulmão humano e em linhagem de células de carcinoma de pulmão humano com alto potencial metastásico (Sun et al., 2012). Também, a análise de diferentes sítios metastásicos em indivíduos com câncer de próstata mostrou que há alteração de expressão de CGI-55 em metástase de osso, fígado e nodo linfático (Morrissey et al., 2008). Outro trabalho identificou CGI-55 como um dos genes superexpressos na forma mais avançada de astrocitoma, o glioblastoma multiforme, através de uma abordagem de meta-análise de estudos de microarranjo que compararam tecidos normais e tumores astrocíticos e de análises de engenharia reversa por redes bayesianas de genes diferencialmente expressos nos astrocitomas (Kunkle et al., 2013). Mais recentemente, foi demonstrada uma relação inversa entre a expressão de CGI-55 (gene Serbp1), bem como de outros genes também envolvidos em processos de invasão/metástase, com o fator de transcrição SOX17 em células de câncer de esôfago. A regulação negativa de CGI-55 e dos outros genes por SOX17 ocorre via ligação do domínio de reconhecimento de DNA, HMG-box, de SOX17 nos sítios SRY contidos no promotor de CGI-55 e dos outros genes alvos. (Kuo et al., 2014).

Embora o papel biológico de Ki-1/57 em processos oncogênicos ainda seja desconhecido, foi demonstrado que o gene que a codifica, Habp4, é localizado em um bloco haplótipo com forte desequilíbrio de ligação com haplótipos de SNPs (*single nucleotide polymorphism*) associados com risco de neoplasia de cólon familiar (Gray-McGuire et al., 2010).

1.3. Estudos em busca do papel funcional de Ki-1/57 e CGI-55

Os primeiros experimentos em busca do melhor entendimento do papel funcional de Ki-1/57 foram baseados na identificação de seus parceiros de interação por meio de ensaios de duplo-híbrido em leveduras utilizando suas regiões N- e C-terminal como iscas. A partir da análise do conjunto de interações de Ki-1/57, observou-se que muitos de seus parceiros participavam de diferentes níveis dos

mecanismos de controle da expressão gênica, o que sugeriu um possível envolvimento de Ki-1/57 nesses processos. Diversos de seus interactores estão relacionados direta ou indiretamente com mecanismo de regulação da transcrição, como a proteína de remodelamento de cromatina CHD3 (Lemos & Kobarg, 2006) e fatores de transcrição: MEF2C, p53 e outros membros da família p53 (Kobarg et al., 2005; Nery et al., 2006). Outras proteínas parceiras de Ki-1/57 estão envolvidas em metabolismo de RNA: os reguladores de *splicing* de pré-mRNA hnRNPQ e SFRS9 (Bressan et al., 2009), e relacionadas ao processo de tradução RACK1, CIRP, FMRP e a proteína ribossomal RPL38 (Gonçalves et al., 2011; Nery et al., 2004; Passos et al., 2006).

Ensaios de duplo-híbrido realizados com CGI-55 identificaram diversas proteínas nucleares, muitas das quais estão relacionadas com modulação transcricional, como CHD3, Daxx, TOPORS, PIAS-1, -3 e -y (Lemos & Kobarg, 2006; Lemos et al., 2003). Muito interessantemente, foram encontrados parceiros de interação em comum para Ki-1/57 e CGI-55, como as proteínas CHD3, TOPORS, Daxx, PIAS e PRMT1, o que sugeriu que as funções de Ki-1/57 e CGI-55 pudessem estar correlacionadas e contribuiu para a hipótese de que seriam proteínas parálogas (Lemos & Kobarg 2006; Passos et al. 2006).

A caracterização da interação de Ki-1/57 com a proteína adaptadora RACK1 (*receptor of activated kinase 1*) levou à descoberta de que resíduos de treonina localizados no C-terminal de Ki-1/57 são fosforilados por proteíno-quinases da família das PKCs (*protein kinase C*). O tratamento de células HeLa com PMA, um ativador da via de PKCs, resultou na perda da interação de Ki-1/57 com RACK1 e à subsequente translocação de Ki-1/57 do núcleo para o citoplasma, sugerindo uma importância da fosforilação para a interação proteína-proteína e localização subcelular de Ki-1/57 (Nery et al., 2004). Outra modificação pós-traducional, a metilação em argininas, foi descrita tanto para Ki-1/57 quanto para CGI-55. Elas foram demonstradas por interagir e sofrer metilação em argininas pela arginino metiltransferase PRMT1 (Lee et al., 2012; Passos et al., 2006). Sob tratamento de células com o inibidor de metilação do estado de metilação celular por Adox, Ki-1/57 localizou-se em pequenas estruturas nucleares como nucléolo, onde ocorre a biogênese e maturação de ribossomos, e em corpos de Cajal e GEMS, importantes sítios para biogênese, maturação e reciclagem de pequenos complexos de proteína-RNA, os snRNP (*small nuclear ribonucleic proteins*) (Bressan et al., 2009).

Ambas, Ki-1/57 e CGI-55, apresentam motivos ricos em arginina e glicina (RGG/RXR box) bastante conservados entre si (Passos et al., 2006). Esses motivos tanto podem ser substratos para modificação por metilação (Passos et al., 2006), como também são importantes sítios para ligação de proteínas de ligação a RNA, comumente encontrados em proteínas envolvidas em regulação transcricional e processamento de RNA (Burd & Dreyfuss, 1994).

No contexto do metabolismo de RNA, Ki-1/57 interagiu com proteínas que participam de processos de *splicing* de pré-mRNA hnRNPQ e SFRS9, sendo que somente o N-terminal (1-150) de Ki-1/57 foi suficiente para a interação com SFRS9. Para a interação com hnRNPQ foi necessária a forma completa (1-413 aminoácidos) de Ki-157 (Figura 1). A ligação de Ki-1/57 ao RNA foi demonstrada por EMSA (*electrophoretic mobility shift assays*) utilizando-se uma sonda sintética de RNA rica em nucleotídeos uracila e revelou que a porção C-terminal (122-413 aminoácidos), que contém os motivos RGG box, é necessária e suficiente para tal interação com RNA. Um ensaio modelo utilizando o gene adenoviral E1A demonstrou a influência de Ki-1/57 na seleção do sítio de *splicing* desse gene e revelou que ela precisa das duas regiões, o N- e C-terminal, para uma eficiente atividade de *splicing* (Bressan et al., 2009).

Adicionalmente, no contexto da tradução, Ki-1/57 foi encontrada no complexo de alto peso molecular de pré-iniciação da tradução (43-48S) em experimentos de co-sedimentação em gradiente de sacarose e, sob condições de estresse oxidativo apresentou localização, juntamente com FXRP, em grânulos de estresses citoplasmáticos, conhecidos locais de armazenamento de RNA e fatores da maquinaria da tradução (Gonçalves et al., 2011).



Figura 1: O papel das diferentes regiões de Ki-1/57. Figura representativa das funções conhecidas do Ne C-terminal de Ki-1/57, bem como da proteína inteira. Informações obtidas em Bressan et al., 2009; Kobarg et al., 2005; Nery et al., 2004; Nery, 2005.

Embora as interações de CGI-55, obtidas por duplo-híbrido em leveduras, não tenham revelado muitas informações de seu envolvimento no contexto do metabolismo de RNA, CGI-55 foi inicialmente descrita como relacionada a mecanismos de controle de estabilidade de mRNA (Heaton et al., 2001). Mais recentemente, CGI-55 foi descrita como principal mediadora do efeito do esfingolipídeo esfingosina 1-fosfato (S1P) na estabilidade de mRNA de PAI-1 (Iwaki et al., 2012). Este lipídeo é secretado por plaquetas, mastócitos, fibroblastos no microambiente tumoral e sua expressão é aumentada em condições de hipóxia (Sabbadini, 2006). S1P liga-se ao seu receptor S1P1, o qual é associado à proteína G, resultando no aumento da expressão de CGI-55 (ou SERBP1). Nesse cenário, CGI-55 é capaz de se ligar ao 3'UTR do mRNA de PAI-1, desestabilizando-o e diminuindo sua tradução. Uma vez que PAI-1 é o principal inibidor da fibrinólise sanguínea e seus altos níveis têm sido associados com maiores riscos de eventos isquêmicos cardíacos, trombose e progressão de aterosclerose, a atuação de CGI-55 na redução da expressão de PAI-1 pode representar um importante mecanismo de defesa contra estas doenças (Iwaki et al., 2011; Iwaki et al., 2012).

Foi demonstrado que tanto Ki-1/57 quanto CGI-55 são capazes de interagir com a proteína SPINDLIN1 (SPIN1), a qual é altamente expressa em oócitos de mamíferos e que está envolvida na regulação de transcritos maternais e no recomeço da meiose do oócito durante o processo de gametogênese feminina. Tanto SPIN1 quanto CGI-55 são expressas no ovário, no oócito ovulado e no embrião em fase de pré-implantação (zigoto, embrião em estágio de 2 células, 8 células e blastocisto). Já Ki-1/57 é expressa no ovário e no embrião a partir do estágio de blastocisto (Chew et al., 2013).

SPIN1 apresenta três domínios chamados *Tudor-like*, os quais, assim como os domínios *Tudor*, reconhecem e ligam-se a resíduos de arginina metilados em motivos ricos em arginina e glicina (RGG/RXR box). A interação entre Ki-1/57 ou CGI-55 e SPIN1 ocorre via domínio *Tudor-like* de SPIN1 e, possivelmente, via os resíduos de arginina metilados de Ki-1/57 e CGI-55 (Chew et al., 2013), uma vez que elas apresentam motivos RGG/RXR box bastante conservados e sofrem metilação pela proteína arginina metiltransferase I PRMT1 (Bressan et al., 2009; Lee et al., 2012; Passos et al., 2006). CGI-55 pode formar um complexo ribonucleoproteico com SPIN1, o que sugere sua participação na regulação de transcritos maternais importantes para o recomeço da meiose em oócito (Chew et al., 2013), e reforça o seu envolvimento em processos relacionados a modulação de estabilidade de mRNA (Goodier et al., 2007; Heaton et al., 2001).

1.4. Ki-1/57, CGI-55 e a resposta celular a estresses

A identificação através do duplo-híbrido de que Ki-1/57 interage com o fator de transcrição p53 e com proteínas funcionalmente associadas a p53 (Tabela 1) sugeriu seu possível envolvimento funcional com esse fator de transcrição (Nery et al., 2006). P53 participa da manutenção da integridade do genoma da célula, sensoriamento de lesão de DNA, monitoramento do *checkpoint* G1 do ciclo celular e ativação do programa de apoptose em condições de estresses celular. Alguns genes controlados por p53 incluem p21, GADD45 e ciclina G e, entre muitas outras proteínas celulares, Daxx, Topors e MDM2, que foram descritas por interagir diretamente com p53 ou ter uma influência em sua função (Levine, 1997; Riley et al., 2008).

Os resultados do sistema de duplo-híbrido em leveduras revelaram que uma série de proteínas que interagem com as regiões C-terminal e N-terminal de Ki-1/57, também interagem ou estão associadas funcionalmente a p53 ou a p73, um membro da família de proteínas p53. Essas proteínas são: RACK1, CHD3, Topors, DAXX, PIAS-3, HMG-protein 2 like-1, Tip-60, UBC9, GADD34, NSEP-1, SF2p32. E ainda, algumas dessas proteínas que interagem com Ki-1/57 têm parceiros de interação em comum, como SUMO, Topoisomerase 1 e PML. Todas essas proteínas são funcionalmente interconectadas e estão associadas diretamente ou indiretamente a regulação da transcrição (Nery et al., 2006).

Ensaios de interação direta mostraram que p53 interage somente com a proteína Ki-1/57 inteira e a fosforilação de Ki-1/57 não interferiu na sua capacidade de se ligar a p53, no entanto, a fosforilação de p53 inibiu essa interação (Nery et al., 2006). Essa modificação pós-traducional de p53 pode influenciar positivamente ou negativamente a sua interação com promotores de DNA alvos ou com proteínas regulatórias, como a enzima conjugadora E2 UBC9 (Lin et al., 2004). Em ensaios de monohíbrido de leveduras foi mostrado ainda que Ki-1/57 é capaz de modular negativamente a atividade transcricional de p53. Isso sugere o envolvimento de Ki-1/57 com a via de p53 (Nery et al., 2006), cujos mecanismos ainda precisam ser determinados experimentalmente.

Tabela 1. Proteínas parceiras de interação de Ki-1/57 funcionalmente relacionadas ao fator de transcrição oncogênico p53. Modificado de Nery et al., 2006.

Proteínas que interagiram com Ki-1/57 ^ª	Região utilizada como isca	Também interage ou está funcionalmente associada com ^b	Domínios/função ^c
RACK1	Ki-1/57(122-413) (C-terminal)	p73 (família p53)	7 repetições WD40 /proteína adaptadora
CHD3		p73 (família p53), SUMO	2 PHD, 2 CHROMO, 1 helicase, 1 ligação a DNA/remodelamento da cromatina
Topors (p53 binding protein, LUN)		p53, SUMO, PML, Topoisomerase 1	RING/regulação da transcrição
DAXX		p53, p73, PML	SAP/ regulação da transcrição
PIAS		p53, SUMO	SAP, zf-MIZI/SUMO ligase, (regulação da transcrição?)
HMG-protein 2-like 1		p53	HMG-Box/transcrição
Tip-60		p53	Histona acetil transferase
UBC9	Ki- <mark>1/</mark> 57(1–150) (N-terminal)	p53, SUMO, PML	Domínio catalítico E2I /ubiquitinação, E2 SUMO ligase
GADD34		p53	Parada no crescimento celular e sensor de dano ao DNA
YB-1 (NSEP1)		p53	multifuncional, ativador de p53
SF2p32	· · · · ·	p53, topoisomerase 1	RRM/splicing

^a Outros sinônimos podem ser conhecidos

^b Outras proteínas parceiras podem ser conhecidas

^cOutros domínios

Em células tratadas com diferentes agentes estressores (arsenito de sódio: indutor de estresse oxidativo; 42°C: choque térmico; tapsigargina: estresse de retículo endoplasmático), Ki-1/57 localizouse em grânulos de estresse citoplasmáticos (SGs, *stress granules*) e/ou em corpúsculos de processamento (PBs, *P-bodies*) (Bressan, 2009; Gonçalves et al., 2011). CGI-55, por sua vez, também apresentou localização nessas regiões sob condições específicas de estresse celular (Goodier et al., 2007; Lee et al., 2014).

Os grânulos de estresse citoplasmáticos (SGs) e os corpúsculos de processamento (corpúsculos P, PBs) são complexos de ribonucleoproteínas mensageiras (mRNP, *messenger ribonucleoprotein*) compostas de mRNA não traduzidos. A sua formação é dinamicamente relacionada com a inibição da tradução e a desmontagem dos polissomos. Embora os SGs e os corpúsculos P possam apresentar componentes em comum, os SGs tipicamente contêm fatores de iniciação da tradução, proteínas de ligação à poli-A e a subunidade ribossomal 40S, já os corpúsculos P contêm proteínas envolvidas na degradação de mRNA e repressão da tradução (Decker & Parker, 2012). A translocação de RNA e proteínas do citoplasma para os SGs e PBs é um processo dinâmico, permitindo caracterizar essas estrutras como "capacitores" de mRNA, os quais atuam na coleta de mRNA quando estes excedem a capacidade da maquinaria de tradução e de decaimento de RNA (Anderson & Kedersha, 2009). Em células neuronais, estes grânulos são chamados grânulos de RNA neuronal e apresentam um papel importante no transporte de mRNA para regiões distantes do citoplasma como em sinapses. Também, durante a embriogênese, grânulos de ribonucleoproteínas mensageiras (mRNPs) são formados para

armazenamento de mRNA maternal e, assim, permitir a pronta tradução de proteínas durante o desenvolvimento (Anderson & Kedersha, 2009; Decker & Parker, 2012; Seydoux & Braun, 2006)

1.5. Ki-1/57 é uma proteína intrinsecamente desestruturada

As características estruturais de Ki-1/57 estão de certa forma de acordo com sua aparente promiscuidade em relação às proteínas parceiras. Estudos anteriores adotaram diferentes abordagens biofísicas para caracterizar a estrutura de Ki-1/57 e confirmaram que ela pertence à classe de proteínas intrinsicamente desestruturadas (Bressan et al., 2008).

A análise da sequência primária de aminoácidos de Ki-1/57 inteira ou somente seu C-terminal (122-413) mostrou que ela é enriquecida de resíduos que são preditos conferir regiões desordenadas. Além disso, a sequência de Ki-1/57 possui alto conteúdo de aminoácidos carregados e baixo conteúdo de aminoácidos hidrofóbicos, o que dificulta a formação de um núcleo hidrofóbico estável e desfavorece a formação de estruturas secundárias (Bressan et al., 2008). De fato, Nery e colaboradores (2006b) observaram, através de dicroísmo circular, que o N- e C- terminal de Ki-1/57 possuem baixo conteúdo de estruturas secundárias regulares. Experimentos de espalhamento de raios-X a baixos ângulos (*Small Angle X-Ray Scattering*, SAXS) indicaram que o C-terminal de Ki-1/57 apresenta um formato alongado e uma conformação parcialmente não estruturada em solução (Bressan et al., 2008). Ensaios de sensibilidade à proteinase K com o C-terminal de Ki-1/57 recombinante ou a proteína inteira (endógena) de células mostraram que Ki-1/57 é sensível a degradação por proteinase K, indicando que ela é flexível e tem características de proteína desordenada.

Este conjunto de características de Ki-1/57, isto é, seu formato alongado em solução, baixo conteúdo de estrutura secundária e susceptibilidade à degradação proteolítica indica que ela é uma proteína intrinsecamente desestruturada (Bressan et al., 2008). As proteínas dessa classe (*intrinsically unstructured proteins*) são funcionalmente envolvidas em processos celulares que requerem uma alta flexibilidade estrutural para a ligação a múltiplos parceiros em eventos de reconhecimento molecular, tais como sinalização, regulação da transcrição, tradução, dentre outros (Dyson & Wright, 2005).

1.6. A SUMOilação de proteínas

Os ensaios de duplo-híbrido em leveduras realizados anteriormente revelaram que tanto Ki-1/57 como CGI-55 podem associar-se à proteínas da maquinaria de SUMOilação (Lemos & Kobarg, 2006; Nery et al., 2006). A SUMOilação é uma modificação pós-traducional reversível que regula as funções biológicas das proteínas por meio de modificação covalente da proteína SUMO (*small ubiquitin-like*

modifier) à cadeia lateral de lisinas presentes na sequência consenso Ψ KXE (onde Ψ é um resíduo altamente hidrofóbico, K é uma lisina, X representa qualquer aminoácido e E é um ácido glutâmico) de uma proteína substrato (Geiss-Friedlander & Melchior, 2007; Johnson, 2004). As proteínas SUMOs modificam covalentemente um grande número de proteínas com importantes papéis em diversos processos celulares, incluindo a expressão de genes, estrutura de cromatina, transdução de sinal, e manutenção do genoma (Gill, 2004).

As proteínas SUMO possuem cerca de 11 KDa e, apesar de dividirem apenas 18% de similaridade de sequência de aminoácidos com a ubiquitina, apresentam uma estrutura tridimensional próxima a da ubiquitina (Bayer et al., 1998). Em mamíferos, existem quatro homólogos de SUMO: SUMO-1, -2, -3, -4, sendo que SUMO-2 e SUMO-3 são aproximadamente 96% idênticas, mas dividem apenas 50% de identidade com SUMO-1 (Geiss-Friedlander & Melchior, 2007; Gill, 2004). SUMO-4 é mais similar a SUMO-2/3, no entanto, ainda não é claro se SUMO-4 é capaz de formar conjugados *in vivo* (Owerbach et al., 2005). SUMO-2/3, mas não SUMO-1, são capazes de formar cadeias poliméricas através de sua lisina 11 (Tatham et al., 2001).

No processo de SUMOilação, todas as proteínas SUMO são expressas como formas imaturas, pois possuem uma região C-terminal de comprimento variável (2-11 aminoácidos dependendo do homólogo de SUMO) depois de um motivo invariante Glicina-Glicina (Figura 2). Antes da primeira conjugação, a proteína SUMO é proteoliticamente processada por isopeptidases específicas (*sentrin-specific proteases*; SENPs), que removem quatro aminoácidos da SUMO-1, onze da SUMO-2 e dois da SUMO-3. As etapas seguintes da SUMOilação requerem uma cascata enzimática que envolve três classes de enzimas: E1 (enzimas ativadoras), E2 (enzima conjugadora) e SUMO E3 Ligases (Geiss-Friedlander e Melchior, 2007; Gill, 2004; Johnson, 2004).



Figura 2: O ciclo de conjugação por SUMO. Extraído de Geiss-Friedlander e Melchior, 2007.

Após o processamento inicial e exposição do motivo Glicina-Glicina no C-terminal de SUMO, esta é ativada pela enzima ativadora E1 (formada pelo heterodímero AOS1/UBA2) em uma reação dependente de ATP. Essa reação resulta em uma ligação tioéster entre a região C-terminal do resíduo de Glicina e o carbono 173 na UBA2. SUMO é então transferida para o resíduo catalítico de uma cisteína da enzima conjugadora E2 (UBC9), a qual catalisa a conjugação de SUMO no substrato, resultando na formação de uma ligação isopeptídica entre o C-terminal do resíduo de glicina de SUMO e o grupo ε amino da lisina na proteína substrato. Nesta etapa, pode haver a participação de SUMO E3 ligases, as quais são enzimas que catalisam a transferência de SUMO da UBC9 para a proteína substrato (Geiss-Friedlander e Melchior, 2007; Gill, 2004; Johnson, 2004). UBC9 reconhece e modifica o substrato no motivo da sequência consenso, especificamente quando está presente em um loop extendido ou em regiões desornadas no substrato (Bernier-Villamor et al., 2002; Rodriguez et al., 2001). Essa via pode conter uma terceira enzima, conhecida como SUMO E3 ligase, que não é primordial, no entanto, sua presença pode conferir mais especificidade e aumentar a conjugação por fornecer uma conformação ótima para a transferência de SUMO da UBC9 para o substaro. Existem diferentes famílias de SUMO E3 ligases. A mais estudada, as proteínas PIAS (protein inhibitor of activated STAT), pertencem a família de proteínas que contém domínio SP-RING. Em humanos, PIAS1, PIAS3, PIASxα, PIASxβ and PIASy são conhecidas por funcionarem como SUMO E3 ligases (Geiss-Friedlander & Melchior, 2007; Nakagawa & Yokosawa, 2002; Rytinki et al., 2009). Muitas outras proteínas possuem a atividade de enzimas E3, como TOPORS, que tem sido demonstrada pro funcionar como SUMO E3 ligase para p53, aumentando a conjugação de SUMO-1 a p53 em células humanas (Weger et al., 2005).

A nível molecular, a SUMOilação altera a superfície das proteínas e, portanto, pode influenciar nas suas interações com outras macromoléculas, alterar sua localização intracelular ou modificar diretamente a atividade da proteína em que SUMO é ligada (Gareau & Lima, 2010a; Geiss-Friedlander & Melchior, 2007). A proteína SUMO interage com pequenos domínios hidrofóbicos, flanqueados por resíduos ácidos e/ou serina, denominados motivos de interação com SUMO (SIM, *SUMO-Interacting motif*). Nesse contexto, a modificação covalente por SUMO de um determinado substrato pode fornecer sítios de ligação para uma proteína interactora através do SIM. Os SIMs conferem afinidade a SUMO, podendo ocorrer *in tandem* e conferir especificidade a SUMO. A SUMOilação representa, portanto, uma maneira rápida de regular interações proteína-proteína (Gareau & Lima, 2010a; Geiss-Friedlander & Melchior, 2007; Kerscher, 2007).

1.7. PML-NBs e a SUMOilação

A proteína PML (*Promyelocytic Leukemia*) é supressora tumoral implicada na leucemia e patogênese do câncer. Ela foi orginalmente identificada como parte de uma fusão com RAR, resultado de uma translocação cromossomal associada a leucemia promielocítica aguda (Melnick & Licht, 1999). PML é modificada covalentemente por SUMO em três lisinas e apresenta um motivo de interação com SUMO (SIM, *SUMO-interacting motif*). A SUMOilação de PML tem sido considerada uma característica fundamental para a organização e a formação de pequenas estruturas subnucleares chamadas de corpúsculos nucleares PML (PML-NBs, *promyelocytic leukemia nuclear bodies*) (Duprez et al., 1999). Muitas proteínas modificadas por SUMO, como fatores de transcrição, modificadores da cromatina, e proteínas envolvidas na manutenção da integridade do genoma têm sido descritas pela localização em PML-NBs (Bernardi & Pandolfi, 2007; Kurki et al., 2003). Embora não apresentem DNA, os PML-NBs são frequentemente encontrados associados a sítios de atividade transcricional onde podem atuar como local de armazenamento e distribuição de fatores de transcrição e outras proteínas envolvidas na expressão gênica (Kiesslich et al., 2002). São estruturas dinâmicas, que participam de um ajuste fino de vias de sinalização incluindo senescência, resposta ao estresse e defesa contra infecção viral (Bernardi & Pandolfi, 2007).

Nesse contexto, a formação dos PML-NBs pode ocorrer em resposta a uma variedade de estresses. O trióxido de arsênico (As₂O₃), IFNs, CdCl₂/choque térmico, inibição de proteassomo, actinomicina-D e dano de DNA (Doxorubicina, Irradiação gama, UV, agentes alquilantes, estaurosporina e DNase), todos esses agentes externos são conhecidos por modular a organização, quantidade e tamanho dos PML-NBs (Bernardi & Pandolfi, 2007; Lallemand-Breitenbach & de Thé, 2010).

Como mencionado anteriormente, PML é sumoilada em três lisinas alvos e possui um motivo de interação com SUMO (SIM). A modificação de PML na lisina 160 não é requerida para a formação dos PML-NBs, mas é crítica para o recrutamento de proteínas parceiras. Os mutantes de PML que não são sumoilados são incapazes de recrutar os componentes clássicos dos PML-NBs, tais como sp100, uma proteína envolvida na regulação transcricional, e Daxx, um repressor transcricional e modulador da apoptose (Bernardi & Pandolfi, 2007; V Lallemand-Breitenbach et al., 2001).

Por muito tempo, acreditou-se que a formação de PML-NBs dependia da interação intermolecular entre PML-SIM e SUMO. Entretanto, Sahin e colaboradores (2014) mostraram que a nucleação de PML-NBs é resultante da multimerização dependente da oxidação de PML. O PML oxidado forma uma rede esférica, recrutando a SUMO E2 conjugadora UBC9 que, liga-se a PML e estimula a sua SUMOilação. O PML SUMOilado representa um sítio de ancoragem para a associação de proteínas parceiras através de interação SUMO-SIM. O SIM da proteína parceira interage com a SUMO ligada convalentemente na lisina 160 de PML, formando uma interação polarizada e resultando na retenção da proteína parceira dentro do PML-NB. Ainda dentro desses corpúsculos, alguns parceiros sumoilados podem também ser poli-ubiquitinados por RNF4, levando a degradação proteossomal dos mesmos. Como muitas dessas proteínas são enzimas, os PML-NBs podem atuar com sensores que facilitam e conferem sensibilidade ao estresse oxidativo não apenas para a sumoilação, mas também para outras modificações póstraducionais (Sahin et al., 2014).

1.8. O fator de transcrição MEF2C

Dentre os fatores de transcrição que foram indentificados por interagir com a proteína Ki-1/57, a relação com MEF2C foi inicialmente caracterizada em Kobarg et al., 2005. Ki-1/57 interagiu com o N-terminal desse fator de transcrição e levou a uma ligeira redução da capacidade de MEF2C de se ligar ao DNA. As proteínas MEF2 pertencem à classe de fatores de transcrição MADS-box e exercem papéis importantes na ativação dos programas gênicos que controlam proliferação, diferenciação, morfogênese, sobrevivência e apoptose em diversos tipos celulares (Potthoff & Olson, 2007). Em vertebrados, existem 4 genes na família MEF2 (*Mef2A, B, C e D*), os quais dividem alto grau de homologia na porção N-terminal. Essa região contém os domínios MADS-box e MEF, que são responsáveis pela ligação de MEF2 ao DNA, dimerização e recrutamento de co-fatores. Já o C-terminal dessas proteínas é requerido

para ativação transcricional através da ligação à sequências ricas em A/T no gene alvo (Potthoff & Olson, 2007).

Durante o desenvolvimento cardíaco, os fatores de transcrição MEF2 associam-se a genes estruturais e são expressos em precursores cardíacos e cardiomiócitos diferenciados. MEF2C é o primeiro fator da família a ser expresso em células progenitoras do miocárdio a 7.5 dias pós-coito (dpc) (Edmondson et al., 1994). A deleção da expressão de MEF2C em camundongos levou à redução da expressão de genes estruturais cardíacos e à mortalidade em 9.5 dias pós-coito (dpc) devido à falha do desenvolvimento do ventrículo direito, sugerindo que MEF2C exerce um papel crítico para o desenvolvimento cardíaco (Lin et al., 1997).

Dependendo do estímulo, seja por condições de estresse devido à sobrecarga de pressão, ou durante o desenvolvimento, os fatores MEF2 podem atuar como ativador ou repressor transcricional. Essa atividade é modulada através do amplo espectro de ativadores e repressores com as quais MEF2 interage, ou através de modificações pós-traducionais em MEF2 e em seus co-fatores, que podem resultar na alteração da localização intracelular de MEF2 e/ou do co-fator ou na alteração da afinidade de ligação de MEF2 ao DNA. Sendo assim, MEF2 atua como um "sensor" transcricional, capaz de interpretar sinais extracelulares distintos e produzir respostas transcricionais opostas (Black & Cripps, 2010).

Um exemplo é a interação de MEF2 com as deacetilases de histonas de classe II (HDACs de classe II), que formam um complexo e reprimem a transcrição por deacetilar as histonas, resultando na condensação da cromatina e reduzida acessibilidade da maquinaria transcricional em regiões de enhancers e promotores (Black & Cripps, 2010). Por outro lado, em resposta a determinados estímulos (atividade elétrica, sobrecarga de pressão, sinalização adrenérgica e outros estímulos normais durante o desenvolvimento ou pós-natal), HDACs de classe II são fosforiladas por Camk (*calcium/calmodulin-dependent kinases*), resultando na saída de HDAC do núcleo. A fosforilação de MEF2 por MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) e a dissociação de HDAC de classe II da cromatina resulta no recrutamento de acetilases de histona e co-ativadores que funcionam como ativadores transcricionais. Sendo assim, uma grande quantidade de proteínas estruturais e regulatórias podem ser sintetizadas e podem levar, por exemplo, à resposta hipertrófica (Lu et al., 2000).

1.9. Abordagens clássicas e contemporâneas para geração de animais modificados

Camundongos geneticamente modificados representam uma importante ferramenta para o entendimento da função dos genes durante o desenvolvimento embrionário, adulto e em condições de doenças. Camundongos mutantes ou transgênicos são convencionalmente gerados por microinjeção pronuclear de DNA em zigoto (Gordon & Ruddle, 1981; Ittner & Götz, 2007) ou por métodos de *gene targeting* (Capecchi, 2005). Pelos métodos convencionais de *gene targeting*, mutações são primeiramente introduzidas em *locus* específico de células-tronco embrionárias (CTE) através de recombinação homóloga. CTE modificadas são injetadas em blastocistos e podem contribuir para linhagem germinativa de animais quimeras, resultando na geração de um camundongo contendo uma modificação genética específica (Capecchi, 2005).

A produção de camundongos nocautes demanda tempo e custos, e a falta de linhagens de CTE estabelecidas para contribuir em animais quimeras na maioria de outras espécies de mamíferos, limita os estudos genéticos em outros organismos. Porém, métodos alternativos têm sido desenvolvidos para acelerar o processo de modificação do genoma de camundongos através da injeção direta de DNA ou mRNA e/ou nucleases sítio-específicas em embrião de uma célula. Estes métodos mais recentes são baseados na quebra de dupla-fita de DNA (do inglês, *double-strand break* - DSB) em *locus* específico do genoma e são passíveis de ser realizados em camundongos e em outras espécies (Bibikova et al. 2003; Bibikova et al. 2002; Elliott et al. 1998; Miller et al., 2011; Saleh-Gohari & Helleday, 2004; Sanjana et al., 2012).

Sendo assim, os próximos tópicos descrevem duas abordagens utilizadas para modificar regiões específicas do genoma: (i) Recombinação homóloga em células-tronco embrionárias; e (ii) A tecnologia CRISPR/Cas9 que tem se destacado pela relativa simplicidade, rapidez, precisão e versatilidade comparada às outras ferramentas de engenharia do genoma.

1.9.1. Método clássico de recombinação homóloga em células-tronco embrionárias

1.9.1.1. Células-tronco embrionárias (CTE), derivação e manutenção em estado indiferenciado

Pluripotentes, células-tronco embrionárias (CTE) são derivadas da massa celular interna (MCI) do blastocisto em fase de pré-implantação (Evans & Kaufman, 1981; Martin, 1981). As CTE possuem a habilidade de auto-renovação (e, portanto, crescer continuamente em cultura) e originar os derivados dos três tecidos germinativos: endoderme, ectoderme e mesoderme, bem como contribuir para a linhagem germinativa após microinjeção em blastocisto (Bradley et al. 1984). As células CTE diferem-se das células de carcinoma embrionário por manterem o cariótipo normal, mesmo após extensiva passagem (Evans & Kaufman, 1981) e diferem-se das células-tronco adultas pelo seu potencial de auto-renovação, que permite a geração de todas as células do corpo, ao invés de somente uma quantidade limitada de tipos celulares diferentes do tecido de origem.
Embora as células pluripotentes da MCI possuam tempo limitado no embrião em desenvolvimento *in vivo*, as CTE podem ser mantidas em seu estado indiferenciado por passagens prolongadas *in vitro*. Inicialmente, a capacidade de auto-renovação e o crescimento prolongado em cultura de CTE era possível por meio de co-cultura com camada suporte de fibroblastos de embrião de camundongo ou MEFs (Evans & Kaufman, 1981; Martin, 1981), indicando que os MEFs atuam, não somente como uma matriz para o crescimento das CTE, mas também fornecendo fatores de crescimento e citocinas para mantê-las proliferativas e com potencial de auto-renovação. Posteriormente, análises de meio condicionado de MEFs e estudos moleculares de CTE identificaram uma série de fatores intrínsecos e extrínsecos para a manutenção de pluripotência. Os fatores extrínsecos incluem o fator regulatório chamado *Differentiation of Inhibiting Activity* (DIA), que posteriormente foi identificado como uma citocina pleiotrópica chamada *Leukaemia Inhibitory Factor* (LIF) (Pease et al., 1990), *Bone Morphogenic Proteins* (BMP) e proteínas chamadas Wnts, enquanto os fatores intrínsecos incluem Oct4 e nanog (Boiani & Schöler, 2005).

LIF, uma citocina membro da família de Interleucina 6 (IL6), sinaliza através de seu receptor de membrana gp130. LIF liga-se ao receptor LIFR, o qual heterodimeriza com gp130, levando a ativação de quinases e transdução de sinal. A proteína STAT3 então fosforila esta forma ativa e dimérica do receptor, direciona-se ao núcleo para ativar a transcrição de genes para auto-renovação de CTE (Boiani & Schöler, 2005). Na ausência de soro, BMP4 inibe a diferenciação de CTE pela ativação de SMADs, as quais induzem os fatores Id (Boiani & Schöler, 2005). A sinalização de BMP4 inibe primariamente a diferenciação de linhagens neuronais e LIF inibe o desenvolvimento de linhagens não neuronais, ambos são requeridos para a manutenção da pluripotência de CTE em culturas sem soro (Boiani & Schöler, 2005). As proteínas WNTs estão envolvidas na manutenção de pluripotência de CTE por suprimir a diferenciação neural (Sokol, 2011).

OCT4 é um fator de transcrição que é expresso em vários estágios durante o desenvolvimento embrionário, inclusive no óvulo não fertilizado, no embrião antes da segregação entre MCI e trofoectoderme, na MCI, epilasto, células germinativas migratórias e no tecido chamado *gonadal ridge* (Chambers, 2004; Pesce & Schöler, 2001). Embora OCT4 sozinho não seja suficiente para prevenir a diferenciação de CTE, a expressão continua de OCT4 (Niwa et al., 2000) em conjunto com a ativação da via de gp130 (Chambers et al. 2004) é requerida para manter a pluripotência. Também, o fator de transcrição SOX2 pode aumentar a pluripotência por trabalhar em conjunto com OCT4 para sinergicamente ativar a transcrição de genes alvos, por exemplo, FGF4 (Ambrosetti et al., 2000).

1.9.1.2. Recombinação homóloga em células-tronco embrionárias

No início da década de 80, Mario Capecchi demonstrou que é possível inserir cópias funcionais do gene *HSV-tk (Herpex Simplex Virus-timidine kinase)* em fibroblastos deficientes em *tk* utilizando pipetas finas de vidro para inserir o plasmídeo de DNA diretamente no núcleo dessas células (Capecchi, 1980). Ele observou que, embora integrado randomicamente em um ou dois sítios cromossomais, esse plasmídeo havia sido inserido de forma altamente ordenada, formando concatâmeros. Foi então que Capecchi descobriu que células de mamíferos poderiam mediar recombinação homóloga entre moléculas exógenas recentemente adicionadas; os concatâmeros ordenados estavam sendo gerados pela recombinação homóloga entre os plasmídeos recentemente introduzidos (Folger et al., 1982).

Como a frequência de modificação gênica em células de mamíferos tende a ser baixa, para provar que células somáticas eram capazes de realizar recombinação homóloga, Capecchi utilizou a estratégia de seleção para eliminar as células que não contêm o produto de recombinação desejado. Para isso ele usou um vetor alvo contendo o gene de resistência a neomicina (neo^r) mutante e o inseriu em células que também tinham o gene neo^r mutante, mas diferente daquela presente no vetor alvo. A recombinação homóloga entre as sequências do gene neo^r do vetor alvo e das células receptoras geraram um gene neo^r funcional a partir dos dois genes defeituosos, produzindo células que eram resistentes à droga G418, que é letal para as células que faltam do gene funcional (Thomas et al., 1986).

A observação de que, a eficiência de recombinação homóloga não dependia da concentração do vetor alvo e nem do número de cópias de alvos presentes no genoma da células receptora, indicou que o limitante para a taxa de eficiência de recombinação no *locus* alvo era a presença da maquinaria celular requerida para mediar esse evento de recombinação. Esta baixa frequência era limitante para gerar um camundongo modificado por meio de injeção de DNA em zigoto de uma única célula. Foi então que as células-tronco embrionárias (CTE) em cultura, que possuem uma maquinaria mais apropriada comparada aos zigotos, surgiram como melhor alternativa para receber a modificação e, através de seleção dos eventos raros de recombinação homóloga e injeção dessas células em blastocistos, poderiam contribuir para a formação do camundongo.

Thomas & Capecchi, 1987 demonstraram que é possível realizar recombinação homóloga entre um gene endógeno e uma sequência exógena em CTE. Eles utilizaram um vetor alvo contendo sequências do gene *Hipoxantina fosforibosil transferase (Hprt1*) e o gene de seleção neo^r, resultando na interrupção do gene endógeno *Hprt1* através de inserção de neo^r. As CTEs contendo o gene *Hprt1* mutado foram resistentes à droga 6-tioguanina (6-TG) e a G418, uma vez o 6-TG mata as células que possuem o gene *Hprt1* funcional. Quando injetadas em blastocistos murinos, estas células modificadas foram capazes de contribuir para a formação de quimeras e transmitir a mutação através da linhagem germinativa (Capecchi, 1989; Capecchi, 1989; Doetschman et al.,1988; Doetschman et al., 1987; Smithies et al., 1985).

Desde então, a técnica de gene targeting em CTE de camundongos tem sido utilizada para gerar modificações genéticas em *loci* gênicos específicos com o intuito de: (1) buscar o melhor entendimento do papel dos genes através de perda de função (nocaute) ou (2) mapear a expressão do gene ou uma linhagem celular pela introdução de genes repórteres (*knockin*) ou ainda (3) investigar os efeitos de uma dada mutação em um grupo de células ou em um órgão a partir de um período específico da vida do animal (nocaute condicional).

Os vetores alvos (*targeting vectors*) são comumente utilizados para permitir a recombinação homóloga, pois contêm duas regiões de homologia com o *locus* alvo, isto é, os braços de homologia 5'e 3' (Figura 3). Estes vetores também possuem cassetes de seleção positiva e negativa; e um sítio único de enzima de restrição, localizado fora das regiões homólogas, para a linearização do vetor e aumentar a eficiência de recombinação. O marcador de seleção positiva é geralmente um gene de resistência a um antibiótico (ex., resistência à neomicina, neo^r) e apresenta duas funções: primeiro, agir como marcador de seleção, conferindo resistência à droga (G418, no caso do gene de resistência à neomicina - neo^r) e, segundo, interromper a sequência codificante do gene de interesse. Este cassete de seleção positiva é flanqueado em ambos os lados pelos braços de homologia. Assim, o tratamento das células com o antibiótico seleciona aquelas que incorporaram o vetor alvo no genoma, isto é, na região alvo através de recombinação homóloga ou em uma região randômica por recombinação não-homóloga (Capecchi, 1989a, 2005; Hasty et al. 1991; Vasquez et al., 2001; Wu et al. 2008).

A estratégia usada para enriquecer o evento de recombinação homóloga, isto é, eliminar as células que contêm inserções randômicas, inclui a adição de um gene de seleção negativa, como o *herpes virus* thymidine kinase gene (HSV-*tk*), adjacente à região de homologia no vetor alvo (Mansour et al. 1988). A exclusão do gene HSV-*tk* durante a recombinação homóloga ocorre porque o gene HSV-*tk* representa uma descontinuidade entre homologia e não-homologia existente entre o vetor alvo recombinante com a sequência alvo endógena. Quando a recombinação homóloga entre o vetor alvo e o *locus* alvo ocorrer, uma cópia genômica do gene alvo é interrompida, o que deve levar a inativação do gene, e o gene HSV-*tk*, que é localizado, no vetor alvo, fora das regiões de homologia, não é inserido no genoma. No entanto, quando a recombinação não-homóloga acontece, a inserção do DNA exógeno no genoma ocorre através das extremidades do vetor, o gene HSV-*tk* permanece ligado ao braço de homologia (Capecchi, 2005).

Portanto, a combinação da seleção positiva, isto é, crescimento na presença de G418 para células contendo o vetor alvo, e da seleção negativa, isto é, crescimento na presença das drogas ganciclovir ou

FIAU contra as células contendo integrações randômicas do vetor alvo, resulta no enriquecimento para células em que o evento de recombinação homóloga ocorreu (Capecchi, 2005). O ganciclovir e o FIAU são análogos de nucleosídeos, e quando metabolizados pela HSV-*tk* exógena (e não pela quinase de mamífero) leva a produção de um intermediário tóxico para as células que contêm o gene HSV-*tk* exógeno integrado no genoma, interferindo na replicação do DNA e levando à morte da célula (Borrelli et al., 1988).



Figura 3: Procedimentos de seleção positiva e negativa. Protocolos usados para enriquecer células-tronco embrionárias que contém uma mutação ou inserção em um dado gene (representado como gene X na figura). (A) O vetor alvo contém o gene de resistência a antibiótico localizado entre sequências homólogas ao gene X e um gene herpes virus thymidine kinase (HSV-tk) ligado em uma extremidade. O vetor é mostrado pareando com a cópia cromossomal do gene X. Recombinação homóloga entre o vetor alvo e o gene cromossomal cognato resulta na interrupção da cópia genômica do gene X e a perda do gene HSV-tk. As células serão resistentes às drogas G418 e FIAU (B) Em maior frequencia, o vetor alvo é integrado no genoma em um sítio randômico, através de recombinação não homóloga. Como a inserção não homóloga do DNA exógeno na genoma da célula ocorre através das extremidades do vetor alvo linearizado, o gene HSV-tk permanece ligado ao DNA inserido. As células, nesse caso, serão resistentes à G418 e sensíveis à FIAU. Extraído de Capecchi, 2005.

A frequência de recombinação homóloga em células de mamíferos é extremamente baixa (1 célula em 10^6 a 10^9 células). Já a recombinação não-homóloga ou inserção randômica do vetor tem uma frequência de 1 célula em 10^2 a 10^4 células (Capecchi, 1989a, 2005; Hasty et al., 1991; Vasquez et al., 2001). Ela é dependente do comprimento da sequência de homologia entre o vetor alvo e o *locus* alvo (Deng & Capecchi, 1992; Hasty & Bradley, 1993; Hasty et al.1991; Thomas & Capecchi, 1987). De

forma geral, quanto maior o comprimento da homologia, maior será esta frequência. No entanto, acredita-se que o comprimento ideal da sequência de homologia no vetor esteja em uma faixa de 5 a 10 kilobases (Hasty & Bradley, 1993).

Se a completa deficiência do gene leva a letalidade embrionária, pode haver limitação da análise da função do gene deste animal durante o desenvolvimento embrionário e no adulto. Assim, uma alternativa é a geração de um animal nocaute condicional, que permite que o gene seja inativado em um tecido ou fase do desenvolvimento embrionário específicos. O alelo nocaute condicional é produzido através da inserção de sítios loxP ou FRT em dois íntrons do gene. A expressão de recombinases, Cre ou FLP, no animal que carrega o alelo nocaute condicional catalisa a recombinação entre os sítios loxP e FRT, respectivamente, e inativa o gene (Nagy, 2000). Em geral, a expressão de Cre ou FLP é dirigida por um promotor tecido-específico e é necessário injetar tamoxifeno no camundongo mãe para ativar a recombinase e translocá-la para o núcleo, onde ela medeia a recombinação tecido-específica (Capecchi, 2005; Gu et al., 1994; Nagy, 2000).

Dado que o vetor alvo comumente integra em diferentes regiões no cromossomo, gerando modificações indesejadas, é importante realizar o mapeamento dos clones alvos para confirmar se houve a recombinação no *locus* correto. Isto pode ser feito através de análises por PCR ou Southern blot. Por meio de PCR, um primer deve anelar ao marcador de seleção positiva no vetor alvo e o outro deve anelar na sequência do cromossomo alvo. Para a análise por Southern blot, é importante identificar sondas únicas e sítios de enzimas de restrição para que a análise não seja ambígua e possa discriminar os clones recombinantes (Hasty & Bradley, 1993).

Após a seleção dos possíveis clones recombinantes com as drogas apropriadas, os próximos passos são expandi-los, congelá-los em placas de 96 poços e extrair DNA genômico para poder identificá-los por PCR ou Southern Blot (Nagy et al. 2003). O método de recuperação dos clones congelados em placas de 96 poços é muito importante e está descrito em Nagy et al., 2010.

Em seguida, as células-tronco embrionárias são utilizadas para gerar camundongos quimeras que são capazes de transmitir o gene recombinante para a progênie. Para isso, cerca de 10 a 15 células são injetadas em um blastocisto (3.5 dpc) de camundongo de cor de pelagem diferente da cor do camundongo que deu origem às células-tronco embrionárias. Os blastocistos (cerca de 10 a 14 embriões) são transferidos cirurgicamente para uma fêmea pseudo-grávida de 2.5 dpc ou para seu oviduto se ela for 0.5 dpc. Se as células contribuírem para a formação da progênie, esta poderá ser composta de filhotes de pelagem quimera, mas se não houver contribuição todos os animais terão pelagem uniforme (Capecchi, 2005; Nagy et al., 2003). O camundongo quimera é acasalado com um camundongo selvagem. Se as células-tronco embrionárias tiverem contribuído para a linhagem germinativa da quimera, toda a prole

resultante do cruzamento da quimera com o animal selvagem será heterozigota para a recombinação homóloga. Será então necessário acasalar os camundongos heterozigotos e genotipar seus filhotes para identificar os recombinantes homozigotos que seguirá a estequiometria da primeira lei de Mendel (Capecchi, 2005).

1.9.2. Modificação do genoma utilizando o sistema CRISPR/Cas9

Novas abordagens surgiram nas últimas décadas como ferramentas alternativas à recombinação homóloga em células-tronco embrionárias (Capecchi, 2005) para realizar modificações específicas no genoma em múltiplos tipos celulares e modelos de organismos. Essas abosragens são: as meganucleases, nucleases *Zinc-finger* (ZFNs) e *Transcription activator-like effector nucleases* (TALENs). Estes são métodos baseados no uso de nucleases engenheiradas compostas de domínios específicos de ligação ao DNA fusionados a módulos não específicos de clivagem de DNA (Bibikova et al., 2003; Miller et al., 2007, 2011; Sanjana et al., 2012; Smith et al., 2006). ZFNs e TALENS requerem a customização dos domínios de ligação ao DNA para cada gene alvo e a especificidade de ligação da nuclease no DNA é dependente do contexto da sequência de interesse, o que pode torná-las laboriosas, de alto custo e reduzir a acessibilidade de geração de diversos animais modificados (Gaj et al., 2013; Miller et al., 2007; Sanjana et al., 2012).

Recentemente, o sistema CRISPR/Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*/CRISPR-*associated*) surgiu como uma eficiente ferramenta para introduzir modificações específicas no genoma, através de clivagem de DNA pela endonuclease Cas9, guiada por um pequeno RNA, que pareia em vinte nucleotídeos no DNA alvo (Barrangou, 2012; Cong et al., 2013; Jinek et al., 2012). Comparado aos métodos antigos que utilizam nucleases engeheiradas para introduzir quebras de dupla-fita de DNA, ZFNs e TALENs, o sistema CRISPR/Cas9 tem se mostrados mais simples de se desenhar e construir, mais específico, e eficiente para edição de múltiplos genes simultaneamente, passível de ser realizado em diversos tipos celulares e organismos modelo (Chang et al. 2013; Cong et al. 2013; Gratz et al. 2013; Hwang et al. 2013; Jao et al. 2013; Mali et al. 2013; Wang et al. 2013; Yang et al. 2013).

Embora a aplicação do sistema CRISPR/Cas9 no contexto de edição do genoma seja recente, a compreensão da função biológica dos elementos repetitivos, conhecidos como CRISPR e encontrados em toda a diversidade de Bacteria e Archaea, levou quase duas décadas de estudos (Ishino et al.,1987; Jansen et al., 2002; Mojica et al., 2000, 2005). O *loci* CRISPR tipicamente contém um grupo de genes Cas (*CRISPR-associated*) e uma assinatura de arranjos CRISPR - uma série de pequenas sequências repetitivas (*direct repeats*) regularmente espaçadas por sequências variáveis (*spacers*), que

correspondem às sequências de elementos genéticos invasores. Enquanto os genes Cas são traduzidos em proteínas, a maioria dos arranjos CRISPR é primeiro transcrito em RNAs únicos, seguidos de processamento em pequenos CRISPR RNAs (crRNAs), os quais direcionam a atividade nucleolítica de algumas enzimas Cas para degradar DNAs de fagos invasores (Barrangou et al. 2007; Jinek et al. 2012; Mojica et al. 2005). As proteínas Cas, CRISPR RNAs (crRNAs), *trans*-activating crRNA (tracrRNA) formam complexos ribonucleicos, os quais detectam e degradam ácidos nucleicos estrangeiros, guiados pelos crRNAs (Jinek et al., 2012). Um complexo ribonucleoprotéico é criado com a proteína Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (h*Sp*Cas9) e com uma estrutura pareada formada pelo *trans*-activating crRNA (tracrRNA) e o crRNA alvo para permitir a clivagem da sequência específica do DNA invasor. Além da duplex tracrRNA:crRNA, a Cas9 também precisa de um pequeno motivo 5′-NGG (do inglês, *protospacer adjacent motif* - PAM), localizado a jusante à região complementar no DNA alvo (Figura 4) (Barrangou, 2012; Jinek et al., 2012).



Figura 4: Ilustração esquemática da clivagem de DNA pela Cas9 guiada pelo crRNA, como ocorre no sistema imune adaptativo de Bactéria e *Archaea*. A proteína Cas9 (azul claro) combina com o crRNA (vermelho) e tracrRNA (laranja) para formar um complexo de interferência ribonucleoprotéico. A sequência crRNA guia o complexo de interferência até uma sequência complementar no DNA alvo (azul escuro). Uma vez que o R-loop é formado (veja a estrutura aberta das três fitas), os domínios da Cas9 HNH e RuvC cortam em "nick" as fitas de DNA complementar e não-complementar, respectivamente, aproximadamente três nucleotídeos a montante da sequência PAM (amarelo) (modificado de Barrangou, 2012).

Considerando a potencial utilidade do sistema CRISPR/Cas9 para clivagem de DNA e modificação do genoma, Jinek e colaboradores (2012) criaram um pequeno RNA guia (do inglês, *short-guide RNA* - sgRNA) consistindo da fusão de um crRNA e tracrRNA e mostraram que este sgRNA pode guiar a endonuclease Cas9 para induzir quebra de dupla-fita de DNA (DSB) em *locus* específico no genoma. Em resposta à clivagem no DNA, mecanismos de reparo celular são estimulados (Figura 5), como a via NHEJ (do inglês, *nonhomologous end joining*) ou a via de reparo por homologia HDR (do inglês, *high-fidelity homology-directed repair*). Quando a via de reparo NHEJ é ativada, na ausência de um DNA molde, pequenas inserções ou deleções (*indels*) podem ser deixadas, o que pode resultar em

mudança do códon de leitura e/ou na criação de um códon de parada prematuro (Chen et al., 2011; Cong et al., 2013). Por outro lado, DSBs podem facilitar a recombinação homóloga através de HDR, na presença de um DNA molde exógeno, e gerar modificações definidas no genoma. O molde de reparo pode ser uma construção de vetor alvo contendo dois braços de homologia ou um oligonucleotídeo de DNA de uma única fita (ssODNs) (Chen et al., 2011).



Figura 5: Edição do genoma gerada pela maquinaria de reparo de quebra de dupla-fita de DNA (DSB). DSBs são tipicamente reparadas por NHEJ (do inglês, *nonhomologous end-joining*) ou por HDR (*homology-directed repair*). Na via de reparo sujeita a erros, NHEJ, heterodímeros formados pelas proteínas Ku ligam-se às terminações da DBS e atuam como suporte molecular para proteínas de reparo associadas. Inserções ou deleções (indels) são introduzidas quando as pontas das fitas de DNA complementares são unidas e o reparo é desalinhado devido a micro-homologia, levando a mutações que eventualmente levam a alteração do códon de leitura ou nocaute do gene. Alternativamente, as proteínas Rad51 podem unir as terminações da DSB durante a fase de HDR, recrutando fatores acessórios que direcionam recombinação genômica com os braços de homologia do DNA exógeno (Extraído de Hsu et al., 2014).

O sistema CRISPR/Cas9 tem sido aprimorado para induzir modificações específicas no DNA de mamíferos (Cong et al., 2013). Foi desenvolvido um vetor bicistrônico (Figura 6) contendo o promotor U6 de RNA polimerase III, o qual dirige a expressão do sgRNA e, o promotor de CBh, que dirige a expressão da endonuclease Cas9 de *S. pyogenes*, cujos códons foram humanizados (h*Sp*Cas9) e extremidades foram fusionadas à sinais de localização nuclear (do inglês, *nuclear localization signals* - NLSs). O sgRNA é formado por uma sequência alvo (chamada de *protospacer sequenc*e) que pareia com 20 nucleotídeos no gene de interesse e é expressa em fusão com uma sequência de RNA transativador, formando um guia de RNA para a Cas9. Um requerimento para a seleção do sítio de

clivagem pela Cas9 é a presença de uma sequência PAM (*protospacer adjacent motif*), que consiste de um 5'-NGG localizado diretamente 3' à sequência alvo de 20 pb (Cong et al., 2013; Hsu et al., 2013; Mali et al., 2013).



Figura 6: Esquema do vetor de expressão bicistrônico px330 utilizado no sistema CRISR/Cas9. Este vetor contem o promotor U6 de RNA polimerase III, o qual dirige a expressão do sgRNA e, o promotor de CBh, que dirige a expressão da endonuclease Cas9 de *S. pyogenes*, cujos códons foram humanizados (h*Sp*Cas9) e extremidades foram fusionadas à sinais de localização nuclear (*nuclear localization signals* - NLSs). A sequência alvo de 20 nucleotídeos (em azul) é clonada nos sítios de BbsI do vetor para que seja transcrita em fusão com uma sequência transativadora (parcialmente indicada em vermelho) (extraído de http://www.genome-engineering.org/crispr/).

Dado que a endonuclease Cas9 pode tolerar algumas bases mal pareadas (ou *mismatches* em inglês), cuidado especial deve ser tomado para evitar atividade de clivagem fora da sequência alvo (ou *offtarget* em inglês) (Hsu et al., 2013). Atualmente, é possível buscar no genoma, utilizando ferramentas computacionais, por possíveis sítios *offtarget* de uma dada sequência alvo (Ran, et al. 2013b; Xiao et al. 2014). Embora o padrão de bases não pareadas a serem toleradas pela Cas9 variar para cada sgRNA, demonstrou-se experimentalmente que alguns fatores interferem na tolerância da Cas9 às bases mal pareadas. Os 12 nucleotídeos mais próximos do NGG compõem a região *seed* e são mais críticos para a tolerância da nuclease. A concentração da enzima também é importante. As bases não pareadas tendem a ser mais toleradas quando a Cas9 está em altas concentrações (Hsu et al. 2013; Ran et al. 2013b). Embora a atividade de clivagem em sítios inespecíficos seja vista como uma preocupação, um desenho criterioso e a utilização de ferramentas computacionais para buscar um sgRNA mais específico pode superar esta dificuldade. Também, no contexto de geração de linhagens de animais modificados, as possíveis mutações *offtargets* acabam sendo "diluídas" a cada geração de cruzamentos ou por meio de *backcross*, e diferentes linhagens do mesmo mutante podem ser criadas para a comparação do fenótipo entre elas.

Uma alternativa para reduzir os *offtargets* é a utilização de uma endonuclease Cas9 contendo mutações em seus domínios catalíticos para convertê-la em *nickase* (h*Sp*Cas9n). Os domínios catalíticos HNH e RuvC I da endonuclease h*Sp*Cas9 clivam as fitas de DNA complementar e não-complementar, respectivamente. Uma substituição do aminoácido aspartato para alanina (D10A) no domínio RuvC I a converte em uma *nickase* de DNA (h*Sp*Cas9n) (Cong et al., 2013). Assim, uma vez que clivagens em somente uma das fitas do DNA são reparadas predominantemente pela via de reparo por excisão de base (do inglês, *base excision repair* - BER), o qual apresenta alta-fidelidade (Dianov & Hübscher, 2013), a h*sp*Cas9n pode ser utilizada para reduzir a atividade de *offtarget* através do uso de um par de sgRNAs apropriadamente espaçados e orientados para introduzir clivagens em fita simples do DNA, gerando cortes de ambas as fitas (Ran et al. 2013a).

Atualmente, o sistema CRISPR/Cas9 tem se mostrado uma ferramenta flexível para uma série de aplicações (Hsu et al., 2014). Essa versatilidade foi alcançada com a criação de uma nuclease Cas9 contendo os dois domínios catalíticos HNH e RuvC I mutados, tornando a enzima inativa ou "morta" (*dead* Cas9, dCas9). No entanto, ela ainda retém a habilidade de se ligar ao DNA através da especificidade do sgRNA. Assim, a dCas9 pode ser utilizada como plataforma para reguladores transcricional de DNA, com o intuito de ativar ou reprimir a função dos genes, pela fusão da dCas9 a domínios regulatórios (Gilbert et al., 2013). Também, dCas9 tem sido aplicada para purificar qualquer sequência do genoma especificada por um determinado sgRNA em experimentos denominados enChIP (*engineered DNA-binding molecule-mediated ChIP*). Nesse caso, a dCas9 é fusionada a um epítopo Flag para ser imunoprecipitada juntamente com o DNA genômico ligado ao sgRNA (Fujita & Fujii, 2013). Outra aplicação da dCas9 é facilitar a identificação de regiões no genoma em células vivas através da fusão da enzima com um marcador fluorescente, como GFP, e utilização de um único sgRNA (B. Chen et al., 2013).

As aplicações terapêuticas de CRISPR/Cas9 são animadoras para tratamento de desordens genéticas. Em doenças monogências em que a mutação ocorre em um único gene, Cas9 poderá ser utilizada para corrigir esta mutação. Ou ainda, para desordens dominante-negativas em que o alelo afetado é haplosuficiente, o sistema CRISPR/Cas9 pode ser utilizado para inativar este alelo mutado através de NHEJ. No caso de doenças que envolvem mais de um gene, a capacidade de *multiplexing* desta tecnologia poderá corrigir o problema. Porém, ainda são necessários muitos avanços para alcançar esses benefícios terapêuticos, como o desenvolvimento de um sistema de "entrega" apropriado e eficaz para os tecidos (Hsu et al., 2014; Mali et al., 2013).

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Estudar os aspectos funcionais da proteína reguladora Ki-1/57 em células humanas para o melhor entendimento do seu envolvimento na regulação da expressão gênica e em mecanismos de resposta celular a estresse e, gerar uma linhagem de camundongos nocautes para explorar sua possível função nesses organismos.

Objetivos específicos

- Estudar o papel de Ki-1/57 em ensaios de proliferação e morte celular diante de condições normais de cultura ou de situações indutoras de estresse;

- Investigar a SUMOilação de Ki-1/57 e contextualizar a importância desta modificação póstraducional com a função da proteína, sua localização e de seus ligantes protéicos em grânulos de estresse citoplasmáticos e em PML-NBs;

- Gerar uma linhagem de camundongos nocautes para Ki-1/57 utilizando recombinação homóloga no *locus Habp4* de células-tronco embrionárias e/ou o recente sistema CRISPR/Cas9;

3. MATERIAL E MÉTODOS



Figura 7: Fluxograma das estratégias utilizadas para obtenção do camundongo nocaute.

3.1. Aprovação da Comissão de Ética e Biossegurança

O presente trabalho recebeu aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Unicamp (protocolo n° 2661-1) e da Comissão Interna de Biossegurança do LNBio (processo n° JK 4.2.1).

3.2. Técnicas de biologia molecular

Técnicas básicas de biologia molecular foram realizadas de acordo com o manual de clonagem molecular (Sambrook et al., 1989), a menos que indicado de outra forma.

3.3. Cultura de células-tronco embrionárias (CTE) E14TG2A

A linhagem de células-tronco embrionárias (CTE) murinas E14TG2A foi cultivada, sem camada de suporte de fibroblastos fetais (MEF), em meio Knockout DMEM (Gibco), com 10^3 U/mL de fator inibidor de leucemia (ESGRO-LIF; Gibco), 0.1 mM β -mercaptoetanol, 1% v/v de aminoácidos não essenciais (MEM NEAA, Millipore), 1% v/v de piruvato de sódio (Millipore), 50 U/mL penicilina e 50 µg/mL streptomicina, 2 mM L-glutamina e 15% v/v de soro fetal bovino (FBS, Gibco). A cada dois dias ou quando atingirem 80-90% de confluência, as subculturas de CTE foram feitas com tripsina 50% v/v (Tryple Express, Gibco) a 37°C por 1 a 3 minutos. Foram plaqueadas 1 milhão de células em garrafas de cultura T25 ou 300 mil células por poço da placa de 6 poços previamente gelatinizados com 0,1% m/v de gelatina.

3.4. Cultura de células de mamíferos HEK293T

As linhagens de células HEK29T foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Gibco), 100 units/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco). As células foram mantidas em estufa à 37°C e 5% de CO2.

3.5. Construção do vetor alvo

3.5.1. Extração de DNA genômico de células-tronco embrionárias E14TG2A

Três garrafas de 25 cm² (T25) com cerca de 90% de confluência de células-tronco embrionárias (CTE) murinas, E14TG2a, foram coletadas e lavadas duas vezes com PBS 1x. As células foram lisadas com 4 mL de tampão de lise (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, EDTA 10 mM, NaCl 10 mM, Sarcosyl 0,5% e proteinase K 1 mg/mL) a 60°C por 3 horas. Em seguida foi realizada uma centrifugação a 13000 rpm por 15 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um falcon de 15 mL e foi realizada a precipitação de gDNA com tampão de precipitação (3 mL de NaCl 75 mM, 100% etanol) à temperatura ambiente por 60 min. Foram realizadas 3 lavagens com 10 mL de etanol 70% cada uma. Entre cada lavagem, esperou-se cerca de 30 a 60 min até o DNA decantar. Após a última lavagem, foi realizada uma centrifugação a 4000 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente. O pellet foi seco à temperatura ambiente durante por 16 horas. Em seguida, o gDNA foi ressuspendido em 200 µL de água deionizada estéril. A concentração foi quantificada em equipamento Nanodrop (Thermo Scientific).

3.5.2. Desenho dos oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos de DNA usados na amplificação da sequência do braço de homologia 5' foram desenhados a partir da análise de 10 kb a montante do sítio de início da tradução. Para o braço de homologia 3', o intron 5 foi analisado e utilizado para desenhar os oligosnucleotídeos. A região entre 1385 pb a 1745 pb a montante do início do braço de homologia 5' foi analisada para desenhar os oligonucleotídeos da sonda de DNA 5' utilizada no Southern Blot. A região entre 249 pb e 582 pb a jusante do final do braço de homologia 3' foi analisado para desenhar os oligonucleotídeos da sonda de restrição do gene *Habp4* e de 10 kb a montante do sítio de início da tradução e a jusante final do gene foram realizadas no programa Webcutter. Definiu-se uma região de 6,4 kb flanqueada por sítios de XbaI (Região 5') e uma região de 6 kb flanqueada por sítios de HindIII (Região 3'), como mostrado na Figura 13 A.

3.5.3. Amplificação dos braços de homologia 5' e 3'; e do gene MC1-tk-pA

Para evitar possíveis polimorfismos que reduzem a eficiência de recombinação homóloga, recomenda-se que a sequência dos braços de homologia 5' e 3' sejam isogênicas. Portanto, os braços de homologia 5' (3,3 kb) e 3' (3,8 kb) foram amplificados a partir de DNA genômico extraído da própria linhagem de CTE E14TG2A que foi utilizada para gerar o clone mutante.

Para a amplificação dos braços de homologia 5' ou 3', foram adicionados 68 ng de DNA genômico (gDNA), 1 μL de cada oligonucleotídeo sense e antisense (Tabela 2) específicos para os braços de homologia 5' ou 3' (0,2 μM de cada), 2 μL de dNTP (0,4 mM), 2 μL de MgSO4 (2 mM), 5 μL de tampão 10x PCR Taq HiFi, 0,5 μL de Taq Platinum High Fidelity, dimetilsulfóxido 2% (DMSO) e glicerol 5% (volume final da reação: 50 μL). O PCR foi realizado a uma temperatura de desnaturação inicial de 94°C por 20 segundos, seguido de 35 ciclos de amplificação, sendo que as condições de cada ciclo foram: desnaturação a 94°C por 10 segundos, anelamento e extensão a 68°C por 6 minutos, seguido de uma extensão final de 72°C por 10 minutos. Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose 1 %. Os DNAs foram purificados do gel com o QIAquick Extraction Gel Kit (QIAgen), clonados no vetor pGEM-T Easy ou pGEM-T Vector (Promega) e sequenciados com diversos primers (Tabela 2) internos para cobrir toda a extensão de homologia.

Para a amplificação do gene que codifica a timidina quinase (TK), o plasmídeo MC1-TK-PA, gentilmente concedido pelo Dr. Richard Behringer (The University of Texas, MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas, EUA), foi utilizado como *template* (620 ng) na PCR com as mesmas condições citadas anteriormente, exceto pela ausência de glicerol e DMSO, e pela presença de oligonucleotídeos

específicos para o gene TK (Tabela 2). As condições do PCR foram: tempo de desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, seguido por 5 ciclos (94°C por 1 minuto, 58°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos e 30 segundos), seguido por mais 30 ciclos (94°C por 1 minuto, 65°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos e 30 segundos), temperatura de extensão final de 72°C por 7 minutos. Após o PCR, foi realizado uma eletroforese em gel de agarose 1% com o produto do PCR, a banda na altura correspondente (cerca de 2000 pb) foi purificada do gel e o DNA obtido foi ligado no vetor pGEM-T Easy (Promega).

Nome	Sequência (5' -> 3')	Finalidade
Braço homologia 5'	CCGCGGCCGCGCGCGCCCATACCCACAAGCAGGTGA	Amplificar o braço de
sense	CTCACAACAG	homologia 5'
Braço homologia 5'	CCGCGGCCGCTCTAGAGACGCAGCCGAACGTCTCCTG	Amplificar o braço de
antisense	CATCGC	homologia 5'
Braço homologia 3'	CCCTCGAGAAGCTTCCGCCCTGTCTCCACGAGGATGT	Amplificar o braço de
sense	CCCCATCACCCACCC	homologia 3'
Braço homologia 3'	GGACTAGTTCTAGAGGACAGCTGGGACTGACTACACA	Amplificar o braço de
antisense	GCAAGTTCCAAGACAT	homologia 3'
MC1-TK sense	CCGCGGCCGCTCTAGCCTCGAGGCTAGAACTAGTGGA	Amplificar o gene TK com
	TCC	um sítio de AscI
MC1-TK antisense	GAGTCGACGGCGCGCCAAGCTTGATCTGGCCGGGGTC	Amplificar o gene TK com
	CCG	um sítio de AscI
Sonda 5' Southern	CCCTCGAGAGGACAGAGAAAGGACAAGTGG	Amplificar a sonda 5' para
Blot sense		o Southern Blot
Sonda 5' Southern	TCCAAGCTTTCTATCATCTTATACTCCCAGGTC	Amplificar a sonda 5' para
Blot antisense		o Southern Blot
Sonda 3' Southern	CCCTCGAGAAAGATGTGAGCCATGACACCC	Amplificar a sonda 3' para
Blot sense		o Southern Blot
Sonda 3' Southern	TTCAAGCTTCTTTTGTGGGACTGTATTGGGG	Amplificar a sonda 3' para
Blot antisense		o Southern Blot
Região 5' sense	CTCGAGGGCTAACAAAGTACTATCTGTGAGGTGTC	Amplificar a região 5'
Região 5' antisense	CCGCTTGCAAAGGCTAAAGCCGCTTCTAGA	Amplificar a região 5'
Região 3' sense	TCTAGAGGGATTGACTGAGTCAGGAGAAAGCTT	Amplificar a região 3'
Região 3' antisense	TCTAGACCGCTTGCAAAGGCTAAAGCCGCTTCTAGA	Amplificar a região 3'

Tabela 2: Tabela de primers usados na construção do vetor alvo e das sondas para o Southern blot.

3.5.4. Descrição das etapas de construção do vetor alvo

O vetor alvo foi construído em duas partes em paralelo:

- Parte 1: Braço de homologia 3' + gene de seleção negativa *MC1-TK-PA*.
- Parte 2: Braço de homologia 5' + genes IRES-LacZ-loxP-PGK-neo-bpA-loxP.

Construção da Parte 1:

O gene de seleção negativa *MC1-tk-pA* foi amplificado com sítios de enzima de restrição a montante e a jusante a ele para permitir a ligação dos outros elementos do vetor alvo a ele; e foi clonado no vetor pGEM-T Easy. Em seguida, o braço de homologia 3', flanqueado pelas sítios de restrição XhoI e SpeI, foi inserido a montante do gene *MC1-tk-pA* entre os mesmos sítios, como está representado no esquema abaixo:



A primeira parte do vetor foi construída usando o pGEM-T Easy e contém a seguinte sequência de sítios de restrição:

NotI/XhoI/HindIII/Homologia 3'/XbaI/SpeI/BamHI/XbaI/MC1-tk-pA/HindIII/AscI/SaII

Diversos oligonucleotídeos foram utilizados para confirmar a sequência e integridade desta primeira parte do vetor alvo.

Construção da Parte 2:

O vetor contendo o gene de seleção positiva *IRES-LacZ-loxP-PGK-neo-bpA-loxP* foi gentilmente doado pelo pesquisador Dr. Richard Behringer (The University of Texas, MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas, EUA). Este cassete de seleção *IRES-LacZ-loxP-PGK-neo-bpA-loxP*, flanqueado pelos sítios de SalI e XhoI, foi subclonado no vetor pBluesript II SK+ entre os sítios de restrição SalI e XhoI. Para esta subclonagem foi necessário realizar digestão com SalI primeiro e, em seguida com XhoI, pois estas enzimas estão muito próximas no sítio de múltipla clonagem do pBlue, e SalI necessita de um *overhang* maior. Após a digestão, o vetor foi defosforilado com fosfatase alcalina, uma vez que XhoI e SalI são enzimas complementares. A ligação foi realizada com ou sem polietileno glicol (PEG 4000) e

as bactérias transformadas foram plaqueadas com x-gal para selecionar a atividade da beta-galactosidase do cassete que contém o gene LacZ. O clone 26, originário de uma colônia azul, foi positivo para o cassete inserido.

O braço de homologia 5', flanqueado pelas enzimas de restrição NotI e SalI, foi inserido a montante do cassete *IRES-LacZ-loxP-PGK-neo-bpA-loxP* no vetor pBlue entre os sítios de restrição NotI e SalI.

Validação da integridade e função dos elementos do vetor alvo:

A confirmação do funcionamento do gene LacZ do cassete de seleção positiva foi realizada através de transformação da parte 2 do vetor "Braço de homologia 5' *IRES-LacZ-loxP-PGK-neo-bpA-loxP*" clonado no pBlue em bactérias competentes *E. coli* DH5α e plaqueamento na presença de x-gal. O outro teste do gene LacZ foi realizado em células de mamíferos. A construção "Braço de homologia 5' *IRES-LacZ-loxP-PGK-neo-bpA-loxP*" foi subclonada para o vetor de expressão em mamíferos pcDNA3.1. Células HEK293T foram transfectadas com esta construção e com os controles utilizando PEI (Polietilenimine) e foram marcadas com x-gal após 48h da transfecção.

A integridade das sequências LoxP da parte 1 do vetor foi checada através de transformação da construção "Braço de homologia 5' *IRES-LacZ-loxP-PGK-neo-bpA-loxP* pBlue" em bactérias *E. coli* DH5α (- Cre recombinase) ou DH10b modificadas para expressar Cre recombinase (+ Cre recombinase). Na presença de Cre recombinase, o gene *PGK-neo-bpA* é removido do cassete pela recombinação e clivagem nos sítios LoxP. Este teste foi avaliado por PCR com os oligonucleotídeos sense LacZ oligo 7 e antisense T7.

Ligação das duas partes do vetor alvo:

A parte 2 do vetor alvo "Braço de homologia 5' *IRES-LacZ-loxP-PGK-neo-bpA-loxP*" (cerca de 9300 pb) foi inserida a montante da primeira parte "Braço de homologia 3' *MC1-tk-pA*" (5971 pb), que estava clonado no vetor pGEM-T Easy, utilizando os sítios de enzima de restrição NotI e XhoI, como está representado no esquema abaixo:



Antes da ligação das duas partes, os DNAs foram desnaturados a 65° C por 10 min para desfazer eventuais estruturas secundárias. Após a ligação, a T4 DNA ligase foi inativada para aumentar a eficiência de transformação. O vetor alvo foi transformado em bactérias *E. coli* DH5 α por choque térmico.

Os clones do vetor alvo final foram digeridos com as enzimas de restrição NotI, XhoI e SpeI para confirmação. Foram observadas quatro bandas: cerca de 8000 pb, 5000 pb, 3800 pb e 1500 pb. A digestão com AscI deve liberou duas bandas que correspondem ao inserto inteiro de cerca de 15300 pb e ao vetor pGEM-T Easy de 3 kb. Por fim, todos os componentes do vetor foram sequenciados para checar a integridade do mesmo.

3.6. Geração de células-tronco embrionárias deficientes em Ki-1/57

3.6.1. Eletroporação, seleção e congelamento dos clones

Células-tronco embrionárias (CTE) E14TG2A foram lavadas em PBS 1x e incubadas em solução TrypLE Express (50% v/v em PBS) por 2 a 3 minutos à 37°C. Após inativação da enzima com meio de cultura, as células foram contadas e centrifugadas. A quantia de 1,2 x 10⁷ células foi adicionada em 1 mL de PBS contendo de 25 - 30 µg de DNA linearizado em uma cubeta de 0,4 cm de tamanho. A eletroporação procedeu em equipamento Bio-Rad Gene Pulser com um pulso a 230 V e capacitância de 500 µF. A constante de tempo sempre foi próxima a 6,4 mseg. As células foram plaqueadas em quatro placas de 10 cm de diâmetro e em uma placa de 6 cm de diâmetro previamente gelatinizadas. Após 24 h, o meio nas placas de 10 cm foi trocado por um meio contendo 300 µg/mL de G418 and 0,2 µM de 1-(2'-deoxy-2-fluoro'- β -D-arabinofuranosyl)-5-iodouracil (FIAU) e o meio na placa menor, de 6 cm, foi trocado por um meio novo contendo apenas 300 µg/mL de G418. O meio contendo a seleção apropriada foi trocado todos os dias.

Após seleção por oito a nove dias, as placas foram lavadas em 10 mL de PBS. As colônias foram contadas, destacadas e cobertas com 10 mL de PBS. Para seleção de colônias sadias não diferenciadas, estas foram coletadas em uma lupa utilizando uma micropipeta e transferidas para poços da placa de 96 poços contendo 30 μ L of TrypLE Express (50% v/v em PBS). As placas foram incubadas a 37°C por 5 minutos. Em seguida, meio de cultura (120 μ L/poço) foi adicionado e as colônias foram misturadas por pipetagem de 25 a 30 vezes utilizando uma pipeta multicanal. A suspensão de células foi transferida para o poço correspondente de outra placa de 96 poços gelatinizada contendo meio de cultura sem seleção. Novo meio de cultura foi adicionado todos os dias. Após quatro dias, as células foram lavadas em 150

 μ L de PBS e tripsinizadas com 30 μ L de TrypLE Express (50% v/v em PBS). Meio de cultura (100 μ L/well) foi adicionado e as células foram misturadas. Uma placa chamada de 'master plate' foi congelada contendo ³/₄ de cada clone. Para o congelamento, 100 μ L de meio de congelamento contendo 20% FBS, 20% DMSO, 60% de meio padrão ou DMEM foi adicionado em cada poço contendo 100 μ L de suspensão de células. As placas foram envoltas em parafilme e congeladas a -80°C em uma caixa de isopor. As células remanescentes, cerca de ¹/₄ de cada clone ou 30 μ L, foram mantidas em cultura até que a cor do meio se tornasse amarelo e assim permanecesse por mais um dia. Em geral, após 3 a 4 dias, as CTEtavam prontas para expansão para outras 2 ou 3 placas de 96 poços previamente gelatinizadas e eram mantidas em cultura até atingirem a confluência máxima para coleta para extração de DNA genômico.

3.6.2. Preparação de DNA genômico de células da placa de 96 poços

Para extração de DNA genômico (gDNA) de células crescendo em placas de 96 poços, cada poço foi lavado uma vez com 150 µL de PBS e lisado a 60°C por 16 h com 100 µL de tampão de lise (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA pH 8.0, 10 mM NaCl, 0.5% sarcosyl, 1 mg/mL proteinase K). A proteinase K foi adicionada ao tampão de lise apenas antes do uso. A placa foi incubada em uma câmara úmida por 16 h em forno a 60°C. No dia seguinte, as células foram precipitadas com 200 µL da mistura contendo 75 mM de NaCl em etanol absoluto por poço. A placa de 96 poços foi mantida a temperatura ambiente, sobre a bancada, por 1 h sem agitação. Os ácidos nucleicos formam precipitados filamentosos, passivos de serem observados sob uma lupa. A placa foi invertida cuidadosamente para descartar a solução de NaCl/etanol e centrifugada a 1000 rpm por 5 seg. O DNA foi lavado 3 vezes através de adição de 150 µL de etanol 70% por poço. Após a primeira e a última lavagens a placa foi centrifugada de novo. O DNA foi mantido a temperatura ambiente para secar por cerca de 1 h e foi ressuspensa em 25 µL por poço.

3.6.3. Digestão com XbaI de DNA genômico em placa de 96 poços

Uma mistura de digestão de restrição 2x concentrada foi preparara contendo: tampão Cutsmart 2x, 1 mM de spermidina, 40 unidades (U) de XbaI. O volume de 25 µL de mistura de digestão 2x concentrada foi adicionado em cada poço da placa de 96 poços contendo DNA genômico, como descrito no item 3.6.2. A digestão foi realizada a 37°C dentro de uma câmara úmida por cerca 16 h.

3.6.4. Eletroforese em gel de agarose

Para cada 50 μ L de digestão com a enzima de restrição, como descrito no item 3.6.3, 10 μ L de tampão de carregamento 6x foi adicionado por poço da placa de 06 poços. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídeo. A eletroforese foi realizada em tampão TAE 0,5x à 25 V por cerca de 20 h. Após a eletroforese, as amostras de DNA foram visualizadas em luz UV e o gel foi fotografado com uma régua.

3.6.5. Transferência neutra de DNA para a membrana

O DNA do gel foi transferido para uma membrana de nylon (Hybond-XL, GE Healthcare) utilizando um protocolo de transferência neutra. Brevemente, os géis foram incubados sob agitação lenta em solução de depurinação (11 mL de ácido clorídrico concentrado e 989 mL de água destilada) por 10 min, seguido de incubação em solução de desnaturação (87,66 g NaCl and 20 g de NaOH para 1 litro) por 30 min, lavagem do gel em água destilada entre cada passo. A transferência foi realizada em tampão SSC 20x por cerca de 16 h, com o aparato para induzir o blot por capilaridade do tampão montado de acordo com o fabricante da membrana. Em seguida, o DNA foi imobilizado na membrana através de cross-link em um equipamento UV Stratalinker 2400 (Stratagene) selecionado para o modo autocrosslink (1200 microjoules × 100 por cerca de 60 seconds). As membranas foram armazenadas secas a temperatura ambiente e lavadas em tampão SSPE 6x antes da pré-hibridação.

3.6.6. Marcação radioativa da sonda de DNA

O vetor pGEM-T Easy contendo a sonda de DNA 5' (359 pb) foi digerido com as enzimas de restrição XhoI e HindIII e separado em eletroforese em gel de agarose 0,8%. A banda do gel foi purificada e o DNA foi quantificado utilizando o espectrofotômetro Nanodrop. O DNA foi marcado com $[\alpha^{32}P]$ dCTP (10 mCi/mL) utilizando o kit Amersham Rediprime II DNA Labeling System. Brevemente, 100 ng de sonda 5' foi diluída em tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) para o volume final de 45 µL. O DNA foi desnaturado por aquecimento a 100°C por 5 min e resfriado no gelo por 5 min. Em seguida, o DNA foi centrifugado brevemente e adicionado ao tubo de reação do kit. 5 µL do isótopo foi adicionado ao tubo e misturado. A reação de marcação foi incubada a 37°C por 1 h. A reação foi, então, diluída em 50 µL de tampão TE. Os nucleotídeos livres foram removidos utilizando a coluna Quick Spin Columns for Radiolabeled DNA purification Sephadex G-50 (Roche). Para a quantificação, 1 µL de sonda purificada foi diluída 10 vezes em tampão TE e 1 µL da soda diluída foi quantificada no equipamento Tri-Carb 2910TR Liquid Scintillation Analyzer.

3.6.7. Hibridação da membrana com a sonda marcada

As membranas foram lavadas em SSPE 6x e pré-hibridadas em solução de pré-hibridação (formamida 50%, SSPE 6x, solução de Denhardt 5x, SDS 0,5% e 100 μ g/mL de esperma de salmão desnaturado) a 42°C por 2 h, sob agitação em garrafas de forno de hibridação. A hibridação foi realizada em solução de hibridação contendo formamida 50%, SSPE 6x, SDS 0,5% and 100 μ g/mL de esperma de salmão desnaturado suplementado com cerca de 1,5 x 10⁶ CPM/mL a 42°C por cerca de 16 h, sob agitação em garrafas de forno de hibridação.

Após a hibridação com a sonda 5', as membranas foram lavadas rapidamente com SSC 2x e SDS 0,5%, seguido de lavagem por 15 min a temperatura ambiente em SSC 2x e SDS 0,1%, 20 min a 37°C em SSC 1x e SDS 0,5%, 15 min a 37°C em SSC 0,1x e SDS 0,5%, e lavagem rápida em SSC 0,1x. Todas as lavagens foram lavadas em forno de hibridação sob agitação. O sinal das membranas foi verficado com Geiger e a exposição das mesmas foi realizada a -80°C por 2 dias ou mais, se fosse necessário.

3.6.8. Confirmação do clone recombinante por PCR

O clone positivo no Southern blot foi confirmado com primers que anelam no cassete LacZ e em uma sequência fora do braço de homologia 5'. O PCR foi realizado com 300 ng de DNA genômico e o kit LongAmp Taq DNA polymerase (New England Biolabs), suplementado com DMSO 2% e glicerol 5%. As condições do PCR foram: 94°C por 3 min, seguido de 35 ciclos (94°C por 30 sec, 61.5°C por 1 min, 65°C por 6 min), 65°C por 10 min e 4°C infinitamente. Os produtos do PCR foram avaliados em gel de agarose 0,8%.

3.6.9. Descongelamento dos clones, expansão e congelamento dos estoques

A placa de 96 poços foi transferida do freezer a -80°C para a incubadora a 37°C e as células foram descongeladas por 15 a 20 min ou até que houvesse apenas uma pequena pedra de gelo dentro do poço. Cada clone foi transferido para um poço da placa de 24 poços previamente gelatinizado e contendo meio de cultura padrão. O meio foi trocado todos os dias e as células foram repicadas quando necessário. Os clones foram mantidos em cultura para extração de DNA genômico, como descrito da seção 3.6.2. Os clones foram expandidos para poços da placa de 6 poços e congelados em meio de congelamento contendo 10% FBS, 10% DMSO, 80% de meio padrão ou DMEM.

3.7. Cariotipagem

Células-tronco embrionárias crescendo exponencialmente em poços da placa de 6 poços foram tratadas com 0,02 mg/mL de Demecolcina (Sigma) por 1 h para levar à desestruturação dos microtúbulos e parada da divisão celular em mitose. Em seguida, as células foram coletadas e incubadas com uma solução hipotônica (KCl 0,56%) para induzir inchamento celular. A fixação foi realizada com uma mistura 3:1 de methanol:ácido acético. Para lisar os núcleos inchados e liberar os cromossomos de cada um, gotas de suspensão de células foram feitas em lâminas de vidro à uma distância de cerca de 20-30 cm de altura. As lâminas foram coradas com Giemsa diluído 1:20 em metanol por pelo menos 15 min. Os cromossomos foram fotografados e contados.

3.8. Ensaios de proliferação celular

Células-tronco embrionárias E14TG2A selvagem e o clone heterozigoto nocaute foram plaqueados em poços da placa de 6 poços. Quando atingiram cerca de 80-90% de confluência, as células foram tratadas com 10 µM Bromodeoxyuridine (BrdU) por 3 horas a 37°C, tripsinizadas e as amostras foram marcadas com o anti-BrdU-FITC seguindo as instruções do fabricante do kit Pharmingen[™] BrdU Flow Kit. As células foram analisadas no citômetro de fluxo BD FACs Canto II do LNBio.

Células-tronco embrionárias E14TG2A selvagem e o clone heterozigoto nocaute crescendo em lamínulas de vidro foram tratadas com 20 µM 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) por 3 horas a 37°C, lavadas com PBS 1x, fixadas com paraformaldeído 4% a 4°C por 30 min e lavadas com PBS 1x. A detecção das células foi realizada com Alexa488-azida como descrito em Salic & Mitchison (2008). As imagens foram retiradas no microscópio confocal Laser Scanning Microscope Leica TCS SP8a do LNBio.

3.9. RT-PCR quantitativo

As células crescendo em poços da placa de 6 poços ou tecidos de camundongo macerados em nitrogênio líquido foram coletados em 1 mL de TRizol (Invitrogen). O RNA total foi extraído segundo as instruções do fabricante. Em seguida, as amostras de RNA (5 µg) foram tratadas com DNaseI RNase free (Invitrogen) e transcritas em primeira fita de cDNA utilizando a enzima Transcriptase Reversa MMLV (Invitrogen) ou Superscript III (invitrogen), Oligo(dT)₂₀ Primer e RNaseOUT. Para a análise de expressão das diferentes variantes de transcrito, também foi utilizado um mix de oligodT e random primer (6 µM de cada) na reação de transcrição reversa.

Os ensaios de qRT-PCR foram realizados em triplicata, com volume final de 10 µL contendo 0,8 µL de cDNA diluído 1:3, oligonucleotideos para cada gene específico (Tabela 3), SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e água deionizada, no equipamento Applied Biosystems 7500 Systems. As condições de ciclo padrão são 90°C por 10 min, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 seg e 60°C por 1 min. Os dados foram analisados por quantificação relativa do gene *beta-actina* ou *Gapdh*.

Gene	Forward	Reverse
mHabp4 exon 3/4	AGAGGGAAACGAGACTTTGAGAGATA	CACAGCCACCCATGCTGTCCTCCATTC
mHabp4 exon 2/3-3	CAGAAGCGGACTCCTCGAAGA	CTGTCAACTGGTTTTTCATCGG
mHabp4 exon 4/5-6	GGTAAAGACACTAGTGATACAGAGC	GGTCATCTCTTGGACTTGGTTTTCC
mSerbp1	GAAGGAATAAGGCGAGTT	ATAATCGGTCTATCAACTGAA
mGapdh	GTCGTGGAGTCTACTGGTGTC	GAGCCCTTCCACAATGCCAAA
mPou5f1	GCTAGAGAAGGATGTGGTT	AGTATTGAGTATTCCCAACGA
mMEF2C all	CTGTTCCACCTCCCAGCTTT	CCCAGTGTGCTGACAGGATT
mMyh6	CTGCTCTCCACCGGGAAAAT	GTTGTCCATCACCCCTGGAG
rACTC1	TATGCCTTACCCCATGCCAT	TCACGTTCAGCGGTGGTGACA
rACTN2	CCAACATGCTAATGAGCGCC	CCCTGTGATCTGGATGGAGC
mMyoZ	CTTCAACAGGACAGCAATG	AAACTTGGGCATCTGGAA
mMCK	ATGACCACTTCCTGTTTGACA	CAAGGAAGCTTTTGTTGTCGT
mCdkn1a (p21)	GTCTTGCACTCTGGTGTCTG	ATCTGCGCTTGGAGTGATAG

Tabela 3: Lista de primers usados no ensaio de qRT-PCR.

3.10. Diferenciação de células-tronco embrionárias pelo método de Hanging drop

A diferenciação de células-tronco embrionárias (CTE) foi realizada em meio de cultura padrão sem LIF, uma citocina que mantém a pluripotência das células (Boheler, 2002; Kim et al., 2009; Zhang et al., 2012). Uma suspensão contendo 1000 células em 20 µL de meio foi preparada e gotas de 20 µL foram colocadas na tampa de placas de Petri as quais foram invertidas (Dia 0). As placas foram preenchidas com 10 mL de água deionizada estéril na sua base para evitar o ressecamento, e posteriormente incubadas por 3 dias até que houvesse a formação dos corpos embrióides (CE). No dia 3, os CE foram coletados para uma placa de Petri (não aderente), onde foram mantidos em suspensão por 2 dias em meio de diferenciação. Para estimular a diferenciação neuronal, o meio de cultura foi suplementado nesta etapa com 1 µM de all-trans ácido retinóico (RA). No dia 5, os CE foram transferidos para poços contendo lamínulas de vidro previamente tratadas com gelatina 0,1%. Os primeiros focos

pulsantes foram observados a partir do dia 7 de diferenciação espontânea (sem RA) e os primeiros neuritos foram observados a partir do dia 8 de diferenciação na presença de RA (Figura 21).

3.11. Imunofluorescência de corpos embrióides

Os CE aderidos em lamínulas de vidro foram fixados com 4% de paraformaldeído a 4°C por 15 min e lavados com PBS 1x. Em seguida, eles foram incubados em uma solução de bloqueio preparada em PBS 1x contendo 49,6 mM glicina, 1% BSA e 0,1% Triton X-100 a temperatura ambiente por 20 min. Em seguida, eles foram lavados 3 vezes em solução de bloqueio diluído 5 vezes em PBS 1x. Os anticorpos primários foram preparados em PBS 1x, 3% BSA e 0,1% Triton X-100. A Tabela 4 resume os anticorpos primários utilizados na imunofluorescência. Após a incubação dos anticorpos primários por 16h a 4°C, as lamínulas foram lavadas 3 vezes com a solução de bloqueio diluída 5 vezes. Os anticorpos secundários foram preparados em PBS 1x, 3% BSA e 0,1% Triton X-100 (Alexa 488 chicken anti-goat e Alexa 546 donkey anti-rabbit ou Alexa 488 chicken anti-mouse e Alexa 546 donkey antirabbit) diluídos 1:300. O corante de núcleo Hoechst foi incubado em PBS 1x diluído 1:200 por 15 min. As células foram lavadas 5 vezes e as lâminas foram montadas com Prolong Gold (Invitrogen).

Imunógeno	Fabricante	Origem	Diluição (IF)
Nestin	Millipore (MAB 353)	Camundongo	(1:200)
Map2	Cell Signalling (#4542S)	Coelho	(1:200)
Beta III			(1.500)
tubulin	Sigma (T8660-2mL)	Camundongo	(1.500)
Gfap	DAKO (Z0334)	Coelho	(1:10000)
GATA4	Santa Cruz Biotechnology (sc-9053)	Coelho	(1:100)
Actinina	Sigma (A7811)	Camundongo	(1:100)
Oct3/4 (C-10)	Santa Cruz Biotechnology (sc-5279)	Camundongo	(1:150)
A26	Hibridoma	Camundongo	(1:1)

Tabela 4: Anticorpos primários utilizados na imunofluorescência dos corpos embrióides ou de CTE.

3.12. Imunofluorescência de células-tronco embrionárias

Em cada poço de uma microplaca de 24 poços, 20000 células E14TG2A foram plaqueadas e após 48 horas, as células foram fixadas com paraformoldeído 4% a temperatura ambiente por 10 minutos. As células foram lavadas duas vezes com PBS 1x e permeabilizadas com Triton X-100 0,3% em PBS por 10 min a temperatura ambiente. Em seguida, foram lavadas três vezes com PBS. Os aldeídos livres foram bloqueados com uma solução de glicina 100 mM em PBS por 5 min a temperatura ambiente. Foram

realizadas duas lavagens de 5 min com PBS. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com uma solução de BSA 2% em PBS por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas cinco vezes com PBS e foram incubadas com o anticorpo monoclonal anti-Oct-3/4 (Tabela 4) diluído 1:150 em PBS + BSA 2% ou com o anticorpo monoclonal A26 puro ou diluído 50% em PBS + BSA 2% por 1 hora a temperatura ambiente. Depois, as células foram lavadas cinco vezes com PBS e incubadas com o anticorpo secundário anti-mouse Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) diluído 1:350 em PBS + BSA 2% ou rodamina goat anti-mouse (1:200, diluído em PBS + BSA 2%) e DAPI (1:200) por 1 hora a temperatura ambiente e protegido da luz. Por fim, foram realizadas dez lavagens com PBS, as lâminas foram montadas com Fluoromount-G (2:3 em PBS) e armazenadas a -20°C. As imagens foram retiradas em um microscópio de fluorecência (Nikon TS100).

3.13. O sistema CRISPR/Cas9 para modificação do genoma

3.13.1. Desenho das sequências alvo

Utilizou-se a ferramenta de análise CRISPR Design Tool (http://tools.genome-engineering.org) e a ferramenta BLAST para identificar e classificar os sítios alvos mais adequados e computacionalmente predizer os sítios *offtarget* de cada sequência alvo. Alternativamente, as sequências guias podem ser desenhadas manualmente através da identificação de 20 bases imediatamente antes de uma sequência NGG. O promotor de RNA polimerase III, U6, requer que a primeira base a ser transcrita seja uma guanidina para manter a eficiência da transcrição. Portanto, se a sequência alvo de vinte nucleotídeos não iniciar com uma base guanidina, esta base foi na primeira posição da porção 5', formando uma sequência alvo de 21 bases (Ran et al., 2013).

3.13.2. Clonagem do sgRNA no vetor px330

Para cada construção de sgRNA, dois oligonucleotídeos que correspondem a fita de DNA superior e a fita inferior da sequência alvo foram anelados através da incubação da seguinte reação: 2 μ L do oligo superior a 100 μ M, 2 μ L do oligo inferior a 100 μ M, 2 μ L de tampão 10x da T4 DNA ligase buffer (New Englad Biolab) e 14 μ L de água, nas seguintes condições: incubação a 95°C por 5 min, redução para 25°C à 0.1°C/segundo, 25°C por 10 min.

Para clonagem do oligo anelado no vetor px330, a digestão e a ligação foram realizadas em um único passo. A quantidade de 1 μ L de oligo anelado (Tabela 5), 1 μ L de px330 (~400 ng), 1 μ L de tampão G 10x (Thermo Scientific), 1 μ L de tampão 10x da T4 DNA ligase (New Englad Biolab), 0.5 μ L

de BbsI (5 u), 0.5 µL de T4 DNA ligase, 0.5 µL de 10 mM ATP, 4.5 µL de água foi incubada a 37°C por 1h, 16°C por 1h, 37°C por 20 min, 55°C por 15 min e mantido a 4°C. Metade da reação de digestão/ligação foi transformada em bactéria Stb13 e plaqueada em meio LB sólido contendo 100 µg/mL de ampicilina. As colônias de bactérias cresceram em meio LB líquido contendo ampicilina e o DNA plasmideal foi extraído.

A avaliação dos clones positivos foi realizada através de PCR com o primer para o promotor U6 do vetor px330 e o primer reverso específico de cada sgRNA. O tamanho esperado do amplicon é de 250 pb. Pelo menos um clone de cada sgRNA foi sequenciado com o primer para o promotor U6.

Tabela 5: Sequência dos oligonucleotídeos utilizados na clonagem do RNA guia e na amplificação do fragmento para genotipagem.

Nome	Sequência	Finalidade
Habp4 g1 F	CACCGCAGCGCAAGCGTCGCGATG	Clonagem sgRNA 1 no px330
Habp4 g1 R	AAACCATCGCGACGCTTGCGCTGC	Clonagem sgRNA 1 no px330
Habp4 sense	CTTGCAGCCTCCCTGAGTTTCTGGT	PCR para genotipagem
Habp4 antisense	CAGCTCCTCCACGAAACCAGGAATG	PCR para genotipagem

3.13.3. Microinjeção do plasmideo circular em embrião de C57BL/6

O plasmídeo px330-Habp4-sgRNA 1 contendo a sequência do sgRNA 1 alvo para o gene de Ki-1/57 (*Habp4*) foi injetado a uma concentração de 3 ng/uL em zigoto de C57BL/6, realizado pela equipe do Laboratório de Modificação Genoma (LMG, LNBio, CNPEM)

3.13.4. Extração de DNA genômico (gDNA) de cauda de camundongo

A ponta da cauda dos animais foi cortada e adicionada a 500 μ L da seguinte solução: 100 mM Tris HCl pH 8,5, 200 mM NaCl, 0,2% SDS, 5 mM EDTA pH 8,0, 100 μ g/mL proteinase K e incubouse à 60°C, 1100 rpm por 2 horas. Os tubos foram então centrifugados a 14000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi coletado em novo tubo e 500 μ L de isopropanol foi adicionado. Inverteu-se algumas vezes para precipitar o DNA e formar o novelo de gDNA. Os tubos foram centrifugados a 10000 RPM por 2 min e lavados com etanol 70%. O pellet seco foi ressuspendido em 200 μ L de água deionizada. A concentração foi quantificada no espectrofotômetro nanodrop (Thermo Scientific).

3.13.5. Amplificação da região do exon 1 no gene Habp4

A região genômica (1200 pb) que flanqueia o sítio alvo do sgRNA 1 foi amplificada por meio de PCR com o DNA genômico extraído da cauda de camundongo. Para uma reação de 50 μ L, utilizou-se cerca de 300 ng de DNA genômico, tampão 1x da Phusion, 0,25 mM de dNTP, 0,25 μ M de Habp4 primer sense, 0,25 μ M de Habp4 primer antisense (Tabela 5), 0,75 uL de Phusion e 5% de DMSO. As condições do PCR foram 98°C de desnaturação inicial por 5 min, seguido por 35 ciclos de 98°C por 10 seg, 65°C por 15 seg e 72°C por 30 seg, 72°C de temperatura de extensão final por 5 min. Para checar a eficiência de amplificação de uma única banda de 1200 pb, 1 μ L do produto do PCR foi resolvido em gel de agarose 1%. O restante do amplicon foi purificado com Kit de purificação de PCR (Qiagen) e quantificado em espectrofotômetro nanodrop (Thermo Scientific).

3.13.6. Genotipagem baseada no ensaio com T7 Endonuclease I

A genotipagem dos animais foi realizada com a enzima T7 endonuclease I (T7EI), que possui a propriedade de reconhecer e clivar dupla-fita de DNA mal-pareada (Déclais et al., 2003; Hadden et al., 2001; Wefers et al., 2013). Como controle positivo da reação, utilizou-se uma mistura 1:1 de DNA selvagem e mutante. O DNA mutante consiste de um fragmento de 1200 pb contendo uma deleção de 16 pb no sítio de clivagem do sgRNA 1, obtido a partir de células-tronco embrionárias transfectadas com o sgRNA 1 e clonado no vetor pGEM-T Easy.

O ensaio com a T7EI foi realizado com uma mistura 1:1 de DNA dos fundadores e DNA selvagem, portanto, 100 ng de cada DNA, ou somente 200 ng de DNA do fundador. Os DNAs foram desnaturados a 95°C por 10 min e lentamente reanelados durante o resfriamento a -2°C por seg até 85 °C, seguido de resfriamento a -0,1°C por seg até 25°C. Após as etapas de desnaturação e reanelamento para a formação de heteroduplexes de DNA, os mesmos foram incubados com 0.25 u de enzima T7EI (NEB) à 37°C por 30 minutos. Em seguida, toda a reação foi resolvida em eletroforese de gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. O fragmento não digerido deve conter 1200 pb. Após a clivagem são liberadas bandas de aproximadamente 500 pb e 700 pb.

3.13.7. Genotipagem baseada no ensaio com enzima de restrição NruI

O DNA genômico extraído de células-tronco embrionárias, cauda de camundongo e embriões foi utilizado no PCR para amplificação da região do exon um no gene *Habp4*. Os produtos do PCR são submetidos a análise de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP). Basicamente,

200 ng do fragmento purificado do PCR foi incubado com 2 μ L de NEBuffer 3.1, 0,3 μ L de enzima de restrição NruI (NEB) e água para 20 μ L de volume total, à 37°C por 1 h. Os DNAs foram separados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

3.13.8. Clonagem no vetor pGEM-T Easy ou pGEM-T Vector e sequenciamento

Os fragmentos purificados do PCR realizado com DNA genômico da cauda de camundongo foram submetidos a uma reação de adenilação com Taq DNA polimerase, pois a enzima Phusion utilizada no PCR não adiciona a base adenina necessária para a clonagem no vetor pGEM-T Easy ou pGEM-T Vector. Cerca de 400-500 ng de PCR purificado foi incubado à 72°C por 30 min com 1x Fermentas buffer, 1,5 mM MgCl2, 0,4 mM dATP e 2 u Taq DNA polimerase. Em seguida, o DNA foi purificado com kit de purificação de PCR (Qiagen), concentrado em speedVac à 45°C por 15 min e clonado no vetor pGEM-T Easy ou pGEM-T Vector. A ligação foi realizada com cerca de 50 ng de vetor e 1 uL de ligase do kit (Promega) à temperatura ambiente por 2 horas. Toda a ligação foi transformada em bactéria *E. coli* DH5 α termocompetente e plaqueada em placas contendo meio LB com ampicilina e x-gal. As colônias brancas foram inoculadas em meio LB líquido contendo ampicilina; PCR de colônia líquida foi realizado. Após a preparação do DNA plasmideal, o mesmo foi sequenciado com primer T7.

3.14. Ensaio de Hibridação de RNA in situ (ISH)

As hibridações de RNA *in situ* foram realizadas em embriões de camundongo nos estágios: 9.5 dias pós-coito (dpc), 10.5 dpc e 11.5 dpc e usando sondas de RNA de Ki-1/57 ou CGI-55 (Wilkinson, 1992).

Inicialmente, os cDNAs de Ki-1/57 e CGI-55 de camundongo foram amplificados a partir de uma biblioteca de ventrículo cardíaco murino com a enzima Taq polimerase e os oligonucleotídeos específicos para cada gene. O cDNA de Ki-1/57 foi amplificado somente na presença de 4% de DMSO. Os produtos de PCR foram observados em gel de agarose 1%, o DNA foi purificado, clonado no vetor pGEM-T Easy e seqüenciado. Os clones foram então digeridos com enzimas de restrição localizadas a jusante ou a montante do gene clonado. Em seguida, o vetor linearizado foi utilizado na reação de transcrição *in vitro*, para sintetizar as sondas de RNA sense e antisense. A transcrição *in vitro* foi realizada a 37°C por 3 horas com 1 µg de DNA plasmideal linearizado, 2 µL de tampão de transcrição 10x, 1 µL de DTT 100 mM, 1 µL de mix contendo digoxigenina-11-UTP, 0,5 µL de Rnasin e 2 µL de T7 ou Sp6 RNA polimerase.

No caso de Ki-1/57, o vetor linearizado com a enzima de restrição BamHI foi utilizado na reação de transcrição com a T7 RNA polimerase, que sintetizou a sonda de RNA sense. O DNA plasmideal linearizado com a enzima HindIII foi substrato para a reação de transcrição com a SP6 RNA polimerase e gerou a sonda antisense. Já para CGI-55, a sonda sense foi transcrita com a T7 RNA polimerase utilizando o DNA plasmideal digerido com AscI. Enquanto que a sonda antisense foi sintetizada com SP6 RNA polimerase a partir de DNA plasmideal linearizado com BamHI. Após a reação de transcrição *in vitro*, as amostras foram tratadas com DNaseI e incubadas a 37°C por 15 minutos. As sondas foram purificadas em colunas 450G ou através de precipitação por 16 horas a -80°C com 5 µL de cloreto de lítio 4M, 150 µL de etanol 100% gelado e 2 µL de tRNA.

Brevemente, o protocolo de ISH consiste em: Coleta e fixação dos embriões de camundongo com paraformoldeído (PFA) 4%. Desidratação em metanol (25%, 50%, 75% e 2x100%). Pode-se armazenar em -20°C por tempo indeterminado. No primeiro dia da *in situ*: hidratação em bateria metanol (75%, 50%, 25% e 2xPBS(T)). "Bleach" com H₂O₂ (clarear o embrião), seguida por lavagens. Permeabilização com Proteinase K 10 ug/mL (tempo de incubação de acordo com o tamanho do embrião), seguida por lavagens. Pós-fixação com PFA 4%, glutaraldeído 0,2%. Pré-hibridação com solução Hyb solution em câmara úmida a 65°C por 3h. Hibridação da sonda (desnaturada e diluída em solução hyb) por 16 horas a 65°C. Lavagem quente com solução de Formamida, SSC e SDS para aumentar a estringência de ligação da sonda com o mRNA. Lavagem pós-hibridação com MAB(T)-levamisole para inativar a fosfatase alcalina endógena. Bloqueio com BBR (minimiza ligações inespecíficas). Incubação do anticorpo anti-digoxigenina conjugado com fosfatase alcalina por 16 horas a 4°C. Lavagens e revelação com BMPurple.

Após a hibridação in situ, os embriões de camundongo foram incluídos em gelatina 20% (2 banhos de 1 hora cada, a 55°C) e cortados em vibrátomo TPI Series 3000, com espessura de 70 μm cada corte.

3.15. Transfecção de células HEK293T com PEI

Células HEK293T foram plaqueadas em placas de 100 mm. Após dois dias, as células foram transfectadas com o reagente PEI (25 kDa Polyethylenimine linear, Polysciences). Para cada placa de 100 mm, foram misturados em um tubo: 400 uL de NaCl 150 mM, 6 µg de pcDNA DNA Flag Ki-1/57 ou mutantes ou pcDNA Flag CGI-55, 6 µg de pcDNA3.1 Myc UBC9 e 6 µg de pcDNA3.1 Myc SUMO-1, e 45 µL de PEI 1 mg/mL. As células permaneceram com o mix do complexo DNA-PEI em meio de cultura com soro e antibiótico por cerca de 16 horas e foram coletadas após 48 horas da transfecção.

3.16. Ensaios de transativação do gene repórter da luciferase

Para estudar o papel de Ki-1/57 na regulação da atividade transcricional de MEF2C, experimentos de transativação do gene repórter da luciferase, fusionado a elementos regulatórios responsivos a MEF2, foram realizados. Os plasmídeos contendo os elementos responsivos a MEF2 fusionado ao gene repórter *firefly luciferase*; o gene *renilla luciferase*; e pcDNA3-MEF2C foram gentilmente concedidos pelo Dr. Alisson Campos Cardoso (LNBio), que obteve os dois primeiros plasmídeos citados do Dr. Eric Olson (The University of Texas, Southwestern Medical Center).

Células HEK293T foram transfectadas em poços da placa de 24 poços utilizando lipofectamina (Invitrogen). Os seguintes DNAs foram utilizados: 1 µg do plasmídeo do elemento regulatório responsivo a MEF2 fusionado ao gene repórter *firefly luciferase*, 200 ng do plasmídeo do gene repórter da *renilla luciferase*, 1 µg de pcDNA-MEF2C e 1 µg de pcDNA flag-Ki-1/57 ou pcDNA flag-CGI-55 ou o vetor pcDNA flag vazio. Após 48 horas da transfecção, as células foram coletadas de acordo com as instruções do kit Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega). 50 µL do lisado foi adicionado a 25 µL de substrato Luciferase Assay Reagent II (luciferina de besouro) e a leitura do gene repórter da *firefly luciferase* foi realizada. Em seguida, ao mesmo tubo foram adicionados 25 µL do Stop & Glo Reagent (coelentarazina), que apaga a luminescência da firefly e a luminescência da firefly foi normalizada através da divisão das leituras da firefly pela *renilla luciferases* e o valor foi multiplicado por 10000. Os dados foram analisados pelo One-way ANOVA, seguido pelo post-hocTukey test.

3.17. Curva padrão para quantificação do número de cópias dos transcritos de Habp4

Para avaliar a eficiência de amplificação de cada par de primer para o gene *Habp4* utilizado no ensaio de qRT-PCR e para quantificar o número de cópias de transcritos desse gene nas amostras estudadas, uma curva padrão foi construída de forma que o cDNA de *Habp4* murino estivesse presente em 300 mil, 30 mil, 3 mil, 300 e 30 cópias. O cDNA utilizado possui 1236 pb e estava clonado no vetor de 3000 pb pGEM T Easy. Como plasmídeos circulares podem apresentar estruturas superenroladas (*supercoiled*) e podem superestimar a quantificação do plasmídeo (Hou et al., 2010), realizou-se a linearização no sítio de BamHI do vetor que contém o cDNA de *Habp4* e obteve-se a concentração de 25 ng/uL de DNA após a purificação da digestão.

Primeiro, calculou-se a massa de uma molécula de plasmídeo (vetor + cDNA) de acordo com a fórmula baixo:

m = [n] [1.09	6e-21 <u>g</u> bp
n = plasmid size (bp)	4236
e-21 = 10 ⁻²¹	E-21
n x 1,096	4603,2
n x 1,096 x 10 ⁻²¹	4,6032E-18
m = mass	4,6032E-18

Em que: *n* é o tamanho do plasmídeo (4236 pb), *m* é a massa e *e-21* é 10^{-21} . A massa de uma molécula de vetor pGEM-T Easy *Habp4* é 4,6 10^{-18} gramas.

Segundo,	calculou-se	a massa	de plasm	ídeo para	cada núm	ero de cópi	ias de	interesse:

Сору	Mass of plasmid DNA needed (g)
300000	1,38E-12
30000	1,38E-13
3000	1,38E-14
300	1,38E-15
30	1,38E-16

Terceiro, calculou-se a concentração de plasmídeo necessária para obter o número de cópias de interesse, dividindo a massa calculada no segundo passo pelo volume a ser pipetado em cada reação: Para cada 1 uL de DNA:

	Mass of		Final
Copy	plasmid DNA	Volume	concentration
	needed (g)		(g/uL)
300000	1,38096E-12	1 uL	1,38E-12
30000	1,38E-13	1 uL	1,38E-13
3000	1,38E-14	1 uL	1,38E-14
300	1,38E-15	1 uL	1,38E-15
30	1,38E-16	1 uL	1,38E-16

Diluição seriada	Fonte de plasmídeo para diluição	Conc incial (g/uL)	Vol de plasmideo (uL)	Vol de diluente (uL)	Vol final (uL)	Conc final (g/uL)	Número de cópias em 1 uL
Estoque	Estoque	2,50E-08	10	990	1000	2,50E-10	
1	Diluição 1	2,50E-10	10	990	1000	2,50E-12	
2	Diluição 2	2,50E-12	552,38	447,62	1000	1,38096E-12	300000
3	Diluição 3	1,38E-12	100,00	900,00	1000	1,38096E-13	30000
4	Diluição 4	1,38E-13	100,00	900,00	1000	1,38096E-14	3000
5	Diluição 5	1,38E-14	100,00	900,00	1000	1,38096E-15	300
6	Diluição 6	1,38E-15	100,00	900,00	1000	1,38096E-16	30

Quarto, preparou-se a diluição seriada do plasmídeo de DNA de forma a obter as concentrações calculadas no terceiro passo:

As Diluições 3, 4, 5, 6 e 7 correspondem à 300 mil, 30 mil,3 mil, 300 e 30 cópias por uL, respectivamente.

A partir do valor de inclinação de reta da curva padrão, foi possível calcular a eficiência de amplificação dos pares de primers Habp4 exon 2/3-3 e Habp4 exon 4/5-6 (Tabela 3), segundo a fórmula:

Efficiencia = $-1+10^{(-1/inclinação)}$

A curva padrão foi feita a partir de valores de ct e do log do número de cópias inicial de DNA. Obteve-se uma função linear de primeiro grau: y = ax + b, em que a é o coeficiente angular da reta (inclinação da reta) e b é o coeficiente linear da reta.

4. **RESULTADOS**

4.1. Artigo I:

Ki-1/57 and CGI-55 ectopic expression impact cellular pathways involved in proliferation and stress response regulation

Costa FC*, Saito A*, Gonçalves KA, Vidigal PM, Meirelles GV, Bressan GC, Kobarg J.

Biochimica et Biophysica Acta, 2014. **1843(12)**: 2944-56. (Reproduzido com permissão; doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.08.016)

* Autores dividem a primeira autoria.

Biochimica et Biophysica Acta 1843 (2014) 2944-2956

Contents lists available at ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbamcr

Ki-1/57 and CGI-55 ectopic expression impact cellular pathways involved in proliferation and stress response regulation



Fernanda C. Costa ^{a,1}, Ângela Saito ^{a,b,1}, Kaliandra A. Gonçalves ^{a,b}, Pedro M. Vidigal ^c, Gabriela V. Meirelles ^a, Gustavo C. Bressan ^{a,b,2,3}, Jörg Kobarg ^{a,b,d,*,3}

Laboratório Nacional de Biociências, Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Campinas, São Paulo, Brasil Pepartamento de Bioquímica-Programa de Pós-graduação em Biologia Funcional e Molecular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil ^c Laboratório de Bioinformática, Instituto de Biotecnología Aplicada à Agropecuária-BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil
^d Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes - Programa de Pós-graduação em Genética e Biología Molecular, Instituto de Biología, Universidade Estadual de Campinas, Campinas,

São Paulo, Brasil

ARTICLE INFO

Article history: Received 29 April 2014 Received in revised form 27 August 2014 Accepted 28 August 2014 Available online 7 September 2014

Keywords: Ki-1/57 CGI-55 Microarray Gene repressor Stress response Cell proliferation

ABSTRACT

Ki-1/57 (HABP4) and CGI-55 (SERBP1) are regulatory proteins and paralogs with 40.7% amino acid sequence identity and 67.4% similarity. Functionally, they have been implicated in the regulation of gene expression on both the transcriptional and mRNA metabolism levels. A link with tumorigenesis is suggested, since both paralogs show altered expression levels in tumor cells and the Ki-1/57 gene is found in a region of chromosome 9q that represents a haplotype for familiar colon cancer. However, the target genes regulated by Ki-1/57 and CGI-55 are unknown. Here, we analyzed the alterations of the global transcriptome profile after Ki-1/57 or CGI-55 overexpression in HEK293T cells by DNA microchip technology. We were able to identify 363 or 190 downregulated and 50 or 27 up-regulated genes for Ki-1/57 and CGI-55, respectively, of which 20 were shared between both proteins. Expression levels of selected genes were confirmed by qRT-PCR both after protein overexpression and siRNA knockdown. The majority of the genes with altered expression were associated to proliferation, apoptosis and cell cycle control processes, prompting us to further explore these contexts experimentally. We observed that overexpression of Ki-1/57 or CGI-55 results in reduced cell proliferation, mainly due to a G1 phase arrest, whereas siRNA knockdown of CGI-55 caused an increase in proliferation. In the case of Ki-1/57 overexpression, we found protection from apoptosis after treatment with the ER-stress inducer thapsigargin. Together, our data give important new insights that may help to explain these proteins putative involvement in tumorigenic events.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

Abbreviations: HABP4, hyaluronan binding protein 4; PAIRBP1, plasminogen activator inhibitor RNA-binding protein 1; HEK293, human embryonic kidney 293 cells; TF, transcriptional factor; ER, endoplasmic reticulum; SG, stress granule; PB, processing bodies; GO, gene ontology; SUMO, small ubiquitin-like modifier; RBP, RNA-binding proteins; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; FBS, fetal bovine serum; PI, propidium iodide; SERBP1, serpine mRNA binding protein 1 * Corresponding author at: Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais,

Laboratório Nacional de Biociências, Rua Giuseppe Máximo Scolfaro 10.000, C.P. 6192, 13084–971 Campinas, São Paulo, Brasil. Tel.: + 55 19 3512 1125; fax: + 55 19 3512 1006. E-mail addresses: femanda.costa@lnbio.cnpem.br (F.C. Costa), Ingela.saito@lnbio.cnpem.br (Â Saito), kaliandra.goncalves@lnbio.cnpem.br

(K.A. Gonçalves), providigal@gmail.com (P.M. Vidigal), gabriela.meirelles@hbio.cnpem.br (G.V. Meirelles), gustavo.bressan@ufv.br (G.C. Bressan), jorg.kobarg@hbio.cnpem.br (J. Kobarg).

These authors contributed equally to this work.

² Present address: Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular-Programa de Pós-graduação em Bioquímica Agrícola, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Joint last authors.

http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.08.016 0167-4889/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Ki-1/57 (also named HABP4) has been discovered as an intracellular cross-reactant of the monoclonal antibody Ki-1, the first to specifically detect malignant cells in Hodgkin's lymphoma [1]. The protein CGI-55, also named SERBP1 (or PAIRBP1), has been first described as an RNA binding protein involved in the regulation of PAI-1 mRNA stability, by binding to its mRNA 3'UTR [2,3]. Ki-1/57 and CGI-55 share 40.7% identity and 67.4% similarity, which suggest that they might be paralogs, possibly with similar or redundant functions in human cells [4]. Yeast two-hybrid system protein-protein interaction data were obtained [4-12] and suggested that both are involved in multiple steps in gene expression regulation, although their exact roles and possible gene targets in human cells remain to be identified.

Although the relationship of Ki-1/57 with Hodgkin's disease is still unknown, further indications for the involvement of these proteins in tumorigenic processes have been reported in the literature. Familial colon cancer risk-associated SNP haplotypes have been found in strong
linkage disequilibrium with the haplotype block containing the *Ki*-1/57 gene (referred as *HABP4*) [13]. Overexpression of CGI-55 has been detected in ovarian cancer and was correlated with advanced tumor stage [14]. Also, high expression levels of CGI-55 have been found in human lung cancer tissues and in a human giant cell lung carcinoma cell line with high metastatic potential [15]. Furthermore, analysis of different metastatic sites in individuals with prostate cancer reported altered gene expression of CGI-55 in lymph node, liver and bone metastasis [16].

The protein partners identified for Ki-1/57 by yeast two-hybrid assays are involved in different gene expression regulatory processes. Many of them are directly or indirectly involved in transcriptional regulation, such as the chromatin remodeling protein CHD3 [4] and the transcription factors MEF2C and p53 [5,6]. Others are involved in the regulation of pre-mRNA splicing (hnRNPQ and SFRS9 [7]) and translation (RACK1 [17], CIRP [18], FMRP and the ribosomal protein RPL38 [19]).

The participation of Ki-1/57 in RNA metabolism has been further confirmed through its in vitro binding to U-rich RNA probes and its ability to mediate pre-mRNA splicing and translation activities of reporter genes in transfected cells [7]. Furthermore, Ki-1/57 could be found in the large molecular weight complexes of 43–48S translation pre-initiation in sucrose gradient co-sedimentation experiments [8]. Together, the interaction of Ki-1/57 with proteins involved in splicing, chromatin remodeling, transcription and translation suggests that Ki-1/57 might be involved in regulating integrated gene expression mechanisms [20].

The structural features of Ki-1/57 are also in agreement with this apparent high promiscuity of protein–protein interaction partners. Several biophysical methodologies have been approached to confirm that Ki-1/57 belongs to the growing list of eukaryotic intrinsically disordered proteins [21]. The function of this kind of proteins includes regulation of transcription and translation, cellular signal transduction and other cellular processes that require high structural flexibility to allow specific binding to multiple partners [22]. Additionally, the lack of structure of these proteins provides accessibility to post-translational modification at several sites [23], consistent with the fact that Ki-1/57 can be phosphorylated on serine/threonine residues by the protein kinase C[9] and methylated on arginines by the arginine methyltransferaes PRMTI [10].

The subcellular localization of Ki-1/57 reflects its involvement with gene expression regulation processes as well. It is located in the cytoplasm, the nuclear pores and the nucleus, where it can be found in association with nucleoli and other smaller nuclear bodies [24]. This subcellular distribution can depend on different stimuli, as observed during cell treatment with the methylation inhibitor Adox and the PKC pathway inducer PMA, which leads to a relocation of Ki-1/57 to the cytoplasm [9]. In untreated cells, Ki-1/57 can partially localize to nuclear speckles [7], a place for post-transcriptional splicing and storage of splicing factors [20]. On the other hand, upon Adox treatment, Ki-1/57 can relocalize to other dot-like substructures in the nucleus, such as nucleoli, where ribosomal biogenesis and maturation take place, and also GEMS and Cajal bodies, which are important sites for spliceosomal and non-spliceosomal snRNP biogenesis, maturation and recycling [7,20].

CGI-55 alike localizes to cytoplasm and nucleus, where it can also be observed in a punctuated fashion in the perinuclear region, the nucleoli and p80-coilin-positive coiled bodies [11]. Additionally, CGI-55 has been found in cytoplasmic stress granules (SGs) and processing bodies (p-bodies) under stress conditions [25,26]. These substructures are cytoplasmic storage sites for non-translating mRNA, and their assembly is dynamically related with the inhibition of the translation initiation and the disassembly of polysomes [27,28].

Here, we set out to obtain additional functional information on these proteins from global gene expression data. Cultured cells transiently overexpressing Ki-1/57 or CGI-55 had their total mRNAs profiled by Affymetrix microarray gene expression technology. This revealed that the affected genes are mostly involved in cellular processes such as

proliferation, apoptosis and cell cycle control. In further assays, we observed that Ki-1/57 and CGI-55 overexpressing cells showed reduced cell growth, mainly due to G1 phase arrest. Consistent with the alteration in apoptosis related gene expression, we found that Ki-1/57 overexpression can protect cells from apoptosis under treatment with the ER-stress inducer thapsigargin. Together, these data add new clues for the functional role of Ki-1/57 and CGI-55 in human cells yielding important information that contribute to explain their so far putative involvement in tumorigenic events.

2. Materials and methods

2.1. Plasmid constructs and siRNAs

Cloning of the complete cDNA encoding Ki-1/57 in fusion with the N-terminal Flag tag into pcDNA6 (pcDNA6-flag-Ki-1/57) has been previously described [29]. The N-terminally FLAG-tagged CGI-55 construct cloned into pcDNA6 Myc/His (Invitrogen) was kindly provided by John L. Goodier (University of Pennsylvania School of Medicine). Knockdown of Ki-1/57 and CGI-55 was performed using siRNA and scrambled siRNA from Ambion® In Vivo. HABP4 siRNA #87, #88, and #89 were tested for Ki-1/57 and SERBP1 siRNA #1, #2 and #3 for CGI-55. Under the tested conditions HABP4 siRNA #89 (siRNA Ki-1/57) and SERBP1 siRNA #31 (siRNA CGI-55) generated the lowest expression level of Ki-1/57 and CGI-55, respectively, compared to control cells (scrambled siRNA).

2.2. Cell culture, transient transfection and siRNA transfection

HEK293T cells were cultivated in high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma) supplemented with 1% penicillin G-streptomycin (Invitrogen) and 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Invitrogen, South America) at 37 °C and 5% CO2. For microarray experiments cells were transfected by using the calcium phosphate method [7]. For MTS assay of Ki-1/57 and CGI-55 overexpressing cells, Lipofectamine Reagent (Invitrogen) was used according to manufacturer's instructions. Transfection of cells for qRT-PCR, EdU incorporation assay, cell cycle analysis and apoptosis assay were performed with linear 25 kDa polyethylenimine (PEI, Polysciences). Briefly, cells growing in a 6-well plate were transfected with 3 µg DNA and 10 µL PEI (1 mg/mL) per well. Or cells plated in 24-well plates were transfected with 1 µg DNA and 3.3 µL PEI per well. For knockdown experiments, siRNA transfections were performed with cells growing in 6-well plates using linear 25 kDa polyethylenimine (PEI, Polysciences) with a final siRNA concentration of 50 nM and 16 µL PEI (1 mg/mL). The transfection reagent was removed after 16 h.

2.3. Total RNA isolation and microarray analysis

Total RNA was extracted from cells using TRIzol® (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions and quantified by $OD_{260 \text{ nm}}$ measurements using Nanodrop® (Thermo Scientific). Isolation of mRNA was performed with Oligotex mRNA mini Kit (Qiagen) following the manufacturer's protocol. mRNA (1 µg) of control and overexpressing Ki-1/57 or CGI-55 cells was used for microarray analysis on human genome U133 Plus 2.0 Gene Arrays (Affymetrix, Santa Clara, CA). Labeling and washing were performed according to the standard Affymetrix protocol. The arrays were scanned using a GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix). Data analysis and quality control were done using GCOS (Gene Chip Operating Software version 1.4). Quantity normalization and subsequent data processing were performed using ArrayAssist x.5 software package (Stratagene).

2.4. Quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR)

Total RNA was extracted from cells using TRIzol® (Invitrogen) and treated with DNAse I RNAse Free (Thermo Scientific). 5 µg RNA was reverse transcribed using SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen) with oligo (dT)₂₀ primers. qRT-PCR was performed with a 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems) with specific primers (Supplementary Table 1). Each real-time RT-PCR reaction (in 20 µL) contained 2 × SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), primers and template cDNA (1/100 of the cDNA reaction). The cycling conditions consisted of an initial, single step of 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C, and 1 min at 60 °C. PCR amplifications were performed in triplicates for each sample. Gene expression levels were quantified relative to the expression of β -actin endogenous control, using an optimized comparative Ct ($\Delta\Delta$ Ct) value method.

2.5. Western blot analysis

HEK293T cells were collected at indicated times after transfection and lysed in lysis buffer (20 mM Tris–HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT, 1% NP-40, 0.1% Triton X-100 and complete protease inhibitor set, Roche). Subsequently, the lysate was treated with DNAse I (Promega) and RNAse A and cleared at 14.000 × g at 4 °C for 20 min. Protein concentrations were determined using the BCA Protein Assay Reagent Kit (Thermo Scientific). Proteins from total cell lysates were separated by SDS-PAGE electrophoresis and transferred onto a PVDF membrane. After blocking with 5% skim milk for 1 h, membranes were hybridized with one of the following: monoclonal anti-FIAG M2 antibody (Sigma) or monoclonal anti- β -tubulin antibody (Abcam). After washing with TBST, membranes were incubated with a horseradish peroxidase-conjugate secondary antibody and detection was performed using the Western Blotting Luminol Reagent kit (Santa Cruz Biotechnology), according to the manufacturer's recommendations.

2.6. In silico PPI analysis

The retrieved Ki-1/57 and CGI-55 interacting partners from yeast two-hybrid screens, together with the up- and down-regulated genes identified from overexpression of Ki-1/57 and CGI-55 microarrays were integrated in interaction networks using the Integrated Interactome System (IIS) platform, developed at the Brazilian Biosciences National Laboratory, Brazil (http://www.lge.ibi.unicamp.br/Inbio/IIS/) [30]. The enriched biological processes from the Gene Ontology (GO, http:// www.geneontology.org/) database were calculated in each network using the hypergeometric distribution [30]. The enriched transcription factors for the up- and down-regulated genes were retrieved using the Enrichr software [31] and mapped in each network. The interaction networks were visualized using Cytoscape 2.8.3 software [32].

2.7. Phylogenetic analysis

A phylogenetic hypothesis was inferred by Bayesian inference (BI) using MrBayes v3.2.2 [33] to provide an evolutionary discussion about the function of proteins encoded by the CGI-55 (*SERBP1*) and Ki-1/57 (*HABP4*) genes. First, sequence data from these proteins were downloaded from the UniProt database (http://www.uniprot.org/). To root the phylogenetic tree, the VIG protein encoded by vasa intronic gene (vig) from *Drosophila melanogaster* was selected as an outgroup. Sequences were aligned using MAFFT [34] and the alignment was manually inspected, being subsequently trimmed using G-blocks [35]. The JTT + G model [36] was calculated by ProtTest 3.3 [37] as the best-fit amino acid substitution model, according to AIC and BIC criteria. The BI phylogenetic trees were calculated using the Bayesian Markov Chain Monte Carlo (MCMC) method with 1×10^7 generations and a sample frequency of 10^3 , considering the JTT + G substitution model. The parameter convergence was analyzed in TRACER v1.5.0 (http://

beast.bio.ed.ac.uk/tracer), and the chain reached a stationary distribution after 1×10^5 generations. Then, 1% of the generated trees was burned to produce the consensus tree.

2.8. MTS cell proliferation assay

HEK293T cells were seeded in 96-well plates, cultured to 60–70% confluence and transfected with pcDNA6-flag-Ki-1/57, pcDNA6-flag-CGI-55 or pcDNA6 (control). For knockdown experiments cells were transfected with siRNA against Ki-1/57 (siRNA #89), siRNA against CGI-55 (siRNA #3) or scrambled siRNA. 16 h following transfection the medium was replaced with Dulbecco's modified Eagle's medium for normal medium (10% FBS) or serum starvation (1% FBS). At the indicated time, cell proliferation was tested using the MTS assay (CellTiter 96® AQueous One Solution; Promega) according to manufacturer's protocol.

2.9. EdU incorporation assay

Cells were seeded in 6-well plates, transfected with pcDNA6-flag-Ki-1/57, pcDNA6-flag-CGI-55 or empty pcDNA6 and maintained under standard conditions (10% serum) or under serum starvation (1% serum). 24 or 48 h after transfection, cells were pulsed with EdU, incubated for further 4 h and harvested by trypsinization (0.25% trypsin, 0.53 mM EDTA). Cells were seeded on poly-L-lysine (Sigma)treated cover slips, fixed with 4% paraformaldehyde and permeabilized using 0.5% Triton X-100 for 20 min at room temperature. Incorporation of EdU was observed by incubating fixed cells with 2% BSA in PBS for 30 min and Alexafluor 488 for a further 30 min under Cu(I)-catalyzed click reaction conditions, as described by the manufacturer (Click-iT® EdU Imaging Kits, Invitrogen). Cells were washed with PBS, and mounted on slides using Vectashield with DAPI (Vector Laboratories) for fluorescent microscopy. Images were taken on Confocal Laser Scanning Microscope Leica TCS SP8 (magnification ×100). Column graph shows the percentage of EdU-positive cells compared to total cells (±SE). Experiments were performed in duplicate biological experiments. A minimum of 400 cells was counted for each replicate.

2.10. Cell cycle analysis

Cells were seeded in 6-well plates, transfected with pcDNA6-flag-Ki-1/57, pcDNA6-flag-CGI-55 or pcDNA6 and maintained under normal conditions (10% serum) or under serum starvation (no serum) before analysis. Following 48 h after transfection, floating cells were collected and then added to the attached cells that have been harvested by trypsinization. Cells were washed twice with cold PBS, fixed with 2 mL of ice-cold 70% ethanol in PBS and incubated at 4 °C overnight. The pellets were collected by centrifugation and resuspended in PBS solution containing 60 µg/mL of propidium iodide, 0.5% Triton X-100 and 250 µg/mL of RNAse A. After incubation for 30 min in the dark at 37 °C followed by 30 min incubation at 4 °C, cells were analyzed for DNA content using a FACS Canto II (BD Pharmingen) and FACS DIVA software. The cell cycle distribution is shown as the percentage of cells containing 2n (G1 phase), 4n (G2 and M phases) and S phase judged by propidium iodide staining. The experiment was performed in triplicate biological experiments.

2.11. Apoptosis assays

HEK293T cells were cultured in 6-well plates to 60–70% confluency, and then transfected with pcDNA6-Flag-Ki-1/57, pcDNA6-Flag-CGI-55 or pcDNA6.8 h after transfection, cells were treated with 30 µM cisplatin, 3 µg/mL actinomycin D or 10 µM thapsigargin for 16 h. Cells were then detached from plates with trypsin (0.25% trypsin, 0.53 mM EDTA), combined with floating cells and stained with Annexin V-FITC and propidium iodide (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) according

to the manufacturer's protocol. Data were collected on a FACS Canto II (BD Pharmingen) and analyzed by FACS DIVA software. Results shown in bar graphs represent annexin V positive cells and include early and late apoptosis.

2.12. Statistical analysis

Data are displayed as mean \pm standard deviation (SD). Comparisons were analyzed by Student's *t*-test and a p-value < 0.05 was considered to indicate statistical significance. A statistical association between the frequency of transcription factors classes of genes modified by Ki-1/57, CGI-55 and the whole human genome was tested, using two-sided Fisher's exact test.

3. Results

3.1. Global gene expression analysis

The association of Ki-1/57 with proteins involved in regulatory mechanisms of transcription, RNA metabolism and translation regulation suggests a possible function for this protein in the regulation of gene expression. Looking for additional functional information, we performed microarray global gene expression analysis of HEK293T cells transiently overexpressing Ki-1/57 or CGI-55 (Fig. 1) by using Affymetrix microarray technology (Fig. 2). With a cutoff of 2-fold compared to cells transfected with an empty pcDNA6, the expression of 413 genes was altered by Ki-1/57 overexpression, with 88% of them down-regulated (363 down and 50 up-regulated genes) (Fig. 2A, top panel).

Similarly, the RNA expression profile of CGI-55 overexpression was also investigated. We found that 217 genes had differential expression and 90% of them were also down-regulated (190 down and 27 up-regulated genes) (Fig. 2A, bottom panel). These results suggest that the functional role of these proteins in gene regulation might be predominantly repressive. Interestingly, we found that Ki-1/57 and CGI-55 can alter at least 20 genes in common, with most of them being

repressed by both proteins (Fig. 2B). This observation along with the amino acid sequence similarity and our previous yeast two-hybrid protein–protein interaction data reinforces the hypothesis of paralogy between these proteins [7].

3.2. Ki-1/57 and CGI-55 are paralogs that arose by a genome duplication in the baseline leading to the chordates

In the Pfam database, CGI-55 (SERBP1) and Ki-1/57 (HABP4) proteins are classified in the HABP4 family of hyaluronan-binding proteins (accession PF04774). This family includes proteins that have been observed to bind *in vitro* to hyaluronan (a glucosaminoglycan) or that are involved in the regulation of mRNA stability [38]. However, proteins classified in this family present a diverse architecture of domains and motifs, and it is not known whether these proteins share a common function. The initial reports of a hyaluronan binding activity for Ki-157 (HABP4) could not be shown to be of *in vivo* relevance.

Among proteins of the HABP4 family, the VIG protein of *D. melanogaster* shares significant similarity with CGI-55 and Ki-1/57. This protein is a component of the RISC complex, the RNA-induced silencing complex [39], and was selected as an outgroup in the phylogenetic analysis. Here, the molecular evolution of CGI-55 and Ki-1/57 proteins was assessed by Bayesian inference. The phylogenetic tree shows that these proteins are indeed paralogous as previously hypothesized and possibly originated from a major genome duplication event (Fig. 3) at the baseline leading to the chordates. The so-called HABP4 domain has as a characteristic to be enriched in several positively charged amino acids. This may be the explanation for the initial described binding of the negative charged hyaluronan but also may act as an RNA or nucleic acid binding module.

In addition, the analysis of the architecture of domains and motifs shows that CGI-55 and Ki-1/57 proteins have a distinct composition of glycine/arginine rich motifs (RGG / RXR) flanking the HABP4 domain (Fig. 3). These RGG/RXR motifs can be found mainly in proteins involved in RNA processing and transcriptional regulation [7]. Further



Fig. 1. Ki-1/57 and CGI-55 overexpression in HEK293T cells. HEK293T cells were seeded in 6-well plates, transfected 48 h later with pcDNA6-flag-Ki-1/57 (A, C) and pcDNA6-flag-CGI-55 (B, D) and compared with control (pcDNA6). At indicated time points (24 h and 48 h after transfection), cells were collected and resuspended in Trizol® for RNA extraction or in RIPA buffer for total protein extraction. Relative expression level of Ki-1/57 (A) and CGI-55 (B) was determined by quantitative RT-PCR experiments. The relative amount of each mRNA was normalized to (β-actin. Data in histograms represent means (of triplicate experiments) ± 5D. Western blot of cells transfected with pcDNA6-flag-Ki-1/57 (C) and pcDNA6-flag-CGI-55 (D) using anti-flag antibody and comparing with cells transfected with pcDNA6-flag-Ki-1/57 (C) and pcDNA6-flag-CGI-55 (D) using anti-flag antibody and comparing with cells transfected with pcDNA6-flag-Ki-1/57 (C) and pcDNA6-flag-CGI-55 (D) using anti-flag antibody and comparing with cells transfected with pcDNA6-flag-Ki-1/57 (C) and pcDNA6-flag-CGI-55 (D) using anti-flag antibody and comparing with cells transfected with pcDNA6-flag-Ki-1/57 (C) and pcDNA6-flag-CGI-55 (D) using anti-flag antibody and comparing with cells transfected with pcDNA6-flag-Ki-1/57 (C) and pcDNA6-flag-CGI-55 (D) using anti-flag antibody and comparing with cells transfected with pcDNA6-flag-Ki-1/57 (C) and pcDNA6-flag-Ki-1/

F.C. Costa et al. / Biochimica et Biophysica Acta 1843 (2014) 2944-2956



Fig. 2. Ki-1/57 and CGI-55 overexpression changes global mRNA profiles of HEK293T cells. (A) Heat maps show flag-CGI-55 and flag-Ki-1/57 transfected cells mRNA profile 48 h after transfection. Each line represents a gene in one of the analyzed replicates with fold change > 2 and p < 0.05. Both down-regulated (green) and up-regulated (red) RNAs were identified. (B) Common genes affected by Ki-1/57 and CGI-55. Gene ontology (GO) term analysis was performed to identify biological processes annotated among Ki-1/57 and CGI-55 regulated genes. The depicted genes were selected based on the following GO term annotation: apoptosis, cell cycle control and cell proliferation.

analysis of the sequence alignment shows that the CGI-55 protein presents three insertions rich in polar residues in HABP4 domain that differ from Ki-1/57 protein. Together, these findings can explain both the common origin and the functional differences between CGI-55 (SERBP1) and Ki-1/57 (HABP4) proteins, observed in gene expression analysis and in biological assays.

3.3. Functional network analyses

Biological process analyses were performed using Gene Ontology (GO) annotation to specify and identify pathways among target genes after Ki-1/57 and CGI-55 overexpression. The analyzed genes were involved in several biological processes (transcription regulation, RNA splicing, translation), but most evidently they were related to life/ death cellular decision pathways such as apoptosis (9 genes for CGI-55 and 18 for Ki-1/57), cell proliferation (23 for CGI-55 and 24 for Ki-1/57) and cell cycle (7 for CGI-55 and 8 for Ki-1/57) (Fig. 2C). In order to find out functional interconnections between the microarray gene expression and the previously obtained protein–protein interaction data [4–12] we built up networks for Ki-1/57 and CGI-55. The top enriched GO biological processes among the yeast two-hybrid partners (dark blue), the upregulated genes (red), the down-regulated genes (green) and the background intermediary proteins (gray) are detailed by clustering the proteins in the networks (Fig. 4A and B). In yellow, the enriched transcription factors described in different databases [31] related to the up and down-regulated genes identified by Ki-1/57 and CGI-55 microarrays (called here "enriched transcription factors", Fig. 4) are represented. The enriched transcription factors were classified according to Wingender et al. [40] and the frequency of each TF class was determined. We observed that the frequency of TF classes assigned to the genes targeted by Ki-1/57 and CGI-55 was significantly different from the frequency found in the human genome, but not from each other (Ki-1/57 vs. CGI-55) (Fig. S2). These TFs (yellow nodes in the networks) are particularly related to the apoptotic process (Fig. 4A and B). Furthermore, transcriptional factors were targeted by Ki-1/57 (e.g. BCLAF1, Fos, ADNP) and CGI-55 (e.g., PRDM1, TCF3, TBX1) overexpression on the observed global gene expression panel.



Fig. 3. Evolutionary analysis of CGI-55 and Ki-1/57 amino acid sequences. Top: the majority-rule consensus tree was obtained by Bayesian MCMC coalescent analysis of 26 HABP4 family protein sequences obtained from the UniProt database (http://www.uniprot.org/). Beside each node, the posterior probability values (PP) (expressed in percentage) calculated by using the best trees found by MrBayes are shown. Below: details of sequence alignments of the so-called HABP4 domain (hyaluronan binding protein 4).

As observed in the networks, one of the most representative biological processes altered by Ki-1/57 and CGI-55 overexpression is cell proliferation. Representative modified genes by Ki-1/57 overexpression includes the repression of α -taxilin (TXLNA), a protein correlated with proliferative activity of hepatocellular carcinoma and the metastatic and invasive potential of renal cell carcinoma [41,42], as well as PLAU, PDXK, NRG1, also involved in promoting cell proliferation. CGI-55 overexpression decreased expression of proliferative genes as well (GNB1 and CCL14). Considering previous yeast two-hybrid assay results, in which we also found proteins related to proliferation control, like MAPRE1 for Ki-1/57 and CUL3 for CGI-55, these data collectively pinpoint that both Ki-1/57 and CGI-55 are involved directly or indirectly in repressive mechanisms of cellular proliferation control.

Ki-1/57 and CGI-55 overexpression also modified the expression of genes involved in apoptosis. Ki-1/57 overexpression, for example, repressed the expression of the apoptosis related genes GRK5, IL18, PEG10 and PPP3CC (Fig. 4A). More specifically, Ki-1/57 expression leads to the repression of negative apoptosis regulators such as MAP2K5, ADNP, ANXA4, as well as the positive regulator BCLAF1. Moreover, Ki-1/57 expression increased the mRNA levels of HSP90B1, an endoplasmic reticulum chaperone that protects against ER stressinduced apoptosis [43]. These observations might suggest an involvement of Ki-1/57 in molecular decision mechanisms of death or protection against death during stress situations, such as ER stress, genotoxic or chemotherapeutic agents.

In the same way, CGI-55 overexpression also affected apoptosis related genes, such as HAND2, TNS4, specifically, the negative regulators MAP2K5, PAK7 and FOXO1, and the positive regulators NCOA1 and BCL2L11. These alterations of the expression of apoptosis related genes are in agreement with previous protein–protein interaction data, as both Ki-1/57 and CGI-55 interact with DAXX [6], a signaling protein that binds specifically to the Fas death domain [44] and TOPORS, a protein that mediates the p53 cellular response in DNA damage [45].

Ki-1/57 overexpression down-regulated Cyclin-dependent kinase 15 (CDK15), TCF3, MAPK12, INHBA, Cyclin-Y (CCNY), and up-regulated Tubulin alpha-4A (TUBA4A) and LIN37, which are proteins associated with cell cycle or cell division control [46–49]. CGI-55 overexpression also led to the down-regulation of cell cycle control genes, such as nuclear distribution protein NDEL1 and GORASP1 [50,51]. Proteinprotein interaction data also support the involvement in cell division mechanisms, such as the case of UBE2I and YBX1 (Ki-1/57 interacting protein) and KIAA0101 (CGI-55 interacting protein), all of them involved in cell cycle control.

Interestingly, Ki-1/57 overexpression increased the expression of 50 genes, with 10 of them assigned as DNA histones. We speculate they could be involved in chromatin compaction during the gene repression process caused by Ki-1/57 overexpression. Besides, they may be associated to other biological processes affected by Ki-1/57, like cell cycle and apoptosis [52,53]. This could be the case of H2AX (H2AFX), which is responsible for recruiting multiple proteins to chromatin during DNA damage/repair response [54]. In addition, Ki-1/57 overexpression seems to affect histone function through down-regulating the histone-lysine N-methyltransferase (SETMAR), which is responsible for methylation of lysine residues in histone proteins [55].

All these observations together prompted us to validate specific targets enriched in relevant biological processes and further investigate whether the overexpression of Ki-1/57 and CGI-55 influences cell cycle, proliferation and apoptosis under stress conditions.

3.4. Validation of the microarray data

To further validate the microarray data findings, we analyzed by quantitative real-time PCR (qPCR) representative mRNAs involved in highly enriched biological processes targeted by Ki-1/57 and CGI-55 overexpression. For comparison, the average fold change in gene expression levels, determined by microarray and qPCR analysis, was log2 transformed and is shown in Fig. 5A and B. We were able to confirm genes involved in apoptosis (A), cell proliferation (P) and cell cycle (CC) targeted by Ki-1/57 and CGI-55 overexpression. For MAP2K5, a protein kinase that mediates a signal cascade involved in growth factor-stimulated cell proliferation, microarray data had shown a 5.4-fold and 3.13-fold reduction in expression, targeted by Ki-1/57 and CGI-55, respectively. qPCR results show 3.6-fold reduction for CGI-55. Comparable results were observed for other tested genes. Although there was a variation in the fold change values determined by these two methods, the expression trends were consistent.

Next, we further validated our microarray data by performing knockdown experiments of Ki-1/57 and CGI-55 (Fig. 5C and D). Optimization experiments have shown that a good down-regulation of Ki-1/57 expression occurred at all time points after transfection (Fig. 5C), whereas CGI-55 worked best only after 24 and 48 h, showing significant recovery after 72 h (Fig. 5D). Although we performed expression analysis at all time points after knockdown, most test points did not show significant differences. The most significant results were obtained for 5 genes after 96 h knockdown of Ki-1/57 (Fig. 5E) and after 48 h knockdown of CGI-55 (Fig. 5F). These results largely confirmed those of the overexpression, meaning that genes that were up or down-regulated upon overexpression, had an inverted characteristic upon knockdown. For example, CADM1 was repressed by overexpression of Ki-1/57 (Fig. 5A) and, upon knockdown (Fig. 5E, 96 h), it was found to be more expressed. On the other hand, the histone HIST1H2AB, for example, was up-regulated when Ki-1/57 was overexpressed (Fig. 5A), but was found to be repressed when Ki-1/57 was knocked down (Fig. 5E).

3.5. Cell proliferation, cell cycle and apoptosis analysis

To evaluate cell viability, MTS assays were performed with cells overexpressing flag-tagged Ki-1/57 or CGI-55. The results suggested that the overexpression of both proteins may lead to a significant reduction of cell growth either under normal or serum-deprived conditions (Fig. 6A, B). We also analyzed the effect of knockdown of Ki-1/57 and CGI-55 on HEK293T cell viability (Fig. 6C). No apparent differences were observed for Ki-1/57 (data not shown), but indeed, we found an increased viable cell number at 72 h of transfection with CGI-55 siRNA, under 10% serum condition (Fig. 6C). Although knock down experiments may not necessarily yield opposite results of overexpression assays, at least for CGI-55 we were able to observe such an effect (Fig. 6A, C).

The percentage of proliferating cells was also evaluated by measuring the incorporation of EdU in dividing cells. In agreement with cell viability experiments, the overexpression of Ki-1/57 and CGI-55 led to a reduced percentage of EdU incorporation. This result was most evident under serum starvation conditions, possibly due to the lack of interfering mitogenic factors present in the serum (Fig. 6D).

We further determined the effects of Ki-1/57 and CGI-55 on cell cycle progression (Fig. 6E). Under normal growth conditions (10% serum), no significant differences were observed. However, under serum starvation, a G1 phase arrest was observed in cells overexpressing either Ki-1/57 or CGI-55.

Given that cell proliferation, cell cycle progression and apoptosis are tightly related processes and that both Ki-1/57 and CGI-55 affected the expression of apoptosis related genes, we then also examined the apoptosis response of Ki-1/57 and CGI-55 overexpressing cells to stress. Under thapsigargin (an ER-stress inducer) treatment, Ki-1/57 overexpressing cells exhibited diminished apoptosis when compared to pcDNA-transfected control cells (Fig. 7A). CGI-55 overexpressing cells had an increased apoptosis rate, however no significant differences were observed under the tested stress conditions (Fig. 7B).





Fig. 5. Validation of microarray data by quantitative RT-PCR after Ki-1/57 and CGI-55 overexpression or siRNA knockdown. Fold change of mRNA of genes targeted by overexpression (48 h after transfection) of Ki-1/57 (A) and CGI-55 (B) in microarrays and confirmative quantitative RT-PCR experiments were Log₂ transformed and blotted together for comparison. The relative amount of each mRNA tested was normalized with Pi-actin. The specific primers are listed in Supplementary Table 1. Data in histograms are means (of triplicate experiments) ± 5D. A stands for genes involved in apoptosis, P for cell proliferation and CC for cell cycle. (C, D) HEK293T cells were seeded in 6-well plates and transfected 24 h later with siRNA against Ki-1/57 (C) and CGI-55 (D). A scrambled siRNA was used as negative control upon the same conditions. At indicated time points (24, 48, 72 and 96 h after transfection), cells were collected and resuspended in Trizol® for RNA extraction. The expression levels of Ki-1/57 and CGI-55 genes were determined by quantitative RT-PCR experiments. (E, F) Genes found to have different expression levels on Ki-1/57 and CGI-55 genes were determined by quantitative RT-PCR experiments. (E, F) Genes found to have different expression levels in microarray experiments after Ki-1/57 and CGI-55 overexpression were analyzed in knockdown experiments (E) Ki-1/57 Knockdown reverse the effects observed upon overexpression. Genes down-regulated by Ki-1/57 owerexpression were up-regulated upon knockdown, 96 h after transfection with siRNA. Histones (HIST1H2AB and HIST1H3A), that were up-regulated after overexpression were up-regulated upon knockdown, 96 h differ transfection with siRNA. Histones (HIST1H2AB and HIST1H3A), that were up-regulated after overexpression were up-regulated by Fa-tin. Data in histograms are means of triplicate experiments ± SD.

4. Discussion

By using microarray global gene expression analysis, we identified approximately 400 and 200 genes affected by Ki-1/57 and CGI-55 overexpression, respectively. These data along with protein-protein interaction data previously obtained in our group were used to build up enriched functional networks considering relevant top enriched GO biological processes regulated by Ki-1/57 and CGI-55. Many of the target genes were involved in regulation of transcription or other aspects of mRNA metabolism, a result consistent with the previously obtained

Fig. 4. Interaction networks of Ki-1/57 and CGI-55 from previous yeast two-hybrid screening data and altered gene expression revealed by microarrays. The selected most relevant enriched GO biological processes among the yeast two-hybrid partners (dark blue), the up-regulated genes (red), the down-regulated genes (green), the enriched transcription factors (yellow) and the background intermediary proteins (gray) are depicted in the (A) Ki-1/57 and (B) CGI-55 networks by clustering the proteins involved in each of the biological processes ontaining at least one protein from the yeast two-hybrid screening or microarray data; proteins belonging to more than one biological process were assigned to clusters with the best enrichment p-values. More specific biological processes are shown only for proteins with more specific annotation in GO database. The histone HIST1H1C was assigned to "Apoptosis", and histones H2AFJ, HIST1H2AE, HIST1H2AC, HIST1HAA, HIST1HAAC, and HIST2H2BE from the Ki-1/57 network were assigned to Cell cycle", according to the Reactome database. The nodes sizes of up- and down-regulated proteins/mRNAs are depicted proportional to their fold change (FC $\geq .0$, p $\leq .005$). The protein-protein interaction networks were built using the IIS platform [30] and visualized using the Cytoscape software.

F.C. Costa et al. / Biochimica et Biophysica Acta 1843 (2014) 2944-2956



Fig. 6. Analysis of cell viability, proliferation and cell cycle. (A-C) MTS assay was performed to determine the effect of Ki-1/57 and CGI-55 overexpression or knock down on cellular viability. (A B) HEK293T were seeded in 96-well plates and transfected 48 h later with pcDNA6-flag-Ki-1/57, pcDNA6-flag-CGI-55 or empty pcDNA6 vector. After 16 h the medium was substituted with medium containing 10% (10% Serum, A) or 1% fetal bovine serum (Serum Starvation, B). At indicated time points (24, 48, 72 and 96 h after changing media), MTS assay or performed and results are represented as mean OD (±5D) of 4 repeats. (C) MTS assay of CGI-55 and Ki-1/57 knockdown cells. Cells were seeded in 96-well plates, transfected 24 h later with, siRNA for CGI-55, Ki-1/57 or the control scrambled siRNA. After 16 h the medium was substituted with medium containing 10% fetal bovine serum. At indicated time points (24, 48, 72 and 96 h after changing media), MTS assay was performed and results are represented as mean OD 490 nm (±SD) of 3 repeats. (D) EdU incorporation assay. HEK293T were seeded in 6-well plates and processed as described above. The percentage of EdU-positive cells at 24 or 48 h after transfection was obtained for two conditions, 10% or 1% serum (Serum Starvation). More than 400 cells were counted for each condition. Each bar represents mean ± SD of 2 independent experiments. *p < 0.01 (E) DNA flow cytometry analysis of cell cycle profiles in HEK293 pcDNA6 (control), flag-Ki-1/57 or flag-CGI-55 transfected cells. Cells were seeded in 6-well plates in triplicate, transfected and analyzed 48 h later. After transfected as chargined place in medium containing 10% FBS or medium with no serum (Serum Starvation). Data are presented as percentage of cells.

protein–protein interaction data (Fig. S1) [4–12]. Although the exact mechanisms could not be pinpointed here, it is worth noting that most of the genes targeted by Ki-1/57 and CGI-55 overexpression were down-regulated (~90%), indicating that these proteins could act predominantly as repressors of gene expression.

Of particular functional interest, a representative biological process affected by Ki-1/57 and CGI-55 overexpression was involved in life/ death decisions. Genes involved in apoptosis, proliferation and cell cycle control showed alteration in their expression levels in both microarray data and qPCR analysis. Expression of mRNA encoding GRK5, a kinase that interacts and phosphorylates p53 during the regulation of apoptosis and G2/M-phase transition [56,57] was down-regulated by Ki-1/57. The mRNA encoding HSP90B1 (GRP94), a calcium binding protein that inhibits apoptotic signals by maintaining



Fig. 7. Apoptosis analysis of cells overexpressing Ki-1/57 and CGI-55 under stress conditions. HEK293T cells were seeded in 6-well plates, transfected 48 h later with pcDNA6-flag-Ki-1/57 (A) and CGI-55 (B) and compared with control (pcDNA6). 8 h after the transfection cells were treated with 3 μ g/mL Actinomycin D, 30 μ M Cisplatin or 10 μ M dhapsigargin for 16 h, completing 24 h after transfection. Cell apoptosis was analyzed with annexin V-FITC and PI staining by flow cytometry. Experiments were performed in triplicate and repeated two times; each bar represents mean \pm . 5D, $^{\circ}p < 0.01$ (A) and $^{\circ}p < 0.05$ (B) vs. pcDNA transfected cells.

calcium homeostasis in the ER [58] showed increased expression. The expression of TCF3, an important transcription factor that regulates cell proliferation and cell cycle regulatory genes [46], was a target for CGI-55 overexpression. MTBP, a protein that interacts with MDM2 (a negative regulator of p53) and has a crucial role in mitotic progression and proliferation in a p53-independent manner [59–61], is also affected by CGI-55.

Considering these information, we sought to further confirm whether Ki-1/57 and CGI-55 overexpression would affect cell life/death decisions. We observed reduced proliferation for both proteins in MTS and EdU incorporation experiments, and in both cases, the reduction was intensified in cells maintained with 1% fetal bovine serum. The reduced proliferation could be due to the arrest of cell cycle progression, since under serum starvation, Ki-1/57 and CGI-55 overexpression induced G1 cell cycle arrest. On the other hand, the overexpression of Ki-1/57 did not yield any alterations in the number of apoptotic cells. CGI-55 overexpression, in contrast, increased apoptosis under normal conditions. Despite the sequence similarity between these proteins, it seems they have acquired distinct functional properties during evolution. This seems to be confirmed by these proteins differences in the protein-protein interaction profile, the apoptosis data set and their distinct sets of target genes. While the apoptosis genes down-regulated by CGI-55 were mostly negative apoptotic regulators, Ki-1/57 targeted positive and negative regulators, increasing or reducing their expression. This is in agreement with the finding that CGI-55 overexpression promotes a higher apoptosis rate because it causes a repression of negative regulators of apoptosis. In the case of Ki-1/57 overexpression, an inhibitory effect on apoptosis could only be seen after thapsigargin treatment, indicating that positive and negative influences on apoptosis may be in balance under absence of thapsigargin.

Ki-1/57 and CGI-55 have cytoplasmic and nuclear localizations, where they can be frequently observed in dot-like structures or nuclear bodies such as Caial bodies, nuclear speckles and PML-nuclear bodies (PML-NBs) [4,7,8,10,11,26,62]. These granules are nuclear substructures that respond to basic physiological processes as well as various forms of stress. PML-NBs for instance localize at the proximity of active transcription sites directly regulating the function of several transcription factors and responding to viral attack and genome instability, by abducting, modifying or degrading different protein partners [63,64]. Considering the localization in such granules and the panel of genes involved in apoptosis that were up or down-regulated by Ki-1/57 and CGI-55 overexpression, we then speculated that these two proteins would play some role in protecting cells against stress conditions. The overexpression of Ki-1/57 seemed to reduce the amount of apoptotic cells during treatment with different stress reagents, most significantly thapsigargin. The same was not observed in cells overexpressing CGI-55, which did not lead to an increase of the cells sensibility to the stressing agents.

We would like to point out that post-translational modifications are an additional important factor that adds further regulatory complexity to apoptosis signaling. For example in rat ovarian granulosa cells, CGI-55 and PGRMC1 form a receptor complex required for the antiapoptotic effects of progesterone and the response of PGRMC1 to progesterone functions depends on PGRMC1 sumoylation status [65]. Moreover, small ubiquitin-like modifier (SUMO) can post-translationally modify PML and other PML-NB components. PML interacts with itself and other proteins through sumoylation and SUMO-interacting motif SIMs [63] and sumoylation of PML is required for the recruitment of components of PML-NBs [66]. CGI-55 interacts with the SUMO activating enzyme subunit 2, UBA2, and with the SUMO E3 ligases PIAS1 and -3 [11]. Moreover, a systematic study on SUMO modifications in response to heat shock, identified CGI-55 as a SUMO substrate [67]. In addition, CGI-55 and Ki-1/57 possess different predicted sumoylation sites (data not shown). Therefore, the association of Ki-1/57 and CGI-55 to PML-NBs would involve their SUMO modification and might influence the participation of these two proteins in apoptosis response, but likely in a differential manner.

The influence of Ki-1/57 overexpression on histones should also be pointed out. Whereas histone overregulation might in part explain the overall repressive effect of Ki-1/57 overexpression, some gene loci are found to be preferentially associated with PML-NBs, as histone gene clusters [68,69]. Moreover, not only transcription factors are found in PML-NBs, but also histone-modifying enzymes and other chromatin regulators, suggesting a role for PML-NBs in chromatin regulation [64]. Therefore, we can speculate that the up-regulation of histone genes by Ki-1/57 overexpression might be via PML-NBs. In this respect, DAXX, a Ki-1/57 and CGI-55 interacting partner and component of PML-NB, may regulate chromatin dynamics by binding to histone deacetylases and chromatin remodeling proteins [70]. Moreover, Ki-1/57 overexpression down-regulated the histone-lysine N-methyltransferase (SETMAR), responsible for methylation of lysine residues in histones, a pivotal process for heterochromatin formation [55]. It is important to highlight that some of the histones triggered by Ki-1/57 overexpression are related to stress response, such as H2AX, which is responsible for recruiting multiple proteins to chromatin during DNA damage/repair response [54]. This reinforces the possible role of Ki-1/57 in regulating gene expression in response to stress.

The enriched transcription factors from the functional networks of targeted genes by Ki-1/57 and CGI-55 overexpression were classified and the frequency of each TF class determined. We observed that the frequency of TF classes of the genes targeted by Ki-1/57 and CGI-55 was significantly different from the frequency found in the human genome, but not from each other (Ki-1/57 vs. CGI-55) (Fig. S2). This might implicate in Ki-1/57 and CGI-55 roles as corepressors of genes regulated by specific classes of TFs. It is important to note the increased frequency of the immunoglobulin fold class, which includes the p53 family TF, a well-established interacting partner of Ki-1/57 [10]. Together with the amino acid sequence similarity, the expression regulation of common genes identified by the microarray study and our previous yeast two-hybrid protein-protein interaction data, the TF classes analysis also strengthens the hypothesis of paralogy between these proteins [7].

Ki-1/57 and CGI-55 are RBPs that under stress conditions localize on SGs and PBs [25–27] and almost 90% of genes regulated by them were down-regulated, demonstrating a repressor activity. Many of the genes targeted by Ki-1/57 and CGI-55 are associated with the regulation of transcription and mRNA metabolism, and with cellular fate pathways, as apoptosis, cell cycle and proliferation. We speculate that these two proteins could act directly or indirectly via global repression of genes involved in response to stress conditions, possibly involving cytoplasmic and/or nuclear bodies, and may act on several different levels of gene expression regulation: from transcriptional level, through transcriptional factors or chromatin remodeling, via mRNA stability and splicing to translation initiation.

The high structural flexibility of intrinsically disordered proteins allows the binding to multiple partners and access of post-translational modifications at several sites. Post-translation modification of RNAbinding proteins is an energetically economical way to adapt to stress conditions, without new protein synthesis, and allows rapid and reversible protein regulation. Ki-1/57 and CGI-55 are both methylated, phosphorylated and we speculate that they are also sumoylated. This could determine their cellular localization and mode of action in response to different stress conditions.

5. Conclusions

Ki-1/57 and CGI-55 are paralogous regulatory proteins and have been functionally implicated in the regulation of gene expression on both the transcriptional and mRNA metabolism levels. The preliminary characterization of their protein interaction profiles, their complex subcellular localization and post-transcriptional modifications together with the finding of altered expression of these proteins in diverse cancer cells had suggested that they may be involved in the process of tumorigenesis. Furthermore, the gene for Ki-1/57 is found in a region of a chromosome which contains only four genes and represents a haplotype for familiar colon cancer. Here, we characterized the alterations of the global transcriptome profile after Ki-1/57 or CGI-55 ectopic overexpression in HEK293 cells by DNA microchip technology and identified 363 or 190 down-regulated and 50 or 27 up-regulated genes for Ki-1/57 and CGI-55, respectively, of which 20 were shared between both proteins. This latter finding together with an evolutionary analysis, strongly suggests that both proteins are paralogs, which originated through an event of a whole genome duplication in the baseline of chordate evolution. Furthermore, the great majority of the genes with altered expression are associated to proliferation, apoptosis and cell cycle control processes. In further experiments, we could observe that overexpression of Ki-1/57 and CGI-55 results indeed in reduced cell proliferation, mainly due to a G1 phase arrest. In the case of Ki-1/57 overexpression, we found protection from apoptosis after treatment with the ER-stress inducer thapsigargin. Our transcriptome data together with a correlation of the published protein interactome data suggest that Ki-1/ 57 and CGI-55 have many overlapping functions and furthermore that they act mainly as repressors that affect the expression of genes involved in proliferation and cell cycle as well as apoptosis regulation. Taken together, our data provide important new insights that may help to explain these protein putative involvements in tumorigenic events.

Supplementary data to this article can be found online at http://dx. doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.08.016.

Acknowledgements

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado São Paulo (FAPESP) (Grant 2008/04849-2 to J.K.), Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPg) (Grant 302123/2009-1 to J.K., and Grant 485011/2012-3 to G.C.B), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Grant CBB - APQ-01637-13 to G.C.B) and Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM). We also like to thank Maria Eugenia Ribeiro de Camargo and Adriana Alves for their excellent technical assistance.

References

- [1] J. Kobarg, S. Schnittger, C. Fonatsch, H. Lemke, M.A. Bowen, F. Buck, H.P. Hansen Characterization, mapping and partial cDNA sequence of the 57-kD intracellular
- Ki-1 antigen, Exp. Clin. Immunogenet. 14 (1997) 273–280.
 N.B. Serce, A. Boesl, I. Klaman, S. von Serényi, E. Noetzel, M.F. Press, A. Dimmler, A. Hartmann, J. Sehouli, R. Knuechel, M.W. Beckmann, P. a Fasching, E. Dahl, Overexpression of SERBPI (plasminogen activator inhibitor 1 RNA binding protein) in human breast cancer is correlated with favourable prognosis, BMC Cancer 12 (2012) 597.
- [3] J.H. Heaton, W.M. Dlakic, M. Dlakic, T.D. Gelehrter, Identification and cDNA cloning of a novel RNA-binding protein that interacts with the cyclic nucleotide-responsive sequence in the type-1 plasminogen activator inhibitor mRNA, J. Biol. Chem. 276
- (2001) 3341–3347. T. a Lemos, D.O. Passos, F.C. Nery, J. Kobarg, Characterization of a new family of proteins that interact with the C-terminal region of the chromatin-remodeling [4]
- proteins that interact with the C-terminal region of the chromatin-remodeling factor CHD-3, FEBS Lett. 533 (2003) 14–20.
 [5] C.B. Kobarg, J. Kobarg, D.P. Crosara-Alberto, T.H. Theizen, K.G. Franchini, MEF2C DNA-binding activity is inhibited through its interaction with the regulatory protein Ki-1/57, FEBS Lett. 579 (2005) 2615–2622.
 [6] F.C. Nery, E.Rui, T.M. Kuniyoshi, J. Kobarg, Evidence for the interaction of the regulatory for the interaction of the reg
- rotein Ki-1/57 with p53 and its interacting proteins, Biochem. Biophys. Res. Commun. (2006) 847-855
- [7] G.C. Bressan, A.J.C. Quaresma, E.C. Moraes, A.O. Manfiolli, D.O. Passos, M.D. Gomes, J. Kobarg, Functional association of human Ki-1/57 with pre-mRNA splicing events, FEBS J. 276 (2009) 3770-3783.
- FEBS J. 276 (2009) 3770–3783.
 [8] K.D.A. Gonçalves, G.C. Bressan, A. Saito, L.G. Morello, N.I.T. Zanchin, J. Kobarg, Evidence for the association of the human regulatory protein Ki-1/57 with the translational machinery, FEBS Lett. 585 (2011) 2556–2560.
 [9] F.C. Nery, D.O. Passos, V.S. Garcia, 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. 279 (2004) 11444–11455.
 [10] D.O. Passos, G.C. Bressan, F.C. Nery, J. Kobarg, Ki-1/57 interacts with PRMT1 and is a substrate for arginine methylation, FEBS J. 273 (2006) 3946–3961.
 [11] T.A. Lemos, J. Kobarg, CGI-55 interacts with nucleus proteins and co-localizes to pa80-coilin positive-coiled bodies in the nucleus. Cell Biochem. Biophys. 44
- p80-coilin positive-coiled bodies in the nucleus, Cell Biochem. Biophys. 44 (2006) 463-474.

- [12] G.C. Bressan, J. Kobarg, From protein interaction profile to functional assignment: the human protein Ki-1/57 is associated with pre-mRNA splicing events, RNA Biol. 7 (2010) 268-271.
- [13] C. Gray-McGuire, K. Guda, I. Adrianto, C.P. Lin, L. Natale, J.D. Potter, P. Newcomb, E.M. Poole, C.M. Ulrich, N. Lindor, E.L. Goode, B.L. Fridley, R. Jenkins, L. Le Marchand, C. Casey, R. Haile, J. Hopper, M. Jenkins, J. Young, D. Buchanan, et al., Confirmation of linkage to and localization of familial colon cancer risk haplotype on chromosome 9q22, Cancer Res. 70 (2010) 5409–5418.
- [14] D. Koensgen, A. Mustea, I. Klaman, P. Sun, M. Zafrakas, W. Lichtenegger, C. Denkert, E. Dahl, J. Sehouli, Expression analysis and RNA localization of PAI-RBP1 (SERBP1) in epithelial ovarian cancer: association with tumor progression, Gynecol. Oncol. 107 2007) 266-273.
- [15] W. Sun, C. Guo, X. Meng, Y. Yu, Y. Jin, D. Tong, J. Geng, Q. Huang, J. Qi, A. Liu, R. Guan, L. Xu, D. Sun, W. Ji, P. Liu, F. Liu, H. Sun, G. Ji, S. Fu, J. Bai, Differential expression of PAI-R8P1, Clorf142, and COTL1 in non-small celllung cancer celllines with different tumor metastatic potential, J. Investig. Med. 60 (2012) 689–694.
 C. Morrissey, LD. True, M.P. Roudier, I.M. Coleman, S. Hawley, P.S. Nelson, R. Coleman,
- Y.-C. Wang, E. Corey, P.H. Lange, C.S. Higano, R.L. Vessella, Differential expression of angiogenesis associated genes in prostate cancer bone, liver and lymph node
- metastases, Clin. Exp. Metastasis 25 (2008) 377–388. J. Nilsson, J. Sengupta, J. Frank, P. Nissen, Regulation of eukaryotic translation by the RACK1 protein: a platform for signalling molecules on the ribosome, EMBO Rep. 5 [17] (2004) 1137-1141
- Z. Xia, X. Zheng, H. Zheng, X. Liu, Z. Yang, X. Wang, Cold-inducible RNA-binding p (CIRP) regulates target mRNA stabilization in the mouse testis, FEBS Lett. 586 (2012) 3299-3308
- [19] E.W. Khandjian, M.-E. Huot, S. Tremblay, L. Davidovic, R. Mazroui, B. Bardoni, Biochemical evidence for the association of fragile X mental retardation protein with brain polyribosomal ribonucleoparticles, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101 (2004) 13357–13362.
- [20] U. Braunschweig, S. Gueroussov, A.M. Plocik, B.R. Gravelev, B.I. Blencowe, Dynamic
- [20] O. Braunschweg, S. Gueroussov, A.M. Hock, B.K. Graveley, J.J. Biencowe, Dynamic integration of splicing within gene regulatory pathways, Cell 152 (2013) 1252–1259.
 [21] G.C. Bressan, C. Silva, C. Borges, D.O. Passos, C.H.J. Ramos, I.L. Torriani, G. Ma, Human Regulatory Protein Ki-1,57 Has Characteristics of an Intrinstrinsically Unstructured Protein, J. Proteome Res. 7 (2008) 4465–4474.
 [22] H.J. Dyson, P.E. Wright, Intrinsically unstructured proteins and their functions, Nat.
- Rev. Mol. Cell Biol. 6 (2005) 197–208.
 [23] J. Gsponer, M. Futschik, S. Teichmann, M. Babu, Tight regulation of unstructured
- proteins: from transcript synthesis to protein degradation, Science 322 (80-) (2008) 1365-1368.
- D. Rohde, H. Hansen, M. Hafner, H. Lange, V. Mielke, M.L. Hansmann, H. Lemke, Cellular localizations and processing of the two molecular forms of the Hodgkin-associated Ki-1 (CD30) antigen. The protein kinase Ki-1/57 occurs in the nucleus, Am. J. Pathol. 140 (1992) 473-482.
- [25] J.L. Goodier, L. Zhang, M.R. Vetter, H.H. Kazazian, LINE-1 ORF1 protein localizes in stress granules with other RNA-binding proteins, including components of RNA interference RNA-induced silencing complex, Mol. Cell. Biol. 27 (2007) 6469–6483.
- [26] Y.-J. Lee, H.-M. Wei, L.-Y. Chen, C. Li, Localization of SERBP1 in stress granules and nucleoli, FEBS J. 281 (2014) 352–364. [27] C.J. Decker, R. Parker, P-bodies and stress granules: possible roles in the control of
- translation and mRNA degradation, Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 4 (2012) a012286. [28] P. Anderson, N. Kedersha, RNA granules: post-transcriptional and epigenetic
- modulators of gene expression, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 10 (2009) 430-436. [29] G.C. Bressan, E.C. Moraes, A.O. Manfiolli, T.M. Kuniyoshi, D.O. Passos, M.D. Gomes
- . Kobarg, Arginine methylation analysis of the splicing-associated SR protein SFRS9/ SRP3OC, Cell. Mol. Biol. Lett. 14 (2009) 657–669. M.F. Carazzolle, L.M. de Carvalho, H.H. Slepicka, R.O. Vidal, G.A.G. Pereira, J. Kobarg,
- G.V. Meirelles, IIS–Integrated Interactome System: a web-based platform for the annotation, analysis and visualization of protein–metabolite–gene–drug interactions by integrating a variety of data sources and tools, PLoS One 9 (2014) e100385.
 [31] E.Y. Chen, C.M. Tan, Y. Kou, Q. Duan, Z. Wang, G.V. Meirelles, N.R. Clark, A. Ma'ayan,
- Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool, BMC Bioinforma. 14 (2013) 128.
- P. Shannon, A. Markiel, O. Ozier, N.S. Baliga, I.T. Wang, D. Ramage, N. Amin, B. [32] Schwikowski, T. Ideker, Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction, Networks (2003) 2498–2504.
- [33] J.P. Huelsenbeck, F. Ronquist, R. Nielsen, J.P. Bollback, Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology, Science 294 (2001) 2310–2314.
 [34] K. Katoh, K. Misawa, K. Kuma, T. Miyata, MAFFT; a novel method for rapid multiple
- sequence alignment based on fast Fourier transform, Nucleic Acids Res. 30 (2002) 3059-3066.
- [35] J. Castresana, Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in
- [35] J. Castresana, selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis, Mol. Biol. Evol. 17 (2000) 540–552.
 [36] D.T. Jones, W.R. Taylor, J.M. Thomton, The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences, Comput. Appl. Biosci. 8 (1992) 275–282.
 [37] D. Darriba, G.L. Taboada, R. Doaldo, D. Posada, Proftest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution, Bioinformatics 27 (2011) 1164–1165.
- [38] L. Huang, N. Grammatikakis, M. Yoneda, S.D. Banerjee, B.P. Toole, Molecular characterization of a novel intracellular hyaluronan-binding protein, J. Biol. Chem. 275 (2000) 29829–29839.
- [39] K.I. Ivanov, T.V. Tselykh, T.I. Heino, K. Mäkinen, The RISC component VIG is a target for dsRNA-independent protein kinase activity in *Drosophila* S2 cells, J. RNAi Gene Silenc. 1 (2005) 12–20.
- [40] E. Wingender, T. Schoeps, J. Dönitz, TFClass; an expandable hierarchical classification of human transcription factors, Nucleic Acids Res. 41 (2013) D165–D170.

F.C. Costa et al. / Biochimica et Biophysica Acta 1843 (2014) 2944-2956

- [41] N. Ohtomo, T. Tomiya, Y. Tanoue, Y. Inoue, T. Nishikawa, H. Ikeda, Y. Seyama, N. Kokudo, J. Shibahara, M. Fukayama, K. Koike, H. Shirataki, K. Fujiwara, Expression of α-taxilin in hepatocellular carcinoma correlates with growth activity and malignant potential of the tumor, Int. J. Oncol. 37 (2010) 1417–1423.
- [42] T. Mashidori, H. Shirataki, T. Kamai, F. Nakamura, K-I. Yoshida, Increased alpha-taxilin protein expression is associated with the metastatic and invasive potential of renal
- cell cancer, Biomed. Res. 32 (2011) 103–110.
 Z. Pan, M. Erkan, S. Streit, H. Friess, J. Kleeff, Silencing of GRP94 expression promotes apoptosis in pancreatic, Cancer Cells (2009) 823–828.
- X. Yang, K. Khosravi-Far, H.Y. Chang, D. Baltmore, Daxx, a novel fas-binding protein that activates JNK and apoptosis, Cell 89 (1997) 1067–1076.
 L. Lin, T. Ozaki, Y. Takada, H. Kageyama, Y. Nakamura, A. Hata, J.-H. Zhang, W.F.
- [45] L. Lin, T. Ozaki, Y. Takada, H. Kageyama, Y. Nakamura, A. Hata, J.-H. Zhang, W.F. Simonds, A. Nakagawara, H. Koseki, Topors, a p53 and topoisomerase I-binding RING finger protein, is a coactivator of p53 in growth suppression induced by DNA damage, Oncogene 24 (2005) 3385–3396.
 [46] F. Zhao, A. Vilardi, R.J. Neely, J.K. Choi, Promotion of cell cycle progression by basic helix-loop-helix E2A, Mol. Cell Biol. 21 (2001) 6346–6357.
 [47] G. Davidson, J. Shen, Y.-L. Huang, Y. Su, E. Karaulanov, K. Bartscherer, C. Hassler, P. Stannek, M. Boutros, C. Niehrs, Cell cycle control of wnt receptor activation, Dev. Cell 17 (2009) 788–799.
- Cell 17 (2009) 788-799. [48]
- C. Hashimoto, K. Yamato, T. Koseki, M. Ohguchi, A. Ishisaki, H. Shoji, T. Nakamura, Y. Hayashi, H. Sugino, T. Nishihara, The role of activin type I receptors in activin A-induced growth arrest and apoptosis in mouse B-cell hybridoma cells, Cell. Signal. 10 (1998) 743–749.
 [49] X. Wang, C.H. McGowan, M. Zhao, L. He, J.S. Downey, C. Fearns, Y. Wang, S. Huang,
- J. Han, Involvement of the MKK6-p38gamma cascade in gamma-radiation-induced cell cycle arrest, Mol. Cell. Biol. 20 (2000) 4543–4552. [50] Y. Liang, W. Yu, Y. Li, L. Yu, Q. Zhang, F. Wang, Z. Yang, J. Du, Q. Huang, X. Yao, X. Zhu,
- Nudel modulates kinetochore association and function of cytoplasmic dynein in M phase, Mol. Biol. Cell 18 (2007) 2656–2666. C. Sütterlin, R. Polishchuk, M. Pecot, V. Malhotra, The golgi-associated protein
- [51] GRASP65 regulates spindle dynamics and is essential for cell division, Mol. Biol. Cell 16 (2005) 3211-3222.
- [52] S.B. Hake, B.A. Garcia, E.M. Duncan, M. Kauer, G. Dellaire, J. Shabanowitz, D.P. Bazett-Jones, C.D. Allis, D.F. Hunt, Expression patterns and post-translational modifications associated with mammalian histone H3 variants, J. Biol. Chem. 281 (2006) 559–568.
- [53] C.-H. Park, K.-T. Kim, Apoptotic phosphorylation of histone H3 on Ser-10 by protein kinase Cô, PLoS One 7 (2012) e44307.
 [54] Y.Y. Lee, Y.B. Yu, H.P. Gunawardena, L. Xie, X. Chen, BCLAF1 is a radiation-induced
- H2AX-interacting partner involved in γ H2AX-mediated regulation of apoptosis and DNA repair, Cell Death Dis. 3 (2012) e359.
- [55] S. Cho, J.S. Park, Y.-K. Kang, Dual functions of histone-lysine N-methyltransferase Setdb1 protein at promyelocytic leukemia-nuclear body (PML-NB): maintaining

PML-NB structure and regulating the expression of its associated genes, J. Biol. Chem 286 (2011) 41115-41124

- CH. So, A. Michal, K.E. Komolov, J. Luo, J.L. Benovic, G protein-coupled receptor kinase 2 [56] (GRK2) is localized to centrosomes and mediates epidermal growth factor-promoted
- centrosomal separation, Mol. Biol. Cell 24 (2013) 2795–2806. X. Chen, H. Zhu, M. Yuan, J. Fu, Y. Zhou, L. Ma, G-protein-coupled receptor kinase 5 phosphorylates p53 and inhibits DNA damage-induced apoptosis, J. Biol. Chem. 285 (2010) 12823-12830.
- Y. Bando, T. Katayama, A.N. Aleshin, T. Manabe, M. Tohyama, GRP94 reduces cell [58] death in SH-SY5Y cells perturbated calcium homeostasis, Apoptosis 9 (2004) 501-508
- [59] N. Agarwal, Y. Tochigi, A.S. Adhikari, S. Cui, Y. Cui, T. Iwakuma, MTBP plays a crucial role in mitotic progression and chromosome segregation, Cell Death Differ. 18 (2011) 1208–1219.
- [60] J. Odvody, T. Vincent, M.P. Arrate, B. Grieb, S. Wang, J. Garriga, G. Lozano, T. Iwakuma, DS. Haines, C.M. Eischen, A deficiency in Mdm2 binding protein inhibits Myc-induced B-cell proliferation and lymphomagenesis, Oncogene 29 (2010) 3287-3296.
- [62]
- 3287-3290. M. Brady, N. Vlatkovic, M.T. Boyd, Regulation of p53 and MDM2 activity by MTBP, Mol. Cell. Biol. 25 (2005) 545-553. Y.-J. Lee, W.-Y. Hsieh, L.-Y. Chen, C. Li, Protein arginine methylation of SERBP1 by protein arginine methyltransferase 1 affects cytoplasmic/nuclear distribution, J. Cell. Biochem. 113 (2012) 2721–2728.
- Y.S. Mao, B. Zhang, D.L. Spector, Biogenesis and function of nuclear bodies, Trends Genet. 27 (2011) 295–306. [63] [64] P. Salomoni, The PML-interacting protein DAXX: histone loading gets into the
- picture, Front. Oncol. 3 (2013) 152. [65] J.J. Peluso, A. Yuan, X. Liu, V. Lodde, Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding
- protein interacts with progesterone receptor membrane component 1 to regulate progesterone's ability to maintain the viability of spontaneously immortalized granulosa cells and rat granulosa cells, Biol. Reprod. 88 (2013) 20.
- V. Lallemand-Breitenbach, H. de Thé, PML nuclear bodies, Cold Spring Harb.
 Perspect. Biol. 2 (2010) a000661.
 F. Golebiowski, I. Matic, M.H. Tatham, C. Cole, Y. Yin, A. Nakamura, J. Cox, G.J. Barton, [66]
- [67] M. Mann, R.T. Hay, System-wide changes to SUMO modifications in response to heat shock, Sci. Signal. 2 (2009) ra24.
- J. Wang, C. Shiels, P. Sasieni, P.J. Wu, S.A. Islam, P.S. Freemont, D. Sheer, Promyelocytic leukemia nuclear bodies associate with transcriptionally active genomic regions, J. Cell Biol. 164 (2004) 515–526. [68]
- G. Dellaire, D.P. Bazett-Jones, PML nuclear bodies: dynamic sensors of DNA damage and cellular stress, Bioessays 26 (2004) 963–977. [69]
- [70] R. Sudharsan, Y. Azuma, The SUMO ligase PIASI regulates UV-induced apoptosis by recruiting Daxx to SUMOylated foci, J. Cell Sci. 125 (2012) 5819–5829.

4.2. Artigo II (em preparação)

The human regulatory protein Ki-1/57 is a target of SUMOylation and affects PML nuclear bodies distribution

Ângela Saito^{1,2}, Fernanda C Costa¹, Edmarcia E. Souza¹, Kaliandra A Gonçalves¹, Marcos T Santos¹, Gustavo Costa Bressan³, Jörg Kobarg*^{2,4}

¹Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Campinas, São Paulo, Brasil,

²Departamento de Bioquímica-Programa de Pós-graduação em Biologia Funcional e Molecular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970 Campinas, SP, Brasil,

³Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

⁴Departamento de Biologia e Biologia Tecidual, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil,

*Corresponding author: Jörg Kobarg, Universidade Estadual de Campinas. Rua Monteiro Lobato 255, Bloco F, Sala 03. CEP 13083-862, Campinas-SP, Brasil, Tel.: (+55) 19-3521-1443, E-mail: jorgkoba@unicamp.br

Keywords: Ki-1/57, SUMOylation, posttranslational modifications, PML-NBs, stress

Abstract

Ki-1/57 is a nuclear and cytoplasmic regulatory protein first identified in malignant cells from Hodgkin's lymphoma. It is involved in gene expression regulation on both transcriptional and mRNA metabolism levels. Ki-1/57 belongs to the family of intrinsically unstructured proteins, undergoes phosphorylation by PKC and methylation by PRMT1. Previous characterization of protein interaction profile by yeast two-hybrid screening showed that Ki-1/57 interacts with proteins of the SUMOylation machinery: the SUMO E2 conjugating enzyme UBC9 and the SUMO E3 ligase PIAS3, which suggested that Ki-1/57 could be involded with this process. In this work, we aimed to investigate whether Ki-1/57 is SUMOylated and its possible roles in the cell. We have identified seven potential SUMO target sites (lysines residues) on Ki-1/57 sequence through program SUMOplot Prediction. In fact, we have observed that Ki-1/57 is modified by both SUMO-1 and SUMO-2/3 in vitro and in vivo. To identify which lysine residues are covalently attached to SUMO-1 and SUMO-2/3, site-directed mutagenesis of the predicted lysines was performed. Ki-1/57-Flag wild-type and mutants were overexpressed in HEK293 cells, immunoprecipitated with the antibody anti-Flag and probed with anti-SUMO-1 or anti-SUMO-2/3. We showed that SUMOylation in Ki-1/57 protein is essential for its complete splicingrelated activity. Also, in cells expressing either Flag-Ki-1/57 wild-type or mutant, PML-NBs distribution and organization were affected. These results can help to better understand the mechanisms underlying Ki-1/57 regulates the protein functions of the cells.

Introduction

Ki-1/57 (also named as HABP4) is a regulatory protein first identified by the cross-reactivity of the CD30 antibody Ki-1 in malignant cells from Hodgkin lymphoma (Hinrich et al., 1989; J. Kobarg et al., 1997; Schwab et al., 1982). Electron microscopic analyses demonstrated that Ki-1/57 is located in the cytoplasm, nuclear pores and in the nucleus, where it is frequently found in association with nucleoli and other smaller nucleolar bodies (Rohde et al., 1992). Ki-1/57 is phosphorylated on serine and threonine residues by protein kinase C PKC (Hansen et al., 1990; Nery et al., 2004) and methylated by arginine methyltransferase PRMT1 (Passos et al., 2006).

Ki-1/57 has a paralog protein, CGI-55 (also named SERBP1 or PAIRB1), which was first identified as a PAI-1 mRNA binding protein (Heaton et al., 2001). CGI-55 is also located in the cytoplasm and in the nucleus, where it can be found in the nucleoli and p80-coilin-positive coiled bodies (Lemos & Kobarg, 2006). Ki-1/57 and CGI-55 share 40.7% identity and 67.4% similarity (Lemos et al., 2003), and both have a conserved domain called hyaluronic acid binding (HABP4) domain (Costa et al., 2014). The HABP4 domain is enriched with several positively charged amino acids, which may be the explanation for the initial report that Ki-1/57 has a hyaluronan binding activity (Costa et al., 2014; Huang et al., 2000). However, the functional relevance of the binding to negative charged hyaluronan is not known. In addition, Ki-1/57 and CGI-55 proteins have several RNA-binding motifs, RGG/RXR motifs, flanquing the HABP4 domain. The RGG/RXR motifs and the HABP4 domain can act as RNA or other nucleic acid binding module (Bressan et al., 2009; Costa et al., 2014; Passos et al., 2006). Ki-1/57 has been found to interact to uracil-rich RNA probe and to modulate the splicing site selection of the minigene E1A (Bressan et al., 2009).

Previous studies have shown the association of Ki-1/57 with proteins involved to regulatory mechanisms of transcription, RNA metabolism and translation regulation. Yeast two-hybrid assays revealed that several Ki-1/57 protein partners are direct or indirectly related to transcriptional regulation, such as the chromatin remodeling protein CHD3 (Lemos & Kobarg, 2006) and transcription factors MEF2C, p53 and members of p53 family (Kobarg et al., 2005; Nery et al., 2006). Others Ki-1/57-interacting proteins are involved in mRNA metabolism, such as hnRNPQ and SFRS9 (Bressan et al., 2009) and regulation of translation, such as the receptor of activated kinase 1 RACK1, CIRP, FMRP and the ribosomal protein RPL38 (Gonçalves et al., 2011; Nery et al., 2004; Passos et al., 2006). Ki-1/57 and CGI-55 have some interacting partners in common, such as CHD3, Topors, DAXX, PIAS and PRMT1 (Lemos & Kobarg, 2006; Passos et al., 2006). Recently, we described the characterization of the altered genes after Ki-1/57 or CGI-55 ectopic expression in HEK293 cells through microarray experiments. These data along with protein partners interaction obtained by yeast two-hybrid were analyzed in

functional networks, which revealed that most of the regulated genes are involved to proliferation, apoptosis and cell cycle control processes (Costa et al., 2014).

Previous studies also showed the association of CGI-55 and Ki-1/57 with proteins involved in the SUMOylation conjugation pathway, a reversible post-translational modification that regulates the biological functions of a protein. CGI-55 was shown to interact with UBA2, PIAS-1, -3, -y and Topors (Lemos & Kobarg, 2006) and Ki-1/57 with UBC9, PIAS-3 and Topors (Nery et al., 2006). In the process of SUMOylation, SUMO (small ubiquitin-like modifier) is covalently attached to a lysine residue in a $\Psi KX(D/E)$ sequence (where Ψ is a large hydrophobic residue and X represents any amino acid) of a specific target proteins (Geiss-Friedlander & Melchior, 2007; Johnson, 2004). SUMOylation regulates diverse cellular processes, including transcription, DNA repair, chromatin structure, cell-cycle progression and intracellular trafficking. In many cases, SUMO modification alters localization and/or activity of the substrate by providing a new protein-protein interaction interface (Geiss-Friedlander & Melchior, 2007; Gill, 2004; Johnson, 2004). In mammals there are four SUMO proteins: SUMO-1, -2, -3, -4. SUMO proteins are 11 kDa in size and, although they share only 18% of amino acids identity with ubiquitin, the three-dimensional structure closely resembles that of ubiquitin (Bayer et al., 1998). SUMO-2 and SUMO-3 are approximately 96% identical, but share only 50% of identity with SUMO-1. SUMO-4 is more similar to SUMO-2/3, however it is not clear whether SUMO-4 forms conjugates in vivo (Owerbach et al., 2005). SUMO-2/3, but not SUMO-1, are able to form polymeric chains through its lysine 11. The steps involved in SUMO pathway are the ATP-dependent activation of mature SUMO protein by the SUMO-activating enzyme E1 (heterodimer AOS1/UBA2), SUMO transference to the SUMO-conjugating enzyme E2 (UBC9) and SUMO transference to the substrate forming an isopeptide bond between the C-terminal glicine residue of SUMO and a lysine site chain of the target. This last step can be accompanied by SUMO E3 ligases proteins that have been known to enhance the sumoylation by facilitate the transference of SUMO from UBC9 to the target protein (Gareau & Lima, 2010b; Johnson, 2004; D. Lin et al., 2002)(Johnson 2004, Desterro et al., 1997 and Lin et al., 2002).

In this work, we demonstrate that the human Ki-1/57 is a target of SUMOylation both *in vitro* and in vivo. We performed site-directed mutagenesis to identify the sites modified by SUMO-1 and SUMO-2/3 in the Ki-1/57 sequence. We found that the triple mutant containing the lysines 213, 276 and 336 mutated to arginines (K3R) are the main Ki-1/57 SUMOylation sites. Interestingly, we found that the SUMOylation of Ki-1/57 regulates its splicing related-activity. After UV cellular irradiation, the Ki-1/57 triple mutant is no longer able to localize to cytoplasmic stress granules as the wild-type Ki-1/57 does. Instead, this mutant seems to localize preferentially to the nucleus. Together, this study shows the SUMOylation of Ki-1/57 as its novel pos-translational modification that regulates important functions

such as its ability to modulate the E1A pre-mRNA splicing site selection and its subcellular localization upon stress-induction.

Materials and Methods

Plasmid Construction

The cDNA encoding full-length Ki-1/57 in fusion with the N-terminal Flag tag into pcDNA6 (pcDNA6-flag-Ki-1/57) has been previously described (Bressan et al., 2009). Cloning Ki-1/57 (1-413) as a C-terminal fusion to GST (Ki-1/57-GST) into pGEX-2TK has been described (Nery et al., 2004). Point mutant derivatives of Ki-1/57 (double-mutants: K213R and K336R or K276R and K336R, triple mutant: K213R, K276R and K336R and quintuple mutant: K336R, K213R, K276R, K313R and K306R were constructed by site-directed mutagenesis (QuikChange[™] Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene). Mutants were PCR-amplified and sub-cloned into pcDNA6-Flag and pEGFPC vectors. The N-terminally Flag-tagged CGI-55 construct cloned into pcDNA6 Myc/His (Invitrogen) was kindly provided by John L. Goodier (University of Pennsylvania School of Medicine). Full-length human SUMO-1, SUMO-2 and UBC9 cDNAs were PCR-amplified and cloned in fusion with the N-terminal Myc tag in the BamHI - XhoI restrictions sites of pcDNA3-Myc vector.

Protein Expression and Purification

Full-length Ki-1/57 fused to GST (Ki-1/57-GST) was expressed in *Escherichia coli* BL21 strain by induction with 0.5 mM IPTG. Purification of lysate was performed using GST-Trap column (Amersham) and elution buffer containing 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. The concentration of the recombinant protein was determined spectroscopically using the calculated extinction coefficient for the denatured proteins as described (Sambrook et al., 1989).

In vitro SUMOylation assay

For *in vitro* SUMOylation assays of Ki-1/57, a SUMOylation Kit (BIOMOL) was used according to the manufacturer's instructions. RanGAP1-GST protein provided by the kit, Ki-1/57-GST and GST protein were used at 2 nM concentration each one. The control reactions were carried out in the absence of ATP. Reactions were analyzed by Western blot using rabbit polyclonal anti-SUMO1 (1:1000 –

BIOMOL), rabbit polyclonal anti-SUMO-2/3 (1:1000- BIOMOL) or mouse monoclonal anti-Ki-1/57 (A26) (Kobarg et al., 1997), followed by membrane stripping and analysis by mouse monoclonal anti-GST antibody (Assmann et al., 2006).

Cell culture and transfections

HEK-293T and HeLa cells were cultivated in high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen, South America), 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Invitrogen) at 37 °C and 5% CO₂ atmosphere. Transient transfections in HEK293T cells were performed using the calcium phosphate method (Bressan et al., 2009) or the linear 25 kDa polyethylenimine (PEI, Polysciences) (Costa et al., 2014). HeLa cells were transfected with Fugene 6 Transfection Reagent (Promega).

Lysis and Immunoprecipitation for detection of SUMOylated proteins by Western blot

After 48 h of transfection, cells were washed in ice-cold PBS supplemented with10 mM Nethylmaleimide (NEM, Sigma), lysed in buffer containing PBS, 1% SDS, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 10 mM NEM and complete protease inhibitor set (Roche). After brief sonication, 50 mM DTT was added to the cell lysates, which was boiled for 95°C and diluted 1:3 in cold RIPA dilution buffer (20 mM phosphate buffer pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 10 mM NEM and complete protease inhibitor set). Lysates were cleared at 16000 g at 4°C for 20 min (Barysch et al., 2014). Protein concentrations were determined using the BCA Protein Assay Reagent Kit (Thermo Scientific). The cleared lysates were incubated with a homemade rabbit polyclonal anti-Ki-1/57 or anti-CGI-55 coupled to protein A-Sepharose 4 fast-flow beads (GE Healthcare), or mouse monoclonal anti-Flag M2 (Sigma) coupled to protein G-Sepharose 4 fast flow beads (GE Healthcare) at 4°C for 16 h. Beads were recovered and washed three times in lysis buffer before elution of immunoprecipitated proteins in sample buffer. The eluates were analyzed by Western blot with nitrocellulose membranes, using rabbit polyclonal anti-SUMO-2 (1:1000; Abcam), rabbit polyclonal anti-SUMO-1 (1:500, Abgent) and mouse monoclonal anti-Flag M2 (1:5000; Sigma). Membranes were incubated with the respective horseradish peroxidase-conjugated secondary (1:5000) for 1 h, washed and developed by chemiluminescence using Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent.

Immunofluorescence

HeLa cells were cultivated onto coverslips in 6-well to following incubation at 37°C for 24 hours and treated with 2μ M thapsigargin or AS₂O₃ for 90 min.

The cells were fixed and permeabilized for immunofluorescence in 3.7% formaldehyde solution (Sigma-Aldrich, F1635) containing 0.2% Triton X-100 into phosphate-buffered saline (PBS) 1x at room temperature for 20 min. The fixed specimens were quenched with 7.5 mg/mL glycine following rehydratation with PBS at room temperature for 5 min, and blocked in PBS-AT (3% BSA, 0,5% Triton X-100, into PBS1x) at room temperature for 30 min. The cells were incubated for 1 h in room temperature in primaries antibodies diluted in PBS-AT: P53 (sc-1311, Santa Cruz); FMRP (ab17722, Abcam); TIA-1 (sc-1751, Santa Cruz); PML (sc-966, Santa Cruz); Flag (M2, Sigma).

Primary antibodies were removed by washing with PBST-AT and then the secondary antibodies diluted in PBS-AT: Alexa Fluor® 647 Chicken Anti-Mouse (A21463, Life Technologies), Alexa Fluor 488 chicken anti-goat (A21467, Life Technologies), Alexa Fluor 546 donkey anti-rabbit (A10040, Life Technologies) were incubated for 40 min. The cells were stained with Hoescht 33258 to visualize nuclei. After rinsing in 1x PBS, cells were mounted in ProLong Gold mounting media (Life Technologies). From the coverslips, a series of Z stack images of interphase cells were captured from 0.35 µm thick sections using a Confocal Laser Scanning Microscope SP8 – Leica. The entire fixed cell volume was imaged and processed for 3-D rendering using Imaris (Bitplane).

In vivo splicing assay

For the in vivo splicing analysis, we transiently transfected COS-7 cells with the minigene E1A encoding plasmid pMTE1A (Zerler et al., 1986), in combination with crescent amounts of Ki-1/57 wild type or triple mutant. The DNA concentration in each transfection was kept constant by using the empty vector pEGFP (Life Technologies Corporation). After 48 h of transfection, the cells were re-suspended in 1 mL of TRizol reagent (Life Technologies Corporation) for total RNA extraction according to the manufacturer's protocol. cDNA synthesis was performed using oligo-dT primer (GE Healthcare, Waukesha, WI, USA) and the Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Life Technologies Corporation). The PCRs were performed with the primers 5'-ATTATCTGCCACGGAAGGTGT-3' (sense) and 5'GGATAGCAGGCGCCATTTTA-3' (anti-sense), as previously described (Raffetseder et al., 2003). After separation of the amplification products on 3% agarose gels containing ethidium bromide, intensities calculated the band were using the software image i (http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html; National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA). The intensities of all isoforms were summed, set as 100%, and used to normalize the intensity of each band.

Results

Ki-1/57 is modified by SUMO-1 and SUMO-2/3 in vitro

SUMOylation is an important post-translational modification that regulates the biological functions of proteins in essential processes, such as: gene transcription, subcellular organization, and cell cycle progression (Geiss-Friedlander & Melchior, 2007). Previously, Ki-1/57 has been shown to interact with proteins of the SUMOylation machinery, including UBC9, PIAS3 and Topors (Nery et al., 2006). In order to investigate whether human Ki-1/57 has predicted SUMOylation sites, Ki-1/57 amino acid sequence was analyzed through the web-available SUMOplotTM tool (Figure 1A). Seven potential SUMO conjugation sites were identified in the Ki-1/57 sequence, in which the lysines 213, 276 and 336 were found as the most likely sites of SUMOylation, with a score higher than 67%. By comparing the scores with those of other known SUMOylated proteins, human Ki-1/57 seemed to be a potential target of SUMOylation. To study this hypothesis, recombinant Ki-1/57-GST was used as substrate protein for *in vitro* SUMOylation assay (Figure 1B). The reaction was performed in the presence of ATP, SUMO E1 and E2 enzymes, SUMO-1 or SUMO-2/3 proteins, followed by Western blot using antibodies against SUMO-1 or SUMO-2/3. As observed in Figure 1B, slowest-migrating high molecular weight bands show that Ki-1/57-GST is modified by SUMO-1, -2 and -3 proteins.

Ki-1/57 and its paralog, CGI-55, are conjugated with SUMO-1 or SUMO-2 proteins in vivo.

Next, in order to verify whether human Ki-1/57 is also a SUMOylated protein *in vivo*, Flag-tagged Ki-1/57 was transiently expressed with the SUMO-conjugating enzyme E2 (UBC9) fused to Myc (Myc-UBC9) and SUMO-1 or SUMO-2 proteins (Myc-SUMO-1 or Myc-SUMO-2) in HEK293T cells. Flag-Ki-1/57 was immunoprecipitated, followed by the western blot analyses using anti-Flag, anti-SUMO-1 and anti-SUMO-2 antibodies. As shown in Figure 2A and 2B, immunoprecipitated Flag-Ki-1/57 was detected with anti-SUMO-1 and anti-SUMO-2 antibodies, respectively, indicating that human Ki-1/57 is a SUMOylated protein *in vivo*.

A paralog protein of Ki-1/57, known as CGI-55 or SERBP1, also interacted with proteins of the SUMOylation pathway, such as UBA2, a component of the SUMO-activating enzyme E1 and PIAS-1,

-3 and –y, known to work as SUMO E3 enzymes (Lemos & Kobarg, 2006). In order to investigate whether CGI-55 is also modified by SUMO proteins, analysis of CGI-55 amino acid sequence at SUMOplotTM tool was performed, showing that CGI-55 contains several potential SUMOylated motifs (Supplementary Figure S1). In order to show that CGI-55 is modified by either SUMO-1 and SUMO-2 under normal culture conditions, Flag-tagged CGI-55 was transiently expressed with Myc-UBC9, and Myc-SUMO-1 or Myc-SUMO-2 proteins. The afterward immunoprecipitation and Western blot showed that CGI-55 is highly modified by both SUMO-1 and SUMO-2 proteins under non-stressed culture conditions (Figure 2B and 2C).

To identify the SUMOylated motifs in the Ki-1/57 sequence, site-directed mutagenesis was performed in which the lysine residues had been changed to arginine to preserve the positive amino acid charge. Single mutants, two double mutants (K213R and K336R) or (K276R and K336R), one triple mutant (K213R, K276R and K336R) and quintuple mutant (K336R, K213R, K276R, K313R and K306R) were generated. HEK293T cells were transfected with wild-type (wt) or mutated Ki-1/57 and EGFP-SUMO-1 plasmid. The cell lysates were immunoprecipitated with anti-Flag antibody followed by immunoprobing with anti-SUMO-1 antibody. As shown in Figure 3A, SUMO-1 was significantly weaker but could still be detected in the two double mutants (K213R and K336R) or (K276R and K336R) of Ki-1/57. However, for the triple mutant of Ki-1/57 (K213R, K276R and K336R), SUMO-1 modification was no longer detectable. In summary, these data suggest that the three lysines 213, 276 and 336 are all acceptor sites for SUMO conjugation in Ki-1/57. It is worthy noting that these three lysines were the ones that had the highest score in the analysis at the SUMOplotTM program (Figure 1A). The triple mutant Ki-1/57 (K213R, K276R and K336R) was also tested for the SUMO-2 modification in vivo. As show in Figure 3B, only the wild-type protein but not the triple mutant is SUMOylated with SUMO-2, although the degree of modification with SUMO-2 seems to be lower than that with SUMO-1 (Figure 3B).

SUMOylation of Ki-1/57 is required for its splicing regulating activity.

The association of Ki-1/57 with splicing proteins pointed out to a possible functional role of its SUMOylation in pre-mRNA splicing regulation. Bressan et al., 2009 showed that Ki-1/57 modulates the splicing site selection of the adenoviral E1A minigene, previously explored for the Ki-1/57-interacting proteins SFRS9 (serine/arginine-rich splicing factor 9) and YB-1 (Raffetseder et al., 2003). Pelisch and co-workers observation that SF2/ASF expression levels control the sumoylation status of RNA metabolism-related proteins may suggest that SF2/ASF may be a putative molecular and functional link between the RNA processing and sumoylation machineries (Pelisch et al., 2010). SF2/ASF belongs to

the serine/arginine (SR)-rich family of pre-mRNA splicing factors, together with SFRS9 which interacts with Ki-1/57. Depending on the 5' splice site selection, the E1A pre-mRNA may generate five isoforms: 13S, 12S, 11S, 10S, and 9S (Figure 4A) (Stephens & Harlow, 1987). These isoforms can be monitored by RT-PCR followed by agarose gel analysis, where the intensity of each band in the gel directly correlates with the splicing site selection, which, in turn, reflects the positive or negative influence of regulatory proteins (Cáceres et al.,1994; Stephens & Harlow, 1987). We transiently co-transfected the encoding E1A minigene plasmid with increasing amounts of vectors expressing EGFP–Ki-1/57 in COS-7 cells (Control) or EGFP–Ki-1/57 triple mutant. We observed a significant effect of the EGFP–Ki-1/57 triple mutant (K213R, K276R and K336R) in modifying the pattern of splicing of E1A mRNA in comparison with EGFP–Ki-1/57 wild type (Figure 4B). Therefore, this result show a novel function on the Ki-1/57 SUMOylation for its splicing-related activity.

Ki-1/57 overexpression affects PML distribution

The observation that several Ki-1/57 and CGI-55-interacting proteins (p53, DAXX, Topors, Ubc9, PIASy) can localize to PML nuclear bodies (PML-NBs) and can be modified by SUMO proteins tempted us to investigate a possible role of Ki-1/57 in the PML-NBs distribution. For that, HeLa cells were transiently transfected with plasmids for the expression of Flag-Ki-1/57 wild-type and Flag-Ki-1/57 triple mutant (K3R: K213R, K276R and K336R). To increase PML-NBs formation, cells were treated with arsenic trioxide (As₂O₃) and immunolabeled for PML and p53, a Ki-1/57 partner which can shuttle to PML-NBs. Interestingly, in cells overexpressing either Flag-Ki-1/57 wild-type or mutant the PML distribution was affected, leading to an apparent increase in the soluble PML, reduced number of PML-NBs and formation of some aggregates in the cytoplasm. This effect of Ki-1/57 was intensified in the presence of stress induced by As₂O₃ (Figure 5).

Discussion

In this study, we investigated the SUMOylation of the human regulatory protein Ki-1/57 and its possible role for the function of Ki-1/57. The earliest indication that Ki-1/57 and its paralog protein, CGI-55, could be posttranslationally modified by SUMO proteins emerged with the discovery that these proteins are associated to proteins of the SUMOylation machinery (Lemos & Kobarg, 2006; Nery et al., 2006). Yeast two-hybrid assays revealed that the N-terminal region of Ki-1/57 interacts with the SUMO E2 enzyme UBC9 and the C-terminal region interacts with the SUMO E3 enzymes PIAS3 and TOPORS

(Nery et al., 2006). Further, CGI-55 was shown to interact with the SUMO E1 enzyme subunit UBA2 and the SUMO E3 enzymes PIAS-1, -3, -y and TOPORS (Lemos & Kobarg, 2006).

During the process of SUMOylation, the attachment of SUMO to a target protein is mediated by a sequential cascade of reactions such as: the energy-dependent activation of mature SUMO protein by SUMO-activating enzyme E1 (formed by a heterodimer AOS1/UBA2), transfer of SUMO from E1 to SUMO-conjugating enzyme E2 (UBC9), which catalyze conjugation to a substrate, resulting in the formation of an isopeptide bond between the C-terminal carboxyl group of the SUMO and an ε -amino group of a substrate acceptor lysine residue (Bernier-Villamor et al., 2002; Rodriguez et al., 2001).

Here, we show that Ki-1/57 contains several predicted SUMOylation motifs and demonstrated the modification of human Ki-1/57 and its paralog, CGI-55, by either SUMO-1 or SUMO-2 proteins *in vivo*. Ki-1/57 or CGI-55 fused to Flag were co-transfected along with UBC9 and SUMO-1 or SUMO-2 in HEK293T cells, followed by immunoprecipitation with anti-Flag and western blot of the precipitated proteins with antibodies against SUMO. Recently, Ki-1/57 has been identified as modified by SUMO-1 during the mitotic phase of cell cycle in a mass spectrometry study using *Xenopus* egg extract (Ma et al., 2014). The paralog CGI-55 has been shown to conjugate to SUMO-2 in a systematic study on SUMO modifications in response to heat shock (Golebiowski et al., 2009). Also, a recent study on the identification of global SUMOylation sites by mass spectrometry identified the second isoform of CGI-55 (Q8NC51-2) containing three SUMO-2 target sites, the lysines 102, 222 and 275 in HeLa cells under control, MG231, heat-shock and PR619-treated cells (Hendriks et al., 2014).

In order to identify the SUMOylated motifs in Ki-1/57, we performed site-directed mutagenesis of its predicted SUMOylated lysines. The wild-type and mutants containing two or three different combinations of mutations in Ki-1/57 were transiently transfected along with UBC9, and SUMO-1 or SUMO-2 in HEK293T cells and immunoprecipitated by anti-Flag antibody. SUMOylation was assessed by using antibodies against SUMO-1 or SUMO-2 with the immunoprecipitated protein. We could identify three SUMOylated lysines in Ki-1/57 protein. The facts that Ki-1/57 and CGI-55 are SUMOylated and their interaction with known SUMO E3 ligases, such as TOPORS and PIAS proteins, suggest a possible function of these E3 enzymes enhancing the SUMOylation of Ki-1/57 and CGI-55.

Posttranslational modifications (PTMs) of proteins have been shown to regulate their functions, properties and subcellular localizations by adding more flexibility and/or modulating their capacity of interaction to other protein or DNA/RNA. Protein-protein interaction and the subcellular localization of Ki-1/57 have been shown to be regulated by its posttranslational modifications. Previously, our group showed that Ki-1/57 is phosphorylated in serine and threonine residues by PKC upon activation of Hodgkin's lymphoma analogous cell line L540 with the PKC-activator PMA. Under these conditions,

the interaction between Ki-1/57 and the adaptor protein RACK1 (receptor of activated kinase 1) is abolished, resulting in Ki-1/57 translocation from nucleus to cytoplasm (Nery et al., 2004). Also, Ki-1/57 interacts with and is methylated by protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1) (Passos et al., 2006). The methylation status of Ki-1/57 is important for its localization to small nuclear bodies. Under normal cellular conditions, Ki-1/57 can partially localize to nuclear speckles, which is known structures for storage of splicing factors. Upon treatment with the methylation inhibitor Adox, Ki-1/57 was found to localize to the nucleoli, where ribosomal biogenesis and maturation take place and to Cajal-bodies and GEMS, known important sites for spliceosomal and non-spliceosomal snRNP biogenesis, maturation and recycling (Bressan et al., 2008). The subcellular localization of CGI-55 is also regulated by its methylation status. In cells treated with Adox, CGI-55 was found to localize predominately to the nucleus (Lee et al., 2012).

Ki-1/57 is a RNA-binding protein and has been found to regulate the splicing site selection of the adenoviral E1A minigene, a typical assay to verify *in vivo* splicing regulation (Bressan et al., 2009). In this study, the triple mutant Ki-1/57 was tested on its capacity to modulate the E1A splicing. A difference in the E1A isoforms pattern was observed in cells transfected with the EGFP–Ki-1/57 triple mutant in comparison with EGFP–Ki-1/57 wild type. Therefore, we show that SUMOylation in Ki-1/57 protein seems to be essential for its complete splicing-related activity.

Interestingly, we have previously found that both Ki-1/57 and CGI-55 interact with several proteins of PML nuclear bodies (PML-NBs) such as p53, DAXX, Topors, Ubc9 and PIASy (Lemos & Kobarg, 2006; Nery et al., 2006; Van Damme et al., 2010). PML-NBs are dynamic domains formed by PML proteins, which recruit protein partners in response to oxidative stress and interferon-stimulation (Bernardi and Pandolfi 2007; Sahin et al., 2014; Sahin et al., 2014b). Recent studies have shown SUMOylation as a key player on the PML-NBs organization and biochemical functions (Sahin et al., 2014). Upon arsenic trioxide (As_2O_3) treatment, PML oxidation leads to PML nucleation onto NBs, followed by recruitment to NBs of the SUMO E2 enzyme UBC9, which binds to PML and stimulates its SUMOylation. Then, the SUMOylated PML becomes a docking site for the association of partner proteins through multiple labile SUMO-SIM interactions. The SUMO-interacting motif (SIM) of the partner protein is able to interact to the SUMO covalently linked to PML, forming a polarized interaction and resulting in the retention of the partner within the NB core. The next events lead to the increasing global SUMOylation, most likely to NB partners. Since several NB partners are protein-modifying enzymes, NBs may act as sensors that facilitate and confer oxidative stress sensitivity not only to SUMOylation but also to other post-translational modifications, like ubiquitilation, acetylation or phosphorylation, resulting in partner activation, inactivation or degradaion (Sahin et al., 2014). Here, we performed confocal microscopy to analyze whether Ki-1/57 wild-type and triple mutant are localized to PML-NBs using an antibody against PML protein. Although we could not observe their localization to punctuated nuclear bodies neither in control nor As₂O₃-stressed cells, the expression of both Ki-1/57 wild-type and mutant in HeLa cells affected PML-NBs distribution, leading to an apparent increase the soluble PML and reduced number of PML-NBs. Changes in the PML-NBs rearrangement with increased PML in a nucleoplasmic diffusible form has been described after UVC irradiation of human cells (Kurki et al., 2003; Seker et al., 2003) and shown to occur in a p53-dependent fashion. It was suggested that p53 participates of the redistribution of PML protein from PML-NBs to sites of repair of UVC-induced DNA damage (Seker et al., 2003). Previously, Ki-1/57 was shown to interact with p53 and reduce its transcriptional activity (Nery et al., 2006). Therefore, although the exact mechanism for the action of Ki-1/57 in the redistribution of PML is not possible to explain with these data, the facts that Ki-1/57 is involved to the gene expression regulation and can be associated with p53, this may be one way by which Ki 1/57 acts in the PML redistribution.

References

Assmann, E. M., Alborghetti, M. R., Camargo, M. E. R., & Kobarg, J. (2006). FEZ1 dimerization and interaction with transcription regulatory proteins involves its coiled-coil region. The Journal of Biological Chemistry, 281(15), 9869–81.

Barysch, S. V, Dittner, C., Flotho, A., Becker, J., & Melchior, F. (2014). Identification and analysis of endogenous SUMO1 and SUMO2/3 targets in mammalian cells and tissues using monoclonal antibodies. Nature Protocols, 9(4), 896–909.

Bayer, P., Arndt, A., Metzger, S., Mahajan, R., Melchior, F., Jaenicke, R., & Becker, J. (1998). Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. Journal of Molecular Biology, 280(2), 275–86.

Bernardi, R., & Pandolfi, P. P. (2007). Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. Nature Reviews. Molecular Cell Biology, 8(12), 1006–16.

Bernier-Villamor, V., Sampson, D. A., Matunis, M. J., & Lima, C. D. (2002). Structural basis for E2mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1. Cell, 108(3), 345–56.

Bressan, G. C., Quaresma, A. J. C., Moraes, E. C., Manfiolli, A. O., Passos, D. O., Gomes, M. D., & Kobarg, J. (2009). Functional association of human Ki-1/57 with pre-mRNA splicing events. The FEBS Journal, 276(14), 3770–83.

Bressan, G. C., Silva, C., Borges, C., Passos, D. O., Ramos, C. H. I., Torriani, I. L., & Ma, G. (2008). Human Regulatory Protein Ki-1 / 57 Has Characteristics of an Intrinsically Unstructured Protein research articles, 4465– 4474. Cáceres, J. F., Stamm, S., Helfman, D. M., & Krainer, A. R. (1994). Regulation of alternative splicing in vivo by overexpression of antagonistic splicing factors. Science (New York, N.Y.), 265(5179), 1706–9.

Costa, F. C., Saito, A., Gonçalves, K. A., Vidigal, P. M., Meirelles, G. V, Bressan, G. C., & Kobarg, J. (2014). Ki-1/57 and CGI-55 ectopic expression impact cellular pathways involved in proliferation and stress response regulation. Biochimica et Biophysica Acta, 1843(12), 2944–56.

Gareau, J. R., & Lima, C. D. (2010). The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. Nature Reviews. Molecular Cell Biology, 11(12), 861–71.

Geiss-Friedlander, R., & Melchior, F. (2007). Concepts in sumoylation: a decade on. Nature Reviews. Molecular Cell Biology, 8(12), 947–56.

Gill, G. (2004). SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? Genes & Development, 18(17), 2046–59.

Golebiowski, F., Matic, I., Tatham, M. H., Cole, C., Yin, Y., Nakamura, A., ... Hay, R. T. (2009). Systemwide changes to SUMO modifications in response to heat shock. Science Signaling, 2(72), ra24.

Gonçalves, K. de A., Bressan, G. C., Saito, A., Morello, L. G., Zanchin, N. I. T., & Kobarg, J. (2011). Evidence for the association of the human regulatory protein Ki-1/57 with the translational machinery. FEBS Letters, 585(16), 2556–60.

Hansen, H., Bredfeldt, G., Havsteen, B., & Lemke, H. (1990). Protein kinase activity of the intracellular but not of the membrane-associated form of the KI-1 antigen (CD30). Research in Immunology, 141(1), 13–31.

Hansen, H., Lemke, H., Bredfelt, G., Könnecke, I., & Havsteen, B. (1989). The Hodgkin-Associated Ki-1 Antigen Exists in an Intracellular and a Membrane-Bound Form. Biological Chemistry Hoppe-Seyler, 370, 409– 416.

Heaton, J. H., Dlakic, W. M., Dlakic, M., & Gelehrter, T. D. (2001). Identification and cDNA Cloning of a Novel RNA-binding Protein That Interacts with the Cyclic Nucleotide-responsive Sequence in the Type-1 Plasminogen Activator Inhibitor mRNA. Journal of Biological Chemistry, 276(5), 3341–3347.

Hendriks, I. A., D'Souza, R. C. J., Yang, B., Verlaan-de Vries, M., Mann, M., & Vertegaal, A. C. O. (2014). Uncovering global SUMOylation signaling networks in a site-specific manner. Nature Structural & Molecular Biology, 21(10), 927–936.

Huang, L., Grammatikakis, N., Yoneda, M., Banerjee, S. D., & Toole, B. P. (2000). Molecular characterization of a novel intracellular hyaluronan-binding protein. The Journal of Biological Chemistry, 275(38), 29829–39.

Johnson, E. S. (2004). Protein modification by SUMO. Annual Review of Biochemistry, 73, 355-82.

Kobarg, C. B., Kobarg, J., Crosara-Alberto, D. P., Theizen, T. H., & Franchini, K. G. (2005). MEF2C DNAbinding activity is inhibited through its interaction with the regulatory protein Ki-1/57. FEBS Letters, 579(12), 2615–22.

Kobarg, J., Schnittger, S., Fonatsch, C., Lemke, H., Bowen, M. A., Buck, F., & Hansen, H. P. (1997). Characterization, mapping and partial cDNA sequence of the 57-kD intracellular Ki-1 antigen. Experimental and Clinical Immunogenetics, 14(4), 273–80.

Kurki, S., Latonen, L., & Laiho, M. (2003). Cellular stress and DNA damage invoke temporally distinct Mdm2, p53 and PML complexes and damage-specific nuclear relocalization. Journal of Cell Science, 116(Pt 19), 3917–25.

Lee, Y., Hsieh, W., Chen, L., & Li, C. (2012). Protein arginine methylation of SERBP1 by protein arginine methyltransferase 1 affects cytoplasmic / nuclear distribution. Journal of Cellular Biochemistry, 113, 2721–28.

Lemos, T. A., & Kobarg, J. (2006). CGI-55 Interacts With Nuclear Proteins and Co-Localizes to p80-Coilin Positive-Coiled Bodies in the Nucleus. Cell Biochemistry and Biophysics, 44, 463–474.

Lemos, T. A., Passos, D. O., Nery, F. C., & 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 Letters, 533, 14–20.

Lin, D., Tatham, M. H., Yu, B., Kim, S., Hay, R. T., & Chen, Y. (2002). Identification of a substrate recognition site on Ubc9. The Journal of Biological Chemistry, 277(24), 21740–8.

Ma, L., Aslanian, A., Sun, H., Jin, M., Shi, Y., Yates, J. R., & Hunter, T. (2014). Identification of small ubiquitin-like modifier substrates with diverse functions using the Xenopus egg extract system. Molecular & Cellular Proteomics : MCP, 13(7), 1659–75.

Nery, F. C., Passos, D. O., Garcia, V. S., & 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. The Journal of Biological Chemistry, 279(12), 11444–55.

Nery, F. C., Rui, E., Kuniyoshi, T. M., & Kobarg, J. (2006). Evidence for the interaction of the regulatory protein Ki-1/57 with p53 and its interacting proteins. Biochemical and Biophysical Research Communications, 341(3), 847–55. Owerbach, D., McKay, E. M., Yeh, E. T. H., Gabbay, K. H., & Bohren, K. M. (2005). A proline-90 residue unique to SUMO-4 prevents maturation and sumoylation. Biochemical and Biophysical Research Communications, 337(2), 517–20.

Passos, D. O., Bressan, G. C., Nery, F. C., & Kobarg, J. (2006). Ki-1/57 interacts with PRMT1 and is a substrate for arginine methylation. The FEBS Journal, 273(17), 3946–61.

Pelisch, F., Gerez, J., Druker, J., Schor, I. E., Munoz, M. J., Risso, G. Srebrow, A. (2010). The serine/arginine-rich protein SF2/ASF regulates protein sumoylation. Proceedings of the National Academy of Sciences, 107(37), 16119–16124.

Raffetseder, U., Frye, B., Rauen, T., Jurchott, K., Royer, H.-D., Jansen, P. L., & Mertens, P. R. (2003). Splicing Factor SRp30c Interaction with Y-box Protein-1 Confers Nuclear YB-1 Shuttling and Alternative Splice Site Selection. Journal of Biological Chemistry, 278(20), 18241–18248.

Rodriguez, M. S., Dargemont, C., & Hay, R. T. (2001). SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting. The Journal of Biological Chemistry, 276(16), 12654–9.

Rohde, D., Hansen, H., Hafner, M., Lange, H., Mielke, V., Hansmann, M. L., & Lemke, H. (1992). Cellular localizations and processing of the two molecular forms of the Hodgkin-associated Ki-1 (CD30) antigen. The protein kinase Ki-1/57 occurs in the nucleus. The American Journal of Pathology, 140(2), 473–82.

Sahin, U., Ferhi, O., Jeanne, M., Benhenda, S., Berthier, C., Jollivet, F., ... Lallemand-Breitenbach, V. (2014). Oxidative stress-induced assembly of PML nuclear bodies controls sumoylation of partner proteins. The Journal of Cell Biology, 204(6), 931–45.

Sahin, U., Lallemand-Breitenbach, V., & de Thé, H. (2014). PML nuclear bodies: regulation, function and therapeutic perspectives. The Journal of Pathology, 234(3), 289–91.

Schwab, U., Stein, H., Gerdes, J., Lemke, H., Kirchner, H., Schaadt, M., & Diehl, V. (1982). Production of a monoclonal antibody specific for Hodgkin and Sternberg–Reed cells of Hodgkin's disease and a subset of normal lymphoid cells. Nature, 299(5878), 65–67.

Seker, H., Rubbi, C., Linke, S. P., Bowman, E. D., Garfield, S., Hansen, L., ... Harris, C. C. (2003). UV-Cinduced DNA damage leads to p53-dependent nuclear trafficking of PML. Oncogene, 22(11), 1620–8.

Stephens, C., & Harlow, E. (1987). Differential splicing yields novel adenovirus 5 E1A mRNAs that encode 30 kd and 35 kd proteins. The EMBO Journal, 6(7), 2027–35.

Van Damme, E., Laukens, K., Dang, T. H., & Van Ostade, X. (2010). A manually curated network of the PML nuclear body interactome reveals an important role for PML-NBs in SUMOylation dynamics. International Journal of Biological Sciences, 6(1), 51–67.

A	No.	Pos.	Group	Score
	1	K336	YRDDM VKDD YEDDS	0.93
	2	K276	EEESP AKVP ELEVE	0.69
	3	K213	AFDOR GKRE FERYG	0.67
	4	K306	QEQIR PKPE FNIRK	0.61
[5	K313	PEFNI REPE STVPS	0.44
[6	K166	ADFTA EKFP DEKPG	0.39
Γ	7	K171	EKFPD EKPG DRFDR	0.33



В



Ki-1/57 is a target of SUMOylation *in vitro*. (A) Identification of seven potential SUMO attachment sites in the Ki-1/57 amino acid sequence through the web-available SUMOplotTM tool. Left: Table showing the position of the potential SUMOylated lysines, its motifs (bold), lysines (underlined) and respective scores. Red score indicates the most likely site of modification by SUMO protein. Right: Representation of the position of potential SUMOylated lysines in the Ki-1/57 protein. (B) *In vitro* SUMOylation assay. For *in vitro* SUMOylation assays, GST-fused Ki-1/57 (Ki-1/57-GST) was used as substrate protein for the reactions, which were performed in the presence or in the absence of ATP, presence of E1, E2 and SUMO-1, or -2 or -3 proteins as indicated. RanGAP-1-GST and GST proteins were used as controls. Reactions were analyzed by western blot (WB) using rabbit polyclonal anti-SUMO1 (BIOMOL), rabbit polyclonal anti-SUMO-2 (BIOMOL), or mouse monoclonal anti-Ki-1/57 (A26) (Kobarg J. et al., 1997), followed by membrane stripping and analysis with mouse monoclonal anti-GST antibody (Assmann et al., 2006). Asterisks indicate SUMO-modified-Ki-1/57-GST.





Ki-1/57 and its paralog, CGI-55, are conjugated with SUMO-1 or SUMO-2 proteins *in vivo*. (A) HEK293T cells were transiently co-transfected with pcDNA Flag (empty vector) or pcDNA Ki-1/57 Flag, pcDNA Myc UBC9, and pcDNA Myc SUMO-1. Cells extracts were immunoprecipitated (IP) with protein G-sepharose beads and antibody against Flag tag. The protein complexes obtained were analyzed by western blot (WB) as indicated in the panel. Asterisk indicates SUMO-1 conjugated-Ki-1/57. (B) HEK293T cells were transiently co-transfected with pcDNA Flag (empty vector) or pcDNA Ki-1/57 Flag or pcDNA CGI-55 Flag, pcDNA Myc UBC9, and pcDNA Myc SUMO-1 or pcDNA Myc SUMO-2. Cells extracts were immunoprecipitated (IP) with G-sepharose beads and anti-Flag. The obtained

protein complexes were analyzed by western blot (WB) as indicated in the panel. Asterisk indicates SUMO-2 conjugated-Ki-1/57 or SUMO-2 conjugated-CGI-55. (C) HEK293T cells were transiently cotransfected with pcDNA Flag (empty vector) or pcDNA CGI-55 Flag, pcDNA Myc UBC9, and pcDNA Myc SUMO-1. Cells extracts were immunoprecipitated (IP) with A-sepharose beads and polyclonal rabbit anti-CGI-55. The obtained protein complexes were analyzed by western blot (WB) as indicated in the panel. Asterisk indicates SUMO-1 conjugated-CGI-55. WL: Whole cell lysate.



Ki-1/57 is SUMO-modified at lysines K213, K276 and K336. (A) HEK293T cells were transiently transfected with pCDNA6 Flag Ki-1/57 (wt: wild-type) or double mutants Ki-1/57 (K336R and K213R) or (K336R and K276R) or triple mutant (K336R, K276R and K213R). Cells extracts were immunoprecipitated (IP) with G-sepharose beads and antibody against Flag tag. The obtained protein complexes were analyzed by western blot (WB) using anti-Flag and anti-SUMO-1 antibodies. Arrow indicates SUMO-1 conjugated-Ki-1/57. (B) HEK293T cells were transiently transfected with pCDNA6 Flag Ki-1/57 (wt: wild-type) or triple mutant (K38: K336R, K276R and K213R). Cells extracts were immunoprecipitated (IP) with G-sepharose beads and anti-Flag and anti-SUMO-1 antibodies. Arrow indicates SUMO-1 conjugated-Ki-1/57. (B) HEK293T cells were transiently transfected with pCDNA6 Flag Ki-1/57 (wt: wild-type) or triple mutant (K3R: K336R, K276R and K213R). Cells extracts were immunoprecipitated (IP) with G-sepharose beads and anti-Flag antibody. The obtained protein complexes were analyzed by western blot (WB) using anti-Flag and anti-SUMO-2/3 antibodies. Arrow indicates SUMO-2/3 conjugated-Ki-1/57. Arrowheads indicate the antibody heavy chain.



Sumoylation of Ki-1/57 is required for its splicing regulating activity. (A) Diagram showing the splicing events that generate the 13S, 12S, 10S and 9S mRNAS of the E1A reporter. (B) *In vivo splicing* assays. COS-7 cells were transiently cotransfected with an E1A minigene-encoding plasmid, an empty pEGFP vector and increasing amounts (1X, 5 μ g; 2X, 10 μ g; 3X, 15 μ g) of pEGFP-Ki-1/57 (full length) or pEGFP-Ki-1/57 triple mutant (MUT) vectors. An empty pEGFP vector was used to normalize the final DNA concentration in each transfection. The displayed figures are representative of at least three independent experiments. We achieved approximately 60% transfection efficiency in all experiments performed. M = marker.



Ki-1/57 overexpression affects PML distribution. HeLa cells cultured on glass coverslips were transfected with plasmids pcDNA Flag (Flag empty), pcDNA Flag-Ki-1/57 wild-type (wt) or pcDNA Flag-Ki-1/57 triple mutant (K3R). Cells were treated with 2 μ M AS₂O₃ for 90 min or left as untreated as indicated. The cells were subsequently fixed and immunolabeled with anti-Flag, anti-PML and anti-p53. At least 35 cells per condition were analyzed from two separate experiments. Images are presented as maximal intensity projections of multiple z-slices. Scale bar is indicated in the images.

4.3. Geração de linhagem de camundongo nocaute para Ki-1/57

Com o intuito de gerar uma linhagem de camundongo nocaute para Ki-1/57, adotou-se inicialmente a estratégia de recombinação homóloga no *locus Habp4* em células-tronco embrionárias (CTE). Primeiramente, foi necessário estabelecer as técnicas de cultivo de CTE em nosso laboratório e confirmação de capacidade de contribuição das mesmas para linhagem germinativa do camundongo. Segue abaixo uma breve descrição desta etapa.

4.3.1. Cultivo e subclonagem de células-tronco embrionárias murinas para testar seu potencial em contribuir para geração de camundongos

A linhagem de células-tronco embrionárias (CTE) murinas, E14TG2A, foi gentilmente concedida pela Dra. Deborah Schechtman (IQ-USP) e foram cultivadas sem suporte de fibroblastos (*Mouse Embryonic Fibroblasts* - MEF) (Figura 8). O meio de cultura contém LIF (*Leukemia Inhibitor Factor*), uma citocina altamente glicosilada que inibe a diferenciação de células-tronco embrionárias e, portanto, as mantêm em estado de pluripotência (Boiani & Schöler, 2005). Posteriormente, estas mesmas células foram utilizadas para recombinação homóloga no *locus Habp4*.



Figura 8: Fotos de cultura de células E14TG2A observadas em microscópio invertido (Nikon TS100). (A) Objetiva de 4x. (B) Objetiva de 10x.

Com o intuito de avaliar o estado pluripotente da linhagem de células E14TG2A, foi realizada uma imunocitoquímica para o fator de transcrição Oct-4 (Figura 9), o qual corresponde a um dos conhecidos marcadores de pluripotência de CTE murinas (Niwa et al. 2000). A marcação positiva de

quase todos os núcleos para a presença de Oct-4 indica que estas estão em estado indiferenciado. Note, no campo apresentado, que a seta branca indica uma célula negativa para Oct-4, representando uma célula já diferenciada.



Figura 9: Expressão do marcador de pluripotência Oct-4 em células-tronco embrionárias E14TG2A. O núcleo da célula foi marcado com DAPI (azul). A proteína Oct-4 foi imunodetectada (em verde) com o anticorpo primário anti-oct-4 (Santa cruz Biotechnology) e anticorpo secundário AlexaFluor 488 (Molecular Probes). O merge é a sobreposição das duas fotos. A seta indica o núcleo de uma célula diferenciada, pois é negativa para Oct-4.

As CTE da linhagem E14TG2A foram subclonadas utilizando um microcapilar de vidro para isolar somente uma célula e transferí-la para o poço da placa de 96 poços. Após cerca de cinco dias em cultura com meio de cultura padrão suplementado com 30% de soro fetal bovino e 1000 u de LIF, os clones foram expandidos e congelados. O cariótipo de dois clones revelou número de cromossomos normal para células murinas, isto é, 40 cromossomos autossomais e 2 cromossomos sexuais (Figura 10). Esses dados de pluripotência e cariótipo das células E14TG2a mostraram-se muito positivos para que pudessem ser utilizadas na estratégia de recombinação homóloga no gene que codifica a proteína Ki-1/57.


Figura 10: Cariótipo dos clones 1 e 2 de células-tronco embrionárias murinas E14TG2A.

Com o intuito de avaliar o potencial das células E14TG2a em contribuir para geração de camundongos, os dois clones selvagens (clone 1 e clone 2) foram microinjetados em blastocistos de camundongo C57BL/6, uma linhagem *inbred*, historicamente muito utilizada no desenvolvimento de modelos de animais geneticamente modificados. As injeções foram realizadas pela pesquisadora Dra. Carolina Clemente do Laboratório de Modificação do Genoma (LNBio, CNPEM), coordenado pelo Dr. José Xavier Neto.

As células E14TG2A são oriundas de camundongo de fundo genético 129/Ola, o qual apresenta o genótipo para o *loci* de cor de pelagem: $A^w/A^w Oca2^p Tyr^{c-ch}/Oca2^p Tyr^{c-ch}$, sendo os alelos: $A^w = white$ *bellied Agouti* (apresenta pigmentação mais clara nos pelos da barriga); $Oca2^p = pink-eye$ (olhos pouco pigmentados); $Tyr^{c-ch} = chinchilla$ (alelo recessivo do *locus* albino, responsável pela pigmentação creme do pelo). O fenótipo do pelo dessa linhagem é cor creme clara. A linhagem C57BL/6 apresenta genótipo a/a P/P C/C, sendo os alelos: a = non-agouti; P = non-pink; C = pigmented (alelo dominante do *locus* albino). O alelo não-agouti de C57BL/6 apresenta uma mutação, que consiste na inserção de um retrotransposon no primeiro intron do gene e abole sua expressão, por isso a pelagem preta da linhagem C57BL/6 (Bultman et al., 1994).

A microinjeção do clone dois de CTE E14TG2A selvagem em blastocisto de C57BL/6 originou camundongos de pelagem quimera com alta contribuição (Figura 11A). Em seguida, os camundongos quimeras foram acasalados com camundongos C57BL/6 selvagens, e confirmou-se a colonização de CTE em linhagem germinativa, pois a prole apresentou pelagem agouti (Figura 11B). Portanto, esses testes inicias confirmaram a capacidade de nossas CTE em contribuir para formação do camundongo.



Figura 11: As CTE E14TG2A selvagens são capazes de contribuir para a geração de camundongos quimeras e colonização de linhagem germinativa. (A) Camundongos quimeras obtidos da injeção do clone dois de CTE E14TG2A em blastocistos de C57BL/6. (B) Camundongos de pelagem agouti, obtidos do acasalamento de um macho quimera com uma fêmea C57BL/6. Assim, confirmou-se a contribuição das CTE através de linhagem germinativa.

4.3.2. Recombinação homóloga no locus Habp4

Com o intuito de nocautear o gene de Ki-1/57, chamado *Habp4*, construiu-se primeiramente um vetor alvo para remover, através de recombinação homóloga, alguns exons desse gene. Para o desenho dessa estratégia, as seguintes características foram as principais destacadas: sequência do gene (tamanho, número de introns e exons, sítios de enzimas de restrição, sítio de início da transcrição), localização cromossomal e genes vizinhos, presença de possíveis regiões regulatórias e de variantes de *splicing* alternativo. O mapa de enzimas de restrição no *locus* genômico foi necessário para a construção do vetor alvo; também, a sequência genômica que flanqueia o alelo de interesse foi examinada para garantir que nenhum gene vizinho seja interrompido durante a recombinação.

O gene *Habp4* murino (Gene ID: 56541; MGI:1891713) possui oito exons e comprimento de 24615 pb (Chr 13: 64263227 – 64287841), sendo que o sítio de início da transcrição está localizado no primeiro exon do gene. Este gene está localizado na banda três do braço longo do cromossomo treze (13qB3). Em camundongos, não é descrito até o momento outra isoforma além da canônica, que codifica uma proteína de 45 kDa (Figura 12). Em humanos, este gene possui uma variante de *splicing*, o qual não apresenta os exons 3, 4 e 5, originando uma proteína de 34 kDa.



Figura 12: (A) Localização do gene *Habp4* murino na banda três do braço longo do cromossomo treze (13qB3). (B) Tamanho do gene evidenciando os exons (retângulos vermelhos), íntrons (linhas) e regiões 5'UTR e 3'UTR (retângulos vazios).

Um vetor alvo (Figura 13A) foi construído para remover, por recombinação homóloga, parte do primeiro exon (deixando 69 pb que corresponde a 20% do primeiro exon) e os exons dois a cinco inteiros, substituindo-os por um cassete de seleção positiva. O desenho da estratégia de construção do vetor alvo contou com as dicas e sugestões do Dr. Richard Behringer, pesquisador na The University of Texas, MD Anderson Cancer Center, Houston, EUA. Além disso, o Dr. Behringer gentilmente concedeu os vetores que contêm os genes LacZ, resistência a neomicina e timidina quinase utilizados na construção do vetor alvo.

Basicamente, o vetor alvo contém um cassete de seleção positiva *IRES-LacZ-loxP-PGK-neo-bpA-loxP*, flanqueado por braços de homologia 5' e 3', que apresentam 3,3 kb e 3,8 kb, respectivamente. Ambos os braços de homologia foram amplificados a partir de DNA genômico extraído da linhagem de células-tronco embrionárias E14TG2A, a mesma utilizada na recombinação homóloga. Este cassete contém uma sequência *Internal Ribosome Entry Site* (IRES) seguida do gene da β -galactosidase (LacZ), *SV40 polyadenylation signal*, sequência loxP, promotor PGK1, gene de resistência a neomicina, sequência *SV40 polyadenylation signal* e loxP. O braço de homologia 5' possui 3,3 kb e contém a região promotora do gene *Habp4*, localizada imediatamente a montante do primeiro exon, e uma porção de 69 pb do exon 1. O braço de homologia 3' contém 3,8 kb do íntron 5 do gene. O vetor também contém um gene de seleção negativa *MC1-tk-pA* (*herpes simplex virus thymidine kinase*), localizado após o braço de homologia 3' e tem o intuito de enriquecer a frequência de recombinação homóloga quando as células são tratadas com FIAU. Após a recombinação homóloga, parte do primeiro exon e os exons dois a cinco do gene *Habp4* são substituídos pelo cassete de seleção positiva. Assim, a expressão do gene da β -galactosidase é dirigida pelo próprio promotor do gene *Habp4*.



Figura 13: Recombinação homóloga no *locus Habp4*. (A) Ilustração esquemática do *locus* genômico *Habp4* (codifica Ki-1/57; acima), vetor alvo (ao meio) e alelo alvo (abaixo). A posição dos sítios de enzima de restrição está indicado, assim como os exons (quadrados pretos), gene de resistência a neomicina (PGKneobpA), gene repórter β -galactosidase (LacZ) e o gene que codifica a timidina quinase (MC1-tk-pA). Os braços de homologia 5' e 3' são as regiões de 3.3 kb e 3.8 kb, respectivamente, delimitadas pelas linhas pontilhadas. As setas indicam o tamanho dos fragmentos de restrição de XbaI e de HindIII, que foram usados para identificar corretamente os clones recombinantes através de Southern blot utilizando as sondas 5' e 3'. (B) Identificação do clone recombinante através de Southern Blot utilizando a sonda 5'. O alelo selvagem corresponde à banda de cerca de 6,5 kb, enquanto que o alelo recombinante corresponde à banda de aproximadamente 5,5 kb. (C) Identificação do clone recombinante através de PCR realizado com primers que anelam fora do braço de homologia 5' (primer sense) e outro no cassete LacZ (primer antisense). O mesmo clone recombinante foi identificado no Southern Blot e PCR e foi chamado de clone 4E10.

Com o intuito de aprender os detalhes das técnicas que envolvem a manipulação de células-tronco embrionárias, foi realizado um estágio de quatro meses com bolsa BEPE (Projeto Fapesp 2013/04492-5) no laboratório do Prof. Dr. Richard Behringer. O Dr. Behringer possui ampla experiência em manipulação genética de células e camundongos, fato este que acelerou a obtenção dos resultados consideravelmente. Foram realizadas as etapas de eletroporação do vetor alvo em células-tronco embrionárias E14TG2A, seleção dos clones recombinantes, screening em larga escala por Southern Blot, expansão e congelamento dos clones positivos.

O vetor alvo, linearizado no sítio de enzima de restrição NotI, foi eletroporado em células-tronco embrionárias E14TG2A e, o tratamento com as drogas G418 e FIAU para a seleção positiva e negativa, respectivamente, foi iniciado no dia seguinte da eletroporação. Como controle, uma placa de células eletroporadas foi mantida em meio contendo somente G418, para checar o grau de inserções randômicas do vetor alvo no genoma, uma vez que estas inserções aleatórias costumam incluir o gene MC1-tk-pA. Na presença deste gene, a droga FIAU torna-se letal para colônias de células-tronco embrionárias, pois a timidina quinase fosforila seu substrato FIAU e gera um produto tóxico para as células (Borrelli et al., 1988). Após a seleção por 8 dias, o número de clones obtidos em cada condição (presença de G418 e FIAU ou apenas G418) foi contado e está descrito na Tabela 6. Os clones de células resistentes a ambos G418 e FIAU foram individualmente pegos e transferidos para poços da placa de 96 poços. Quando os clones expandiram-se nos poços dessa placa, placas réplicas foram criadas para o congelamento e extração de gDNA dos clones. Após a criação de placas réplicas das placas principais (master plates), DNA genômico foi extraído dos clones e digerido com a enzima de restrição XbaI para o screening através de southern blot. Foi utilizada uma sonda de DNA de 359 pb, marcada com α^{32} P, e denominada sonda 5', pois anela na porção externa a montante do braço de homologia 5'. Após a primeira eletroporação, a seleção com G418 e FIAU gerou 358 clones resistentes, e a seleção com apenas G418 gerou 1455 clones resistentes. Portanto, a seleção com FIAU resultou em enriquecimento de cerca de quatro vezes sobre a seleção com apenas G418, indicando enriquecimento para os eventos de recombinação homóloga contra os randômicos. A partir desta primeira eletroporação, cerca de 200 clones foram avaliados por Southern blot, dos quais nenhum apresentou o alelo recombinate de 5,5 kb. Todos apresentaram um fragmento de 6,5 kb, que corresponde ao alelo selvagem (Figura 13A).

Sendo assim, uma segunda sequência de eletroporação e seleção de clones foi realizada. Como havia sido observado após a primeira eletroporação/seleção, a seleção negativa resultou na mesma taxa de enriquecimento de 4x comparada a seleção positiva. Note, na Tabela 6, o número de clones obtidos a cada 10 milhões de células eletroporadas.

Felizmente, foi identificado um clone nocaute heterozigoto (*Habp4*^{+/-}), denominado 4E10 (Figura 13B e C). O alelo selvagem (+/+) deste clone corresponde à banda na altura de 6,5 kb, já o alelo heterozigoto (+/-) tem aproximadamente 5,5 kb. Observe que a quantidade de DNA dos dois alelos do clone 4E10 é a mesma, o que indica que não houve contaminação desse clone com outro clone. Sendo assim, procedeu-se com o descongelamento da placa principal de 96 poços onde o clone 4E10 havia sido congelado, seguido de expansão do mesmo e congelamento de seus estoques de células.

Tabela 6: Número de clones resistentes à ambos G418 e FIAU ou à apenas G418 por 10⁷ células eletroporadas com o vetor alvo linearizado. Duas sequências de eletroporação e seleção foram realizadas independentemente. O número de clones obtidos está indicado na tabela. O enriquecimento é a razão de clones resistentes a apenas G418 por clones resistentes a ambos G418 e FIAU.

	1° seleção	2° seleção
G418 ^R e FIAU ^R	358	340
G418 ^R	1455	1390
Enriquecimento	4x	4x

Com o intuito de gerar animais quimeras do clone recombinante (4E10), o mesmo foi injetado em blastocistos de camundongo C57BL/6 pela equipe do Laboratório de Modificação do Genoma (LMG), localizado no LNBio/CNPEM. Foram obtidos quatro animais com pelagem quimera (mistura de pelagem agouti e preta), dos quais dois eram machos e duas eram fêmeas (Figura 14). Estes animais foram acasalados com animais C57BL/6 selvagens para verificar as quimeras apresentaram colonização de linhagem germinativa. Infelizmente, após três cruzamentos com animais selvagens, todos os animais gerados apresentaram pelagem preta, o que indicou que não houve contribuição para a linhagem germinativa.



Figura 14: Filhotes quimeras gerados a partir da injeção do clone nocaute heterozigoto *Habp4*^{+/-} (4E10) em blastocistos de C57BL/6.

4.3.1.1. Cariotipagem do clone nocaute heterozigoto Habp4^{+/-}

Para checar o número de cromossomos das CTE selvagens e do clone recombinante positivo *Habp4*^{+/-} (4E10), os mesmos foram tratados com demecolcina, um agente desestabilizador de microtúbulos que leva à parada do ciclo celular em mitose, seguido de preparação para determinação do número de cromossomos. O cariótipo normal de camundongo é 40 cromossomos, sendo 38 cromossomos autossomais e 2 sexuais. A cariotipagem das células selvagens e do clone nocaute heterozigoto revelou que ambos apresentam quase 70% de células com cariótipo normal (Figura 15).



Figura 15: Contagem de cromossomos de células-tronco embrionárias selvagens (wt) e do clone heterozigoto $4E10 (Habp4^{+/-})$. (A) Fotos representativas dos cromossomos em metáfase corados com Giemsa. (B) Porcentagem de células com 38, 39, 40 e 41 cromossomos.

4.3.1.2. Ensaios de proliferação celular do clone nocaute heterozigoto Habp4^{+/-}

Os experimentos de expressão gênica global, descritos no Artigo I, demonstraram que a superexpressão de Ki-1/57 em células HEK293T regulou negativamente diversos genes envolvidos em proliferação celular e os ensaios de MTS e incorporação de EdU revelaram uma redução da proliferação em células superexpressando Ki-1/57. Sendo assim, dado o possível envolvimento de Ki-1/57 na

regulação negativa da proliferação celular, o clone 4E10 (*Habp4*^{+/-}) foi caracterizado quanto à sua capacidade de proliferação através da incorporação de BrdU e EdU, dois análogos de timidina que são incorporados no DNA durante a fase de síntese de células em divisão.

As células foram tratadas com EdU, marcadas com Alexa488-Azida e analisadas em microscópio confocal. Uma análise quantitativa da proliferação celular foi realizada através de tratamento das células com BrdU, marcação com anti-BrdU-FITC, seguido de avaliação por citometria de fluxo. Os resultados de citometria de fluxo mostraram que não houve diferença significativa de proliferação celular entre o clone heterozigoto 4E10 e as células selvagens (Figura 16).

Embora tenhamos observado, como descrito no Artigo I, que a superexpressão de Ki-1/57 em células HEK293T resulte na modulação negativa de genes de proliferação celular, além de menor taxa de crescimento celular (ensaios de MTS e EdU), a redução de Ki-1/57 não necessariamente precisaria causar um efeito oposto da superexpressão, uma vez que ainda existe um resíduo de proteína sendo expressa (são células heterozigotas), além do fato de se tratar de tipos celulares diferentes (células HEK293 e CTE).



Figura 16: Proliferação de células-tronco embrionárias selvagens (wt) e o clone nocaute heterozigoto 4E10 (*Habp4*^{+/-}). (A) Imagens representativas de células marcadas com EdU (verde). O núcleo foi corado com DAPI (azul). (B) Porcentagem de células positivas para BrdU. Os dados são duplicatas biológicas realizadas em triplicatas ± S.D.

4.3.1.3. Caracterização dos níveis de expressão de Ki-1/57 e CGI-55 no clone de células-tronco embrionárias *Habp4*^{+/-}

Com o intuito de avaliar a expressão gênica de Ki-1/57 no clone de CTE nocaute heterozigoto *Habp4*^{+/-} em comparação com as CTE selvagens (*Habp4* wt), realizou-se qRT-PCR com primers (Tabela 3) específicos para *Habp4* murino. Em níveis de mRNA, este clone de CTE heterozigoto apresentou 45% de expressão de Ki-1/57 quando comparado com células selvagens (Figura 17). Em busca de indícios de uma possível compensação funcional do gene parálogo de Ki-1/57, *Serbp1* (ou CGI-55), as CTE selvagens e heterozigotas foram avaliadas quanto à expressão de CGI-55. Embora tenhamos observado uma tendência de aumento de expressão de CGI-55 no clone *Habp4*^{+/-}, este aumento não foi significativo.



Figura 17: Expressão relativa de Ki-1/57 e CGI-55 em células-tronco embrionárias selvagens (*Habp4* wt) e heterozigotas para Ki-1/157 (*Habp4*^{+/-}). (A) Expressão relativa do gene *Habp4*, que codifica a proteína Ki-1/57. Os primers utilizados anelam nos exons 3 e 4 do gene. (B) Expressão relativa do gene *Serbp1*, que codifica a proteína CGI-55. Os níveis de mRNA dos genes foram normalizados pelo gene endógeno *Gapdh*. Valores representam a média \pm SDM de 3 réplicas biológicas independentes. *p<0.01 comparado ao wt, os resultados foram avaliados por *Student's t-test*.

Para avaliar o estado pluripotente das CTE selvagens (*Habp4* wt) e heterozigotas para Ki-1/57 (*Habp4*^{+/-}), a expressão de Oct-4, um dos genes de plutipotência, foi avaliada por qRT-PCR e Western Blot (Figura 18). A expressão dos níveis de mRNA do gene *Puo5f1* (ou Oct-4) e de proteína Oct-4 não foi alterada com a redução da expressão de Ki-1/57, o que indicou que as células do clone heterozigoto eram pluripotentes e aptas para serem utilizadas em ensaios de diferenciação celular e para geração de camundongo nocaute.



Figura 18: Expressão de Oct-4 em células-tronco embrionárias selvagens (Habp4 wt) e heterozigotas para Ki-1/157 ($Habp4^{+/-}$, e 4E10). (A) Expressão relativa do gene Puo5f1, que codifica Oct-4. (B) Western blot de células células-tronco embrionárias selvagens (WT) e de clones de células-tronco embrionárias selecionados no *screening*. Foi avaliada a expressão da proteína de pluripotência Oct-4. O clone 4E10 corresponde ao clone recombinante $Habp4^{+/-}$ confirmado por Southern Blot. Como controle, células HEK293T foram utilizadas, uma vez que não apresentam expressão de Oct-4. Os níveis de mRNA de Oct-4 foram normalizados pelo gene endógeno *Gapdh*. Valores representam a média \pm SDM de 3 réplicas biológicas independentes.

4.3.1.4. Diferenciação in vitro de células-tronco embrionárias

Com o intuito de investigar se o clone nocaute heterozigoto *Habp4*^{+/-} é capaz de se diferenciar *in vitro* e se existe um possível papel regulatório de Ki-1/57 no processo de diferenciação de células-tronco embrionárias, o clone heterozigoto e as células selvagens foram utilizados em ensaios de diferenciação *in vitro* através da formação de corpos embrióides (CE) pelo método de *hanging drop*. A glicoproteína LIF, um dos fatores que mantém as células em estado indiferenciado, foi removida do meio de cultura padrão durante todo o procedimento (Figura 19).

O método de *hanging drop* consiste em colocar a suspensão de células em gotas na tampa de uma placa, de modo a deixar as gotinhas invertidas, para que as células se agreguem na ponta da gota e formem uma estrutura tridimensional chamada de corpos embrióides (CE). Após três dias, os CE são coletados das gotas e transferidos para placas não aderentes, onde são cultivados em suspensão por mais dois dias. Este procedimento leva à diferenciação espontânea de tipos celulares derivados dos três folhetos germinativos. Os cardiomiócitos, em particular, possuem um fenótipo facilmente observado: são formados pequenos conjuntos de células que se contraem: os chamados focos pulsantes.



Figura 19: Diferenciação de células-tronco embrionárias (CTE) através da formação de corpos embrióides (EB). A diferenciação espontânea foi realizada em meio de cultura padrão sem LIF, já a diferenciação neuronal foi induzida por 1 µM de *all-trans* Ácido Retinóico (RA).

No sétimo dia de diferenciação espontânea, foi possível observar os primeiros focos de contração nos CE selvagens e no clone heterozigoto $Habp4^{+/-}$. No entanto, este último pareceu apresentar uma quantidade menor de focos pulsantes com reduzida frequência de pulsação, embora uma análise quantitativa não tenha sido realizada. Os CE foram mantidos em cultura e, no dia 16 de diferenciação espontânea, foram fixados e submetidos à dupla marcação para proteína sarcomérica α -actinina e o fator de transcrição GATA4. α -actinina é uma proteína que se liga à actina e é importante na formação e manutenção do disco Z dos sarcômeros de células contráteis. GATA4 é um fator de transcrição da família de dedos de zinco, expresso inicialmente no desenvolvimento na endoderme e posteriormente em tecido cardíaco, epitélio intestinal e nas gônadas (Capo-Chichi et al., 2005; Narita et al., 1997; Soudais et al., 1995).

Os CEs são formados de populações heterogêneas de células, portanto, para obter melhores informações de suas estruturas como um todo, 20 campos vizinhos em uma mesma região foram capturados e foram montados adjacentes uns aos outros. Os painéis A e B da Figura 20 representam esta montagem dos campos de uma região do CE selvagem (wt) e do CE heterozigoto ($Habp4^{+/-}$), respectivamente. É possível observar a marcação para α -actinina delimitando uma população de células musculares de formato alongado em ambos os CEs. Também, estriações correspondentes ao disco Z do sarcômero foram identificados em algumas dessas células positivas para α -actinina e em ambos os CEs

(Figura 20 C e D). Na metade superior do painel A, observa-se uma marcação de GATA4 bem definida no núcleo de células com formato menos alongado, algumas das quais apresentaram baixa expressão de α-actinina. Nesse mesmo painel, a expressão de GATA4 também pode ser observada em um número pequeno de células alongadas juntamente com a expressão de α -actinina, sugerindo uma especificação em fibras cardíacas dessas células. No painel B, um número maior de células positivas para α-actinina também apresenta marcação para GATA4, o qual parece estar mais difuso na célula. Em outras regiões do CE heterozigoto, não demonstrados nesta figura, foi observada a presença de GATA4 no núcleo de populações de células com formato mais achatado. Sendo assim, como mencionado anteriormente, os CEs podem ser muito heterogêneos, o que pode dificultar a avaliação comparativa entre dois CEs diferentes. Se um deles apresentar uma diferença extrema, por exemplo, a ausência total de detecção de uma proteína tecido-específica, então o fenótipo torna-se facilmente caracterizado. Outras marcações dos CEs selvagens e heterozigotos foram realizadas com anticorpos para Nkx2.5 e MEF2C, que especificam cardiomiócitos, no entanto, ambos os CEs apresentaram populações positivas para esses marcadores cardíacos. Embora não tenha sido possível determinar, por esses experimentos, uma diferença de marcação que pudesse ter sido ocasionada pela redução de Ki-1/57 no CE heterozigoto, o fato de as células selvagens e heterozigotas terem sido capazes de se diferenciarem e formarem cardiomiócitos com focos pulsantes é um bom indicativo da qualidade das células, principalmente, do clone modificado geneticamente (heterozigoto).



Figura 20: Células-tronco embrionárias selvagens E14TG2A selvagens (Wt, A e C) e o clone heterozigoto 4E10 $Habp4^{+/-}$ (B e D) foram induzidos à diferenciação espontânea através da formação de Corpos Embrióides (CE). No dia 16, os CE foram fixados com paraformaldeído 4% e marcados com anticorpos contra a proteína sarcomérica α -actinina (1:100) e o fator de transcrição Gata4 (1:150). As setas em C e D indicam o sarcômero. O núcleo foi marcado com Hoechst 33342 em azul. Os anticorpos secundários usados foram chicken anti-mouse conjugado a AlexaFluor 488 e donkey anti-rabbit conjugado a AlexaFluor 546 (1:300).

Adicionalmente, os protocolos de diferenciação têm sido padronizados com o intuito de levar ao desenvolvimento de certas linhagens celulares específicas. Para diferenciação neural, o *all-trans* ácido retinóico (AR), um derivado da vitamina A, tem sido frequentemente utilizado a concentrações que variam entre a faixa de 10^{-8} a 0.5×10^{-6} M (Akanuma et al., 2012; Kim et al., 2009). Células-tronco embrionárias, em seu estado indiferenciado, expressam altos níveis do receptor de AR, o RAR α , enquanto o início de expressão de RAR β ocorre após a formação dos CE (Akanuma et al., 2012). Neste experimento, a diferenciação neural do clone *Habp4*^{+/-} e da célula selvagem foi induzida pela adição de 1 μ M de *all-trans* ácido retinóico no meio de cultura a partir do terceiro dia de diferenciação (Figura 19).

As primeiras estruturas semelhantes a neurônios começaram a ser observadas a partir do oitavo dia de diferenciação. Após dez dias de tratamento com AR, os CE foram fixados e marcados para Nestin, um indicador de neuroectoderme, e para a proteína associada a microtúbulos MAP2, um indicador somatodendrítico da região proximal dos axônios e dos dendritos (Figura 21, A e B). A proteína precursora neural β-III tubulina e a proteína de células da glia GFAP também foram marcadas, como mostrado na Figura 21, C e D. Ambos os CE, selvagens e heterozigotos, apresentaram formação de prolongamentos na presença de AR, no entanto, foi possível observar uma maior quantidade de prolongamentos e principalmente de ramificações nos CE oriundos do clone heterozigoto *Habp4^{+/-}*. Este resultado sugere um possível papel funcional de Ki-1/57 na regulação da formação dos prolongamentos e ramificações axonais.



Figura 21: Diferenciação neuronal de células-tronco embrionárias selvagens E14TG2A Wt (A e C) e o clone heterozigoto 4E10 *Habp4*^{+/-} (B e D) em Corpos Embrióides (CE). Os CE foram tratados com 1 µM

de all-trans Ácido Retinóico (RA) por 10 dias e fixados com paraformaldeído 4%. (A and B) Dupla marcação para o marcador de neuroectoderme anti-Nestin (1:200) e a proteína associada a microtúbulos 2 anti-MAP2 (1:200), um marcador somatodendrítico da parte proximal dos axônios e dos dendritos. (B e D) Os CE foram marcados para o precursor neural anti-β-III tubulina (1:420) e a proteína glial fibrilar ácida anti-GFAP (1:1000). O núcleo foi marcado com Hoechst 33342 em azul. Os anticorpos secundários usados foram chicken anti-mouse conjugado a AlexaFluor 488 e donkey anti-rabbit conjugado a AlexaFluor 546 (1:300).

4.3.3. Sistema CRISPR/Cas9 para geração de linhagens de camundongo nocaute

4.3.2.1. Desenho e teste da eficiência dos RNAs guias (sgRNAs) em células

No decorrer deste projeto, o sistema CRISPR/Cas9 estava emergindo como um promissor método alternativo para realizar modificações específicas no genoma. O aprendizado sobre esta técnica e os primeiros experimentos foram realizados no segundo semestre de 2013 durante o período em que estive no laboratório do Dr. Richard Behringer (The University of Texas, MD Anderson Cancer Center, Houston, EUA). Pela facilidade, eficiência e reduzido tempo como tem sido descrito para gerar camundongos modificados, decidimos concentrar esforços nesta técnica para gerar uma linhagem de animal nocaute para Ki-1/57.

A única isoforma até então conhecida para Ki-1/57 em camundongos apresenta o sítio de ínio da tradução no primeiro exon do gene *Habp4*, região que foi utilizada na análise para determinar as sequências de vinte nucleotídeos do pequeno RNA guia (sgRNA). Duas principais considerações foram levadas para selecionar essas sequências: (i) 5'-NGG, denominado PAM (*Protospacer Adjacent Motif*), localizado a jusante à região complementar no DNA alvo e (ii) a minimização de possíveis *offtargets*. A seleção e análise do sgRNA foi feita através do programa *online* CRISPR Design Tool, o qual fornece possíveis sequências de sgRNA a partir da região *input* colocada. Este programa também utiliza algoritmos para inferir a presença de possíveis regiões *offtargets* no genoma e classifica o sgRNA de acordo com o número total de *offtargets* e o número de *offtargets* presentes dentro de regiões codificantes do genoma. As sequências do sgRNA para o gene *Habp4* também foram avaliadas pela ferramenta BLAST para acessar outros possíveis *offtargets*.

Foram desenhadas quatro sequências guias diferentes para o primeiro exon do gene *Habp4* (Figura 22 A). Estas sequências foram clonadas, separadamente, no vetor px330 (Figura 6), o qual possui um promotor de RNA polimerase III U6 responsável por dirigir a expressão do sgRNA. Este vetor também contém o gene para expressar a endonuclease h*Sp*Cas9, enzima que realiza a clivagem do DNA.

Para verificar se os sgRNAs para Ki-1/57 eram capazes de induzir mutações (*indels*: inserções e/ou deleções), células-tronco embrionárias (CTE) E14TG2A foram co-eletroporadas com três plasmídeos: os plasmídeos px330-Habp4-sgRNA1, px330-Habp4-sgRNA2 e o plasmídeo PGK-puromicina-bpA, os quais direcionam a expressão do sgRNA1, sgRNA2 e gene de resistência a puromicina, respectivamente. As células foram selecionadas com puromicina por dois dias e coletadas para extração de DNA genômico, seguido de análise de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP).

É importante ressaltar que a sequência alvo do primeiro sgRNA (sgRNA1) possui um sítio endógeno de enzima de restrição NruI (Figura 22 B), que é interrompido com a mutação. DNA genômico foi extraído do conjunto de células eletroporadas e selecionadas com puromicina, ou de células não eletroporadas e foi utilizado para amplificar um fragmento de 1200 pb na região do sítio dos sgRNAs (Figura 22 A). Em seguida, a digestão dos fragmentos com NruI foi realizada e observou-se que fragmentos menores de 500 pb e 700 pb foram gerados, mas uma fração de fragmento não clivado foi observado nas amostras das células eletroporadas, o que indicou que o sgRNA 1 e a Cas9 foram eficientes em induzir a clivagem no *locus* alvo e interromper o sítio endógeno de NruI. De fato, o sequenciamento revelou que o sgRNA1 foi capaz de gerar pequenas mutações no sítio de ligação do sgRNA1 e interrompeu o sítio endógeno de NruI (Figura 22 B). Uma mutação de 114 pb foi encontrada no DNA de células eletroporadas com os sgRNAs 1 e 2 (Figura 22 C), o que demonstrou que é possível induzir deleções de porções maiores quando são utilizados sgRNAs contra dois sítios mais distantes no genoma.



Figura 22: Modificação de células-tronco embrionárias no *locus Habp4* utilizando o sistema CRISPR/Cas9. (A) Esquema representativo da região do primeiro exon de *Habp4*. As pontas das setas pretas indicam os sítios de ligação dos pequenos RNAs guias para *Habp4* (sgRNAs 1, 2, 3 e 4). As setas indicam os primers Habp4 out-Fwd e Habp4 out-Rev utilizados para amplificar o fragmento de DNA de

1200 pb. Note que os primers são posicionados de forma assimétrica em relação ao sítio de clivagem do sgRNA1. (B) Mutações geradas no primeiro exon de *Habp4*. Células-tronco embrionárias foram eletroporadas com os plasmídeos px330-Habp4-sgRNA1, px330-Habp4-sgRNA2 e o plasmídeo PGK-puromicina-bpA. DNA genômico foi extraído da população de células e submetido ao PCR com os primers Habp4 out-Fwd e Habp4 out-Rev. DNA genômico de células não eletroporadas foi amplificado como controle. Os fragmentos foram digeridos com a enzima de restrição NruI e submetidos a eletroforese em gel de agarose. As bandas de 1200 pb, não digeridas, foram recortadas do gel, clonadas no vetor pBluescript KS+ previamente digerido com EcoRV e o DNA foi sequenciado. (C) Mutação de 114 pb localizada entre os sítios de ligação do sgRNA1 e sgRNA2 originado da eletroporação com os guias. As sequências PAM estão indicadas em vermelho.

4.3.2.2. Geração de camundongos nocautes Habp4^{-/-} pelo sistema CRISPR/Cas9

A tecnologia CRISPR/Cas9 para gerar animais modificados foi implantada no Laboratório de Modificação do Genoma (LMG, LNBio) utilizando a estratégia de inativação do gene da tirosinase, uma enzima que controla a produção de melanina. Assim, dois plasmídeos CRISPR *Tyrosinase* (Yen et al., 2014), concedidos pelo Dr. Behringer, foi microinjetado pela equipe do LMG em pró-núcleo de zigotos de camundongo B6FVB. Mutação no gene da tirosinase pode levar a um fenótipo albino, caracterizado pela ausência de pigmentação. Sendo uma mutação efetiva e de fácil identificação, mostrou-se uma ferramenta perfeita para implantação da técnica em nosso laboratório. O experimento piloto funcionou com êxito e, em pouco tempo, geramos um camundongo mosaico (Figura 23).



Figura 23: Camundongo mosaico resultante de microinjeção pró-nuclear de dois plasmídeos circulares px330-Tyr-sgRNA que expressam os pequenos RNAs guias (sgRNAs) para o gene *Tyrosinase*. Os zigotos B6FVBF1 injetados eram heterozigotos para mutação nesse gene.

Portanto, visto que a técnica CRISPR/Cas9 para gerar camundongos nocautes foi estabelecida com sucesso no LMG/LNBio, e verificamos que o sgRNA1 possui uma eficiente atividade de clivagem no

primeiro exon de *Habp4*, seguimos em direção da geração de camundongos nocautes para Ki-1/57 utilizando o sistema CRISPR/Cas9. A equipe do LMG realizou a microinjeção do plasmídeo circular px330-Habp4-sgRNA1 em pró-núcleo de embrião C57BL/6 e transferência dos zigotos injetados para o útero de uma mãe receptora. Após o desmame, os animais candidatos a fundadores foram genotipados pelo método que utiliza a T7 endonuclease I (T7EI), uma enzima com a propriedade de reconhecer e clivar dupla-fita de DNA mal-pareada (Déclais et al., 2003; Hadden et al., 2001; Wefers et al., 2013).

Pelo ensaio com a T7EI, é possível não somente identificar se o animal possui uma mutação no gene de interesse, como também discernir o genótipo do animal entre presença do alelo em homozigose dominante (selvagem), em heterozigose ou em homozigose recessiva (nocaute) (Figura 24). Para isso, o gDNA dos animais candidatos a mutantes foi utilizado na PCR para amplificar a região alvo de 1200 pb no gene *Habp4* (Figura 24 A). Este fragmento de DNA do animal candidato a mutante foi misturado com o fragmento de DNA do animal C57BL/6 selvagem ou foi incubado sozinho (sem DNA selvagem) (Figura 24 B). Essas combinações de fragmentos de DNA do animal candidato com fragmentos de animal selvagem são necessárias para induzir a formação de heteroduplexes de DNA, caso o candidato não seja heterozigoto. Os fragmentos de DNA misturados ou não foram incubados à 95°C para desnaturação da dupla-fita de DNA, seguido de resfriamento gradativo que leva ao reanelamento das fitas. Caso o animal candidato apresente alguma mutação (deleção, inserção ou substituição de base) no *locus* alvo, heteroduplexes de DNA são formadas durante este processo de desnaturação/reanelamento e são clivadas pela T7EI, indicando a presença de mutação no *locus* alvo daquele animal.

Outra forma de avaliar o genótipo dos animais é através de clivagem do sítio endógeno de enzima de restrição NruI presente na sequência alvo do sgRNA1 (Figura 24 A). A digestão total (liberação de bandas de 500 pb e 700 pb) do fragmento do animal candidato significa que ele apresenta alelos selvagens; já se o DNA digerido for separado em três bandas (1200 pb, 700 pb e 500 pb), nesse caso, o animal é heterozigoto; por fim, se não houver clivagem do fragmento de 1200 pb, então este animal apresenta uma mutação nos dois alelos, podendo representar um nocaute do gene avaliado (Figura 24 C).



Figura 24: Estratégias de genotipagem dos animais mutantes no locus Habp4. (A) Esquema representativo da região do exon 1 do gene *Habp4* que contém a sequência alvo 1, reconhecida pelo sgRNA1. Os primers Habp4 Out-Fwd e Habp4 Out-Rev foram utilizados para amplificar o fragmento de 1200 pb que contém o sítio alvo do sgRNA1. Note a presença, dentro da sequência alvo 1 e a montante da sequência PAM, de um sítio endógeno de enzima de restrição NruI. (B) Esquema representativo para a identificação dos genótipos homozigoto dominante (selvagem - wt), heterozigoto ou homozigoto recessivo (nocaute) baseado no padrão de clivagem de heteroduplexes de DNA pela enzima T7 Endonuclease I (T7EI). O fragmento não digerido contém 1200 pb. A enzima T7EI cliva as heteroduplexes de DNA e gera fragmentos de aproximadamente 500 pb e 700 pb. De acordo com o padrão de clivagem gerado a partir da combinação de fragmento de DNA do candidato a mutante e do animal selvagem, ou presença de somente DNA do possível mutante, pode-se distinguir qual é o alelo do animal estudado. (C) Esquema representativo para a identificação dos genótipos homozigoto dominante (selvagem - wt), heterozigoto ou homozigoto recessivo (nocaute) baseado no padrão de clivagem de DNA pela enzima de restrição NruI. No caso de fragmentos de DNA sem mutação (selvagem), há clivagem total dos fragmentos de 1200 pb em 500 pb e 700 pb. Se houver clivagem parcial do fragmento, há indicativo de genótipo heterozigoto. Por fim, a ausência total de clivagem indica que os dois alelos do animal são mutantes.

A Figura 25 representa uma genotipagem com a T7EI de animais candidatos a fundadores gerados da microinjeção de plasmideo px330-Habp4-sgRNA1 em pro-núcelo de embrião de camundongo. Observe que, quando se misturou os fragmentos do *locus* alvo de *Habp4* amplificados de gDNA da fêmea 1 e de um animal selvagem, seguido de incubação com T7EI, houve clivagem do fragmento de

200 pb com liberação de bandas de 500 pb e 700 pb, indicando que esta fêmea é mutante para o *locus* alvo. Como observado no painel B desta figura, também houve clivagem na amostra contendo somente DNA do fundador, o que indicou que a fêmea 1 poderia ser um heterozigoto ou representar um mosaico (contém a mutação ou diferentes mutações somente em partes do corpo). A genotipagem de outros candidatos a fundadores revelou mais quatro fundadores mutantes no *locus Habp4*. A Tabela 7 resume a eficiência de geração de mutantes obtida a partir de quatro injeções pro-nucleares realizadas com o plasmídeo circular px330-Habp4-sgRNA1. Do total de 19 camundongos C57BL/6 gerados, 5 foram positivos no ensaio com T7EI, o que corresponde a uma eficiência de 26% de animais mutantes. Para identificar o tipo de mutação desses animais, o fragmento de 1200 pb que contém a região da mutação no gene foi clonado no vetor pGEM-T Easy para sequenciamento de DNA. O sequenciamento de clones de bactérias de cada animal fundador revelou genótipos diferentes para 4 de 5 animais fundadores, o que confirma não só a geração de animais mutantes, como também que eles representam animais mosaicos (Figura 26).



Figura 25: Genotipagem de camundongos candidatos a fundadores modificados no *locus Habp4*, gerados pelo sistema CRISPR/Cas9. O plasmídeo circular px330-Habp4-sgRNA1, que expressa a endonuclease hSpCas9 e o RNA guia 1 (sgRNA 1) específico para o primeiro exon de *Habp4*, foi injetado em prónúcleo de embrião de camundongo C57BL/6. (A) Painel representativo de genotipagem de animais candidatos a fundadores nascidos em 05.06.2014 e em 11.06.2014 baseado no ensaio de clivgagem por

T7 Endonuclease I (T7EI). Fragmentos de DNA de 1200 pb da região do exon um de *Habp4* foram amplificados a partir de DNA genômico desses animais e submetidos ao teste com T7EI. O ensaio foi realizado com uma mistura 1:1 de fragmento de DNA dos possíveis fundadores e fragmento de DNA de C57BL/6 selvagem (100 ng de cada DNA). O controle é uma mistura 1:1 de fragmento de DNA contendo uma deleção de 16 bases e fragmento de DNA selvagem. Após as etapas de desnaturação e reanelamento para a formação de heteroduplexes de DNA, os mesmos foram incubados na presença (+) ou ausência (-) de 0,25 u de enzima T7EI à 37°C por 30 minutos. Toda a reação foi resolvida em eletroforese de gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. O fragmento não digerido contém 1200 pb. Após a clivagem da T7EI são liberadas bandas de 500 pb e 700 pb. Observe que a fêmea 1 (data de nascimento 05.06.2014) apresentou clivagem, indicando a presença de alelo mutante no *locus Habp4*. (B) Ensaio de clivagem por T7EI com DNA da fêmea 1 (data de nascimento 05.06.2014). O ensaio foi realizado com uma mistura 1:1 de fragmento de DNA da fêmea 1 fundadora e DNA selvagem (100 ng de cada DNA), ou somente 200 ng de fragmento de DNA do candidato a fundador.

Tabela 7: Animais candidatos a fundadores gerados da microinjeção de plasmideo px330-Habp4sgRNA1 em pro-núcleo de embrião C57BL/6. As colunas indicam: data de nascimento de cada ninhada, número total de animais por prole, número de machos e de fêmeas, número de mutantes identificados, número de mutantes machos e fêmeas. A genotipagem foi baseada no ensaio com T7 endonuclease I e posterior sequenciamento de DNA.

Data de nascimento	Total	Machos	Fêmeas	Mutantes	Mutantes Machos/Fêmeas
30.04.2014	3	2	1	0	0
05.06.2014	4	2	2	1	0/1
11.06.2014	4	3	1	0	0
25.06.2014	8	3	5	4	1/3
Total	19	10	9	5	

Animais Fundadores

Fêmea 1 (Data de nascimento: 05.06.2014)

sgRNA1 PAM 5'-GCACCGGCGCCAGCAGCAGCAGCAGCGCGCGAGCAGCGGCG
sgRNA1 PAM 5'-ATCCTGCGGGGAGGCCGGGGGCGGGGGCGGGGGGCGGGGGGCGGGGGG
Fêmea 3 (Data de nascimento: 25.06.2014)
sgRNA1 PAM
5'-ATCCTGCGGGAGGCCGAGCACCGGCGCCAGCAGCAGCAGCAGCGCGAGCGCGAGCGCGGCG
Fêmea 4 (Data de nascimento: 25.06.2014)
sgRNA1 PAM
5'-ATCCTGCGGGGAGGCCGAGCACCGGCGCCAGCAGCAGCAGCAGCA
Macho 3 (Data de nascimento: 25.06.2014)
sgRNA1 PAM
5'-ATCCTGCGGGAGGCCGAGCACCGGCGCAGCAGCAGCAGCAGCAGC

Figura 26: Genótipos obtidos no sequenciamento de camundongos fundadores modificados no *locus Habp4*. Estão mostrados os fundadores e sua respectiva data de nascimento. A primeira linha contém a sequência de referência selvagem (WT). Em azul, é indicada a sequência reconhecida pelo sgRNA 1; em vermelho, a sequência PAM. As inserções ou substituição de base estão identificadas em verde e as deleções estão representadas com os pontos. A mutação resultante na sequência de nucleotídeos é mostrada entre parênteses à direita. A incidência de cada genótipo nos clones de bactérias sequenciados está listada mais à direita.

Com o intuito de segregar os alelos mutantes dos fundadores mosaicos em linhagens heterozigotas, estes foram acasalados com camundongos C57BL/6 selvagens. As ninhadas resultantes, a geração F1, foram genotipadas pelo ensaio com T7EI e, os camundongos positivos foram sequenciados para caracterizar a mutação de cada um. Foram obtidas 12 ninhadas, totalizando 80 animais F1, dos quais 46 foram positivos no ensaio com a T7EI. Como esperado, os genótipos identificados nos animais F1 positivos foram correspondentes aos genótipos dos respectivos animais fundadores e totalizaram 9 genótipos diferentes. O alelo selvagem também foi observado já que foram sequenciados somente os

positivos, que eram correspondentes aos heterozigotos. Estes animais heterozigotos desenvolveram-se normalmente, sem alguma anomalia aparente.

De acordo com o número de animais disponíveis e a natureza da mutação, os heterozigotos F1 foram identificados em linhagens contendo a mesma mutação (Tabela 8). A análise das mutações das linhagens *Habp4*^{+/-} 2.1; 3.1; 4.1; e 5.1/5.2 revelou que elas resultam na perda do códon de leitura do ribossomo e, portanto, geram proteínas truncadas com identidade até os resíduos 49 a 58 dependendo da posição da mutação (12% a 14% da proteína inteira de 412 aminoácidos). A mutação da linhagem *Habp4*^{+/-} 4.2 resulta na geração de um códon de parada prematuro logo após a deleção, formando assim, uma proteína truncada de 59 aminoácidos. Já a mutação da linhagem *Habp4*^{+/-} 2.2 leva a deleção de apenas 23 aminoácidos da proteína, resultando na síntese de uma proteína com 389 resíduos.

Tabela 8: Linhagens de heterozigotos ($Habp4^{+/-}$) e seus genótipos. Os animais fundadores foram acasalados com C57BL/6 selvagem para gerar linhagens de heterozigotos. As deleções estão indicadas com "-"; e as substituições de base com "m".

Fundadores	Linhagens de Heterozigotos	Genótipo
Macho 3	2.1 2.2	(-2, m1) (-69)
Fêmea 1	3.1	(-46)
Fêmea 3	4.1 4.2	(-17,m3) (-2, m1)
Fêmea 4	5.1 5.2	(-19) (-19)

Em busca do animal nocaute homozigoto foram feitos acasalamentos (intercruzamentos) entre dois animais F1 com a mesma mutação em heterozigose para o gene *Habp4*. Após o desmame, os animais obtidos (geração F2) foram genotipados pelos ensaios com T7EI ou com NruI (Figura 27). Note que, quando o ensaio foi realizado com T7EI, o genótipo homozigoto dominante (ou igual ao selvagem) é identificado pela ausência de clivagem do fragmento de 1200 pb nas condições de mistura de fragmentos de DNA (do animal F2 com C57BL/6 selvagem) ou somente fragmento de DNA do animal F2; já o genótipo heterozigoto apresenta clivagem nessas duas condições anteriores e o nocaute (ou homozigoto recessivo) apresenta clivagem na condição de mistura de fragmentos de DNA. Já no ensaio de genotipagem baseado no padrão de clivagem com a enzima de restrição NruI, os animais homozigotos dominantes (ou igual ao selvagem) apresentam clivagem total do fragmento de DNA de 1200 pb em 500

e 700 pb; os heterozigotos apresentam clivagem parcial; e os nocautes (homozigoto recessivo) não apresentam clivagem nenhuma, devido à perda do sítio endógeno de enzima de restrição. No total foram avaliados 120 animais F2, dos quais 34 apresentaram genótipo selvagem, 56 apresentaram genótipo heterozigoto e 30 apresentaram genótipo homozigoto recessivo, indicando que houve distribuição próxima da mendeliana nesse conjunto de animais avaliados (Tabela 9). Os animais homozigotos adultos não apresentam qualquer anomalia aparente, sendo necessária a realização de uma avaliação mais cuidadosa e criteriosa dos mesmos.



Figura 27: Genotipagem de camundongos adultos gerados no intercruzamento entre dois heterozigotos *Habp4*^{+/-}. Os genótipos: selvagem (wt ou homozigoto dominante), heterozigoto (het) e nocaute (ko ou homozigoto recessivo) são identificados nos géis dos ensaios com T7 Endonuclease I ou NruI. (A) Painel representativo de genotipagem com T7 Endonuclease I (T7EI) de animais F2, originados do cruzamento entre heterozigotos da linhagem *Habp4*^{+/-} 4.1 (deleção de 17 bases e mudança de 3 bases). O ensaio foi realizado com uma mistura 1:1 de fragmento de DNA do animal F2 e fragmento de DNA de C57BL/6 selvagem (100 ng de cada DNA), ou somente 200 ng de fragmento de DNA do animal F2. O controle (C+) é uma mistura 1:1 de fragmento de DNA contendo uma deleção de 16 bases e fragmento de DNA selvagem. Após as etapas de desnaturação e reanelamento para a formação de heteroduplexes de DNA, os mesmos foram incubados com 0,25 u de enzima T7EI à 37°C por 30 minutos. Toda a reação foi resolvida em eletroforese de gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Ninhada da linhagem *Habp4* 4.1, data de nascimento 21.12.2014. (B) Painel representativo de genotipagem com NruI de

animais F2, oriundos do intercruzamento entre heterozigotos da linhagem $Habp4^{+/-}$ 3.1 (deleção de 46 bases). A quantidade de 200 ng de fragmento de DNA de cada animal foi incubada com a enzima NruI por 1 hora, seguida de separação de bandas em eletroforese de gel de agarose 1%. M indica animais machos e F animais fêmeas. O controle (C+) é uma mistura 1:1 de fragmento de DNA contendo uma deleção de 16 bases e fragmento de DNA selvagem. Ninhada da linhagem *Habp4* 3.1 com data de nascimento 27.01.2015.

Tabela 9: Números de animais (geração F2) com genótipo homozigoto dominante (+/+), heterozigoto (+/-) e homozigoto recessivo (-/-), obtidos do intercruzamento entre animais $Habp4^{+/-}$ com a mesma mutação. As deleções estão indicadas com "-"; e as substituições de base com "m".

Mutação	Total	[+/+]	[+/-]	[-/-]
(-46)	17	8	6	3
(-17,m3)	32	9	18	5
(-2 <i>,</i> m1)	22	6	8	8
(-19)	49	11	24	14
Total	120	34	56	30
	Porcentagem (%)	28	47	25
	Mutação (-46) (-17,m3) (-2, m1) (-19) Total	Mutação Total (-46) 17 (-17,m3) 32 (-2, m1) 22 (-19) 49 Total 120 Porcentagem (%)	Mutação Total [+/+] (-46) 17 8 (-17,m3) 32 9 (-2, m1) 22 6 (-19) 49 11 Total 120 34 Porcentagem (%) 28	Mutação Total [+/+] [+/-] (-46) 17 8 6 (-17,m3) 32 9 18 (-2, m1) 22 6 8 (-19) 49 11 24 Total 120 34 56 Porcentagem (%) 28 47

4.3.2.3. Avaliação da expressão de Ki-1/57 em tecidos da linhagem heterozigota Habp4^{+/-}

O PCR em tempo real quantitativo (qRT-PCR) é uma das possíveis abordagens para avaliar a expressão gênica. Entretanto, é importante ressaltar que, se a mutação induzida pelo sistema CRISPR/Cas9 consiste de pequenos erros no início do gene levando a alteração do códon de leitura do ribossomo ou geração de um códon de parada prematuro, a identidade dos exons que não foram mutados ainda é preservada no transcrito gerado. A inativação do gene nesse caso pode ocorrer pela produção de uma proteína truncada. Por outro lado, esse transcrito mutado (com códon de parada prematuro, por exemplo) pode ser destinado à via de degradação por decaimento de mRNA, chamada *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD) e conhecida por degradar transcritos com códon de parada prematuro ou outros erros, eliminando a expressão da proteína.

Para checar os níveis de mRNA do gene *Habp4*, os tecidos de coração, cérebro e globo ocular de duas fêmeas, adultas e heterozigotas *Habp4*^{+/-} e de dois contoles C57Bl/6 (fêmeas, adultas e selvagem) foram coletados para extração de mRNA e análise por qRT-PCR com primers para os exons 3 e 4 do gene *Habp4*. Como observado na Figura 28, as fêmeas heterozigotas possuem reduzidos níveis de mRNA

de *Habp4* em relação às fêmeas selvagens em todos os tecidos avaliados, demonstrando que o transcrito mutante foi destinado a via de degradação por NMD.



Figura 28: Quantificação relativa da expressão do gene *Habp4* de tecidos de coração, cérebro e globo ocular de camundongos C57BL/6 adultos, fêmeas, selvagens (wild-type 1 e 2) e heterozigotos *Habp4*^{+/-} (heterozygous 1 e 3). (A) A mutação no primeiro exon do gene *Habp4* da fêmea 1 consiste de uma deleção de 21 bases e mudança de 7 bases. (B) Na fêmea 3, a mutação consiste de uma deleção de 17 bases e mudança de 3 bases no primeiro exon de *Habp4*. Ambas as mutações levam à mudança no códon de leitura. Os primers utilizados para o gene *Habp4* anela nos exons 3 e 4. Os níveis de mRNA foram normalizados com o gene endógeno *Gapdh*.

5. RESULTADOS COMPLEMENTARES

5.1. Variantes de transcrito no gene Habp4

Durante a análise de expressão do gene Habp4 por qRT-PCR utilizando tecidos de animais heterozigotos ($Habp4^{+/-}$) e selvagens, pares de primers que anelam em regiões distintas do transcrito foram testados. Observou-se que um par de primer que anelava mais no final do transcrito (junção entre os exons 4 e 5 e no exon 6) apresentava maior amplificação do outro aquele que anelava nos primeiros exons do gene (exon 2 e junção entre os exons 2 e 3), o que levantou a hipótese da existência de uma variante de transcrito com início possivelmente em algum exon central do gene. Como mencionado anteriorente neste trabalho, o transcrito canônico de Habp4 possui 1236 nucleotídeos, compreende todos os exons do gene (8 no total) e codifica uma proteína de 412 aminoácidos (Figura 29 A).

Em busca de outros códons de início da tradução ATG localizados no mesmo códon de leitura do primeiro ATG no exon 1 do gene *Habp4*, foi encontrado um ATG no quarto exon do gene que pode gerar um transcrito de 555 nucleotídeos, nunca identificado anteriormente (Figura 29).



Figura 29: O gene *Habp4* e seus possíveis variantes de transcrito. (A) Esquema representativo do gene *Habp4* contendo 8 exons (quadrados vermelhos). (B) Representação do transcrito longo de *Habp4* de 1236 nucleotídeos que codifica uma proteína de 46 kDa e do transcrito putativo curto de 555 nucleotídeos que codifica uma proteína de 21 kDa. Os primers utilizados para quantificar o número de cópias dos transcritos são: Par A (exons 2-2/3), exclusivos para o transcrito 1 (longo) e, Par B (exons 4/5-6) que amplifica o transcrito 1 (longo) e o suposto transcrito 2 (curto). aa: aminoácidos.

Para poder demonstrar melhor a quantificação dos transcritos de *Habp4*, uma curva padrão foi construída com um plasmídeo linearizado, que contém a sequência do cDNA murino de *Habp4* (1236 pb, compreendendo os exons de 1 a 8) (Figura 30). Foram utilizados primers para os exons 2-2/3 (par A) e para os exons 4/5-6 (par B). Construiu-se um gráfico em que o eixo x é o valor logarítmico do número

de cópias inicial de cDNA (300 mil, 30 mil, 3 mil, 300 e 30 cópias) e o eixo y representa os valores de *threshold cycle* (ct), isto é, o ciclo em que o sinal fluorescente acumulado excede o sinal basal de fluorescência. A partir dessa curva, foi possível obter os dados de inclinação da reta e calcular os valores de eficiência de amplificação de cada par de primer, que foram 1,90 e 1,80 para o par de primer dos exons 2-2/3 e para o par dos exons 4/5-6, respectivamente.



Figura 30: Curva padrão do cDNA de *Habp4*. A curva foi realizada com um plasmídeo pGEM-T Easy *Habp4* linearizado no sítio de BamHI e que contém a sequência do cDNA de *Habp4* de 1236 pb (exons 1 a 8). O eixo x é o Log do número de cópias inicial de cDNA (300 mil, 30 mil, 3 mil, 300 e 30 cópias) e o eixo y representa os valores de *threshold cycle* (ct). O PCR quantitativo (qPCR) foi realizado com primers para os exons 2-2/3 (par A) e para os exons 4/5-6 (par B). A eficiência de amplificação com o par para os exons 2-2/3 foi de 1,90 e para os exons 4/5-6 foi de 1,80.

Tecidos de coração, cérebro e globo ocular de camundongos selvagens e heterozigotos foram coletados, o RNA extraído e utilizado na síntese de cDNA. Realizou-se a quantificação da expressão do gene *Habp4* com os primers para os exons 2-2/3 (par A) e para os exons 4/5-6 (par B) e, a partir dos valores de ct obtidos em cada reação e dos dados da curva padrão, foi possível determinar o número de cópias dos transcritos de *Habp4* (Figura 31 A, B e C). Em todos os animais e tecidos analisados, tanto naqueles selvagens como nos heterozigotos, o par de primer que anela nos exons 4/5-6 (par B) amplificou um maior número de cópias que o par de primer para os exons 2-2/3 (par A) (Figura 31 D), o que sugere a existência de uma variante de transcrito menor. Quando esta mesma análise foi realizada com cDNAs de células-tronco embrionárias selvagens (wt) e heterozigotas (Het), também foi observado maior número de cópias com o primer para os exons 4/5-6 (par B) do que com o primer para os exons 2-2/3 (par A) (Figura 32). Outros ensaios poderão acrescentar novas evidência para confirmar esta descoberta,

como a técnica RACE (*rapid amplification of cDNA ends*), *northern blotting* e identificação por espectrometria de massas das bandas imunoprecipitadas de Ki-1/57. De qualquer modo, o blast da sequência de aminoácidos da proteína menor (185 aa) encontrou o número de acesso no GenBank BAE27234.1, cuja definição é "produto protéico sem nome".



Figura 31: Número de cópias de *Habp4* em tecidos de coração (A), cérebro (B) e globo ocular (C) de camundongos adultos: selvagem (wt 1) e heterozigoto (Het 1). Foram utilizados primers para os exons 2-2/3 (par A) e para os exons 4/5-6 (par B). Os cDNAs foram sintetizados com MMLV na presença de Oligo(dT)₂₀. Para comparação do wt e het de cada tecido, realizou-se a normalização do número de cópias do cDNA em maior quantidade pela diferença da quantidade do gene endógeno *Gapdh*. (D) Razão do número de cópias de *Habp4* da amplificação com o par B (exons 4/5-6) pelo número de cópias da amplificação com o par A (exons 2-2/3).



Figura 32: Número de cópias de *Habp4* em células-tronco embrionárias (ES cell) selvagens (wt) e heterozigota (Het). Foram utilizados primers para os exons 2-2/3 (par A) e para os exons 4/5-6 (par B). (A) Número de cópias de ES cell wt e het. (B) Número de cópias de ES cell wt 2 e het 2. Os cDNAs foram sintetizados com MMLV na presença de Oligo(dT)₂₀. Para comparação do wt e het de cada grupo, realizou-se a normalização do número de cópias do cDNA em maior quantidade pela diferença da quantidade do gene endógeno *Gapdh*. (C) Razão do número de cópias de *Habp4* da amplificação com o par B (exons 4/5-6) pelo número de cópias da amplificação com o par A (exons 2-2/3).

Western blot com tecidos diferentes (coração, cérebro, figado, baço, rim, músculo esquelético, globo ocular) de camundongo selvagem e de linhagens de CTE E14TG2A e glioblastoma U87MG foi realizado para verificar a expressão de Ki-1/57 nesses tecidos (Figura 33). Dois anticorpos para o N-terminal da proteína foram usados: o anti-Ki-1/57, caseiro, que reconhece 18 aminoácidos na região correspondente ao exon 2 e o anti-Habp4 (P-13) da Santa Cruz Biotechnology (SCBT), o qual se liga em um fragmento dentro de uma região entre os resíduos 150 e 200 da proteína de 412 aminoácidos. Esta região dos resíduos 150 a 200 corresponde a uma parte do exon 2 e do exon 3 do gene de Ki-1/57 (Figura 33 A). Poranto, esses anticorpos devem reconhecer a proteína Ki-1/57 inteira e talvez uma possível variante de *splicing* alternativo que já foi descrita em humano. É possível notar na Figura 33 B que uma banda de 43 kDa, correspondente ao tamanho da proteína inteira, foi identificada nos tecidos de coração,

figado, baço, rim, músculo esquelético e, em menor quantidade, no cérebro quando avaliados com o anti-Habp4 da Santa Cruz Biotechnology. Esse anticorpo também identificou uma banda em um tamanho aproximado de 30 kDa nos tecidos de coração, cérebro, figado, rim e globo ocular; e bandas abaixo de 17 kDa em coração, cérebro, figado, baço e rim. O outro anticorpo para Ki-1/57, anti-Ki-1/57 (caseiro) reconheceu duas bandas em alturas próximas de 43 kDa em U87MG e uma banda em 55 kDa na amostra de coração. A banda de 30 kDa também foi identificada em coração, cérebro, figado e rim com o anticorpo caseiro. No músculo esquelético e globo ocular foi detectado uma banda de tamanho aproximado 25 kDa. E bandas de tamanhos menores (17 – 20 kDa) foram vistas em coração, cérebro, figado, baço e rim. Um terceiro anticorpo, anti-HABP4 da Sigma, embora não mostrado aqui, foi testado com tecidos de coração, cérebro e globo ocular de camundongo e identificou uma única banda na altura de 34 kDa somente no globo ocular. Essas análises sugerem a existência de uma ou mais variantes de *splicing* alternativo nesses tecidos avaliados, sendo que podem apresentar expressão tecido-específica. Uma abordagem de imunoprecipitação de Ki-1/57 de tecidos diferentes, seguido de separação por eletroforese, purificação das bandas imunoprecipitadas e espectrometria de massas deve acrescentar mais informações a respeito da identidade de cada banda reconhecida.



Figura 33: Western blot de diversos tecidos de camundongos selvagens e os anticorpos para Ki-1/57. (A) Representação esquemática da proteína Ki-1/57 (ou Habp4) canônica de 412 aminoácidos (aa), uma possível variante de transcrito de 185 aa e uma possível variante de *splicing* alternativo de 308 aa, que já foi descrita em humano. As regiões de ligação dos diferentes anticorpos na proteína Habp4 e seus possíveis variantes estão sendo demonstradas na figura. Ao lado, identificação dos anticorpos (fabricante, animal de origem, clonalidade e epítopo de ligação). (B) Western blot de diversos tecidos de camundongo selvagem e linhagens (E14TG2A e U87MG) realizados com anticorpos anti-Habp4 (P-13-SCBT: Santa Cruz Biotechnology) e anti-Ki-1/57 (caseiro). Os tecidos são de um camundongo macho C57BL/6 selvagem e cerca de 75 µg de extrato foi aplicada para a maioria das amostras.

5.2. A relação de Ki-1/57 e o fator de transcrição MEF2C

Os fatores MEF2 são importantes reguladores da expressão gênica em diversos tecidos, incluindo no coração, onde exercem papéis importantes no desenvolvimento e na adaptação pós-natal a um arranjo amplo de sinais fisiológicos e patológicos (Black & Cripps, 2010; Lin et al., 1997). As primeiras evidências de envolvimento de Ki-1/57 com o fator de transcrição MEF2C surgiram com a descoberta por duplo-híbrido em leveduras de que a região N-terminal de Ki-1/57 interage com o N-terminal de

MEF2C. Além disso, em ensaios de mudança de mobilidade eletroforética (EMSA) foi observado que Ki-1/57 diminui a capacidade de MEF2C de ligação ao DNA (Kobarg et al., 2005). Esses dados sugerem que Ki-1/57 é capaz de competir com o DNA pela interação com MEF2C, uma vez que Ki-1/57 interagiu com o N-terminal de MEF2C, que possui os domínios de interação com DNA.

A fim de explorar o papel funcional de Ki-1/57 na atividade transcricional de MEF2C, foram realizados ensaios de transativação do gene repórter da luciferase utilizando o vetor 3xMEF2-Luc, gentilmente concedido pelo Dr. Eric Olson. Este vetor 3xMEF2-Luc contém 3 repetições de elementos responsivos a MEF2 que dirigem a expressão de *firefly luciferase* (Figura 34). Para isso, células HEK293T foram co-transfectadas com o plasmídeo para induzir a expressão da proteína MEF2C, plasmídeo 3xMEF2-Luc, plasmídeo *renilla luciferase*, na presença ou ausência do vetor que expressa a proteína Ki-1/57 humana inteira (413 aminoácidos) ou o parálogo CGI-55. Através desse ensaio, a atividade transcricional de MEF2C é avaliada indiretamente pela razão entre a atividade de *firefly luciferase* pela atividade do normalizador *renilla luciferase*. Como esperado, MEF2C ativou o gene repórter da luciferase cerca de 25 vezes e, na presença do vetor pcDNA flag vazio, ativou cerca de 21 vezes. No entanto, a presença de Ki-1/57, mas não de CGI-55, inibiu a atividade transcricional de MEF2C, além do que já havia sido descrito que ela diminui a capacidade de MEF2C de ligar ao DNA.



Figura 34: Ensaio de transativação do gene repórter da luciferase dirigida por elementos responsivos a MEF2. Células HEK293T foram transfectadas com o vetor que contém 4 sítios de ligação para MEF2 fusionado a *firefly luciferase* ou 3xMEF-Luc, o vetor com *renilla luciferase*, pcDNA3-MEF2C, pcDNA flag vazio (empty), pcDNA flag-Ki-1/57 e pcDNA flag-CGI-55, como indicado na figura. CT = vetor 3xMEF2-LUC e o vetor com *renilla luciferase*. Os valores representam a média ± SDM. * p<0.05 em

relação a CT + MEF2C + Empty. Os dados foram analisados pelo One-way ANOVA, seguido pelo post-hocTukey test.

De posse dos animais com o alelo nocaute em heterozigose para o gene que codifica Ki-1/57, *Habp4*, avaliou-se o efeito da redução da expressão de Ki-1/57 através da quantificação relativa da expressão de MEF2C e de alguns genes estruturais alvos de MEF2C. O coração de camundongos adultos selvagens e heterozigotos *Habp4*^{+/-} foi coletado, o RNA extraído e utilizado para síntese de cDNA. A expressão de MEF2C (região que compreende todas as variantes de *splicing*) e de alguns de seus genes estruturais alvos foi avaliado por qRT-PCR (Figura 35). Os resultados ainda são iniciais, mas mostramse promissores, pois observou-se que a redução na expressão de Ki-1/57 diminuiu a expressão tanto de *Mef2c* como de seus genes alvos: miosina 6 de cadeia pesada (*Myh6* ou miosina de cadeia pesada cardíaca), α-actina cardíaca (*Actc1*) e α-actinina (*Actn2*). Todos esses alvos são genes estruturais e conhecidos por serem ativados por MEF2C. A expressão do gene de p21, uma proteína alvo de p53 e que participa dos mecanismos que levam a parada do ciclo celular e senescência, mostrou-se aumentada no coração de camundongo heterozigoto comparado ao selvagem, demonstrando uma relação de Ki-1/57 com a expressão de p21 também. Embora preliminar, este resultado também é interessante pelo fato de a expressão do gene de p21 ser induzida por p53 e o fato de que Ki-1/57 pode regular negativamente a atividade transcricional de p53 (Nery et al., 2006).



Figura 35: Expressão relativa em níveis de mRNA de Mef2c e de outros genes em tecido de coração de camundongo adulto selvagem e heterozigotos $Habp4^{+/-}$. Os genes Mef2c, miosina de cadeia pesada cardíaca (Myh6), α -actina cardíaca (Actc1), α -actinina (Actn2), muscle creatina kinase (MCK),

miozenina-1 (MyoZ) e Cdkn1a (p21) foram quantificados por qRT-PCR; os níveis de mRNA foram normalizados pelo gene endógeno *Gapdh*. A mutação no primeiro exon do gene *Habp4* da fêmea heterozigota consiste de uma deleção de 21 bases e mudança de 7 bases.

5.3. Padrões de expressão de Ki-1/57 e CGI-55 durante o desenvolvimento de embriões de camundongo

A análise do padrão de expressão de um determinado gene em células e tecidos pode indicar as funções que ele exerce no organismo. Nesse sentido, é de fundamental importância conhecer onde as proteínas Ki-1/57 e CGI-55 são expressas durante o desenvolvimento embrionário murino.

A hibridação de RNA *in situ* é uma técnica utilizada para identificar o padrão de expressão de genes em células e tecidos específicos durante o desenvolvimento embrionário de um organismo. Ela consiste na utilização de uma sonda de RNA marcada com digoxigenina, por exemplo, o qual hibridiza ao seu mRNA complementar.

Ensaios de hibridação de RNA in situ foram realizados com embriões normais de camundongos utilizando sondas para o gene de Ki-1/57 e permitiu observar que Ki-1/57 é um gene expresso em diferentes estruturas embrionárias. Em 9.5 dpc, este gene é expresso nos seguintes territórios: prosencéfalo, mesencéfalo, rombencéfalo, medula espinhal, olhos, primeiro e segundo arcos faríngeos, somitos e vesícula ótica (Figura 36). Em 10.5 dpc, Ki-1/57 continua sendo expressa no prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo, no primeiro e segundo arcos faríngeos, medula espinhal, somitos e vesícula ótica. Mas deixa de ser expressa nos olhos e começa a ser expressa no broto dos membros (Figura 36B). Já em 11.5 dpc, Ki-1/57 começa a ser expressa no terceiro arco faríngeo e no figado. Nesse estágio, este gene continua sendo expresso no prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo, no primeiro e segundo arcos faríngeos, medula espinhal, somitos, vesícula ótica e broto dos membros (Figura 36C). Em resumo, durante o desenvolvimento embrionário, Ki-1/57 é bastante expresso no Sistema Nervoso Central, sendo encontrado no prosencéfalo, mesencéfalo, rombencéfalo e medula espinhal de embriões em todos os estágios de desenvolvimento analisados. Além desses territórios, Ki-1/57 também é expresso nos somitos, vesícula ótica, primeiro e segundo arcos faríngeos de embriões de 9.5 dpc a 11.5 dpc (Tabela 10). É interessante notar que não foi observada expressão de Ki-1/57 no coração de embriões nos estágios de desenvolvimento analisados (Figura 36 A,B,C e Tabela 10).

Assim como Ki-1/57, CGI-55 também foi bastante expressa em estruturas do Sistema Nervoso Central. Aos 9.5 dpc, CGI-55 é expressa no prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo, medula espinhal, olhos, vesícula ótica e também nos primeiro e segundo arcos faríngeos, somitos, broto dos membros,

átrio, ventrículo (Figura 36 D). Em 10.5 dpc, este gene continua sendo expresso nos mesmo territórios que em 9.5 dpc, exceto nos olhos e vesícula ótica, onde há uma perda de expressão (Figura 36 E). Em 11.5 dpc, CGI-55 é expressa no prosencéfalo e mesencéfalo, primeiro e segundo arcos faríngeos, somitos, broto dos membros, átrio e ventrículo cardíaco. Nesse estágio de desenvolvimento, CGI-55 começa a ser expressa no terceiro e quarto arcos faríngeos e figado e deixa de ser expressa no rombencéfalo e medula espinhal (Figura 36 F e Tabela 10).

Embora o padrão de expressão de Ki-1/57 e de CGI-55 tenha sido bem semelhante, pois ambas são expressas em territórios como arcos faríngeos, broto dos membros e somitos, nos estágios de desenvolvimento analisados, CGI-55 é expressa em alguns territórios em que não há expressão de Ki-1/57, como no átrio e ventrículo cardíacos (Figura 36 D,E,F e Tabela 10).


Figura 36: Padrões de expressão de Ki-1/57 e CGI-55 em embriões de camundongo em 9.5 dpc, 10.5 dpc e 11.5 dpc. * broto dos membros, seta: coração, cabeça da seta: arcos faríngeos, estrela: somitos, # fígado.

	Ki-1/57			CGI-55		
	9.5 dpc	10.5 dpc	11.5 dpc	9.5 dpc	10.5 dpc	11.5 dpc
Prosencéfalo	1	1	1	1	1	1
Mesencéfalo	1	1	1	1	1	1
Rombencéfalo	1	1	1	1	1	x
Olhos	1	x	x	1	x	1
1° Arco faríngeo	1	1	1	1	1	1
2° Arco faríngeo	1	1	1	1	1	1
3° Arco faríngeo	-	х	1	-	х	1
4° Arco faríngeo	-	х	х	-	х	1
Medula espinhal	1	1	1	1	1	х
Somitos	1	1	1	1	1	1
Broto dos membros	x	1	1	1	1	
Átrio cardíaco	х	х	x	1	1	1
Ventrículo cardíaco	x	х	Х	*	*	
Vesícula ótica	1	*	1	1	х	x
Fígado	-	-	*	-	-	1

Tabela 10: Relação dos territórios de expressão de Ki-1/57 e CGI-55 em embriões de camundongo em 9.5 dpc, 10.5 dpc e 11.5 dpc.

5.3.1. Análise histológica dos padrões de expressão de Ki-1/57 em embriões aos 10.5 dpc e 11.5 dpc

Para ter uma análise detalhada dos padrões de expressão de Ki-1/57 ao longo do desenvolvimento e verificar os domínios de expressão deste gene dentro das estruturas analisadas, os embriões de camundongo em 10.5 dpc e 11.5 dpc submetidos à hibridação *in situ* com sonda antisense para Ki-1/57 foram cortados transversalmente (Figura 37 e 38).

Após os cortes, é possível verificar que a expressão de Ki-1/57 na medula espinhal ocorre na região dorsal (Figuras 37 A e B, 38 C). Nos arcos faríngeos (Figuras 37 C, 38 D), nos brotos dos membros (Figuras 37 A, 38 E) e nos somitos (Figuras 37 D, 38 F) a expressão ocorre na região mais externa. Os olhos não apresentam expressão de Ki-1/57 (Figura 37 B). As Figuras 37 B e 38 B também mostram há expressão na vesícula telencefálica, que é uma estrutura do prosencéfalo, e na parede do mesencéfalo, respectivamente.



Figura 37: Cortes transversais do embrião em 10.5 dpc submetido a hibridação in situ para Ki-1/57. (A) Corte da medula espinhal (seta), vesícula ótica (cabeça da seta) e broto dos membros anteriores (*). (B) Corte da medula espinhal (seta), olhos (*) e vesícula telencefálica (cabeça da seta). (C) Corte dos três arcos faríngeos (setas), olho (*) e vesícula ótica (ponta da seta). (D) Corte dos somitos (seta).



Figura 38: Cortes transversais do embrião de 11.5 dpc submetido a hibridação in situ para Ki-1/57. Cortes transversais do embrião de 11.5 dpc submetido a hibridação *in situ* para Ki-1/57. (A) Corte da vesícula ótica (cabeça da seta). (B) Parede do mesencéfalo (*). (C) Medula espinhal (seta). (D) Arcos faríngeos (setas). (E) Broto do membro anterior direito (*) (F) Somitos da porção sacral (seta).

6. DISCUSSÃO

6.1. O envolvimento de Ki-1/57 e CGI-55 em processos de regulação da expressão gênica

Desde a descoberta da proteína Ki-1/57 em células do linfoma de Hodgkin, diversos estudos têm sido realizados para caracterização dessa molécula. A identificação do perfil de interação proteínaproteína utilizando como isca o N- e o C-terminal de Ki-1/57 em ensaios de duplo-híbrido de leveduras apontou para a hipótese de que Ki-1/57 estaria inserida no contexto de regulação da expressão gênica em diversos níveis: regulação da transcrição, processamento e estabilidade de RNA e tradução.

Evidências da participação de Ki-1/57 em atividades de regulação da transcrição foram demonstradas pela sua interação com a proteína de remodelamento de cromatina CHD3 (Lemos & Kobarg, 2006) e fatores de transcrição: MEF2C, p53 e outros membros da família p53 (Kobarg et al., 2005; Nery et al., 2006). Além disso, Ki-1/57 mostrou-se influenciar na atividade transcricional de p53 em ensaios de ativação do gene repórter da beta-galacosidase em monohíbrido de leveduras e, reduzir a atividade de ligação de MEF2C ao DNA (Kobarg et al., 2005; Nery et al., 2006).

No contexto de metabolismo de RNA, Ki-1/57 interagiu com proteínas de processamento de premRNA (SFRS9 e hnRNPQ), ligou-se a RNA rico em uracila e foi demonstrada por modular o processamento de pré-mRNA do gene modelo E1A. Além disso, Ki-1/57 mostrou-se localizar, de forma dependente do estado de metilação celular, em corpúsculos subnucleares envolvidos em processamento de RNA e formação de pequenas ribonucleoproteínas, tais como speckles, corpos de Cajal e GEMS (Bressan et al., 2009; Bressan & Kobarg, 2010).

Outra proteína, CGI-55, foi identificada por dividir alta identidade e similaridade de sequência com Ki-1/57 humana, o que sugeriu que elas pudessem ser parálogas e ter funções similares ou redundantes (Lemos et al., 2003). CGI-55 foi inicialmente descrita por ligar ao 3'-UTR do inibidor de ativador de plasminogênio PAI-1 (Heaton et al., 2001) e tem sido descrita como uma reguladora negativa da expressão de PAI-1 em resposta a S1P, porque desestabiliza o mRNA de PAI-1 (Iwaki et al., 2012). Também, a observação de que Ki-1/57 e CGI-55 apresentam interactores em comum, como as proteínas envolvidas com a regulação transcrional CHD3, TOPORS, DAXX, PIAS e PRMT1, sugeriu que as funções de Ki-1/57 e CGI-55 pudessem estar relacionadas (Lemos & Kobarg, 2006; Lemos et al., 2003).

Diante dessas observações que conectam Ki-1/57 e CGI-55 a processos de controle da expressão gênica, nosso grupo realizou uma análise de expressão global avaliada pelo perfil de mRNA através de microarranjo de DNA (Affymetrix) em células transfectadas transientemente com Ki-1/57 ou CGI-55 (Artigo I). Embora não se saiba o mecanismo exato, é importante ressaltar que cerca de 90% dos genes

modulados pela superexpressão de Ki-1/57 e de CGI-55 foi regulado negativamente, o que demonstra possivelmente um papel predominantemente repressor de ambas as proteínas.

Análises dos processos biológicos dos genes alterados com a superexpressão de Ki-1/57 e CGI-55 foram realizadas utilizando a base de dados Gene Ontology (GO). A partir desses processos encontrados, juntamente com os dados obtidos nos experimentos de duplo híbrido para Ki-1/57 e CGI-55, foram construídas redes de conexões, mostrando os principais processos celulares onde Ki-1/57 e CGI-55 atuariam (Figura 4 – Artigo 1). Diversos processos relacionados com regulação gênica (transcrição, *splincing*, tradução) foram encontrados, além de genes relacionados com regulação da apoptose, proliferação e controle do ciclo celular. Além disso, Ki-1/57 e CGI-55 alteraram 20 genes em comum, dos quais a maioria foi reprimida e afetou os mesmos processos celulares (proliferação, apoptose, controle do ciclo celular).

Sendo assim, todos esses dados em conjunto (perfil de interação do duplo-híbrido, envolvimento com metabolismo de RNA, e os dados de expressão gênica global da superexpressão de Ki-1/57 e CGI-55 em células) apontam para o envolvimento dessas proteínas na regulação integrada da expressão gênica, a nível transcricional, de metabolismo de RNA e de início da tradução.

6.2. As proteínas Ki-1/57 e CGI-55 participam de vias de proliferação e regulação da resposta contra o estresse

O fato de a superexpressão de Ki-1/57 e CGI-55 ter reprimido a expressão de genes envolvidos em estados proliferativos e, concomitantemente, genes de controle do ciclo celular e desencadeadores de apoptose, sugeriu que elas pudessem estar envolvidas em resposta a estímulos ambientais danosos, atuando como uma molécula reguladora em eventos de decisão entre sobrevivência e morte celular. Achados anteriores mostraram que Ki-1/57 e CGI-55 transitam entre pequenas estruturas nucleares (speckles, nucléolo, corpos de Cajal) e citoplasmáticas (grânulos de estresse e corpos de processamento) sob diferentes estímulos, como inibição do estado de metilação celular por Adox ou em situações de estresse celular, e o fato de esses compartimentos serem funcionalmente relacionados à manutenção do balanço de proteínas em resposta à injúria, apoiam o envolvimento de Ki-1/57 e CGI orquestrando as vias de resposta celular a estresse.

Sendo assim, para investigar melhor o papel dessas proteínas, foram realizados ensaios de viabilidade, proliferação, ciclo celular e apoptose com as células superexpressando Ki-1/57 e CGI-55. Em condições normais de cultura, a superexpressão de ambas as proteínas resultou em menores taxas de viabilidade e proliferação celular e essa redução foi mais acentuada em condição de privação de soro

fetal bovino. A análise do ciclo celular demonstrou que a menor taxa de proliferação pode ter sido causada possivelmente devido a indução de parada na fase G1 do ciclo celular (Figura 6 – Artigo I). Também, a elevada expressão de Ki-1/57 não resultou em alteração do número de células apoptóticas em condições normais de cultura. Entretanto, a maior expressão de CGI-55 acarretou em aumento de células em apoptose nessas condições. Essa diferença funcional entre Ki-1/57 e CGI-55, bem como as diferenças observadas no perfil de proteínas interactoras e de genes alterados no microarranjo sugerem que essas proteínas adquiriram algumas propriedades funcionais distintas durante a evolução. A CGI-55 reprimiu a expressão de diversos reguladores negativos da apoptose, corroborando com o aumento de apoptose observado com a superexpressão dela. Ki-1/57, por sua vez, aumentou ou reduziu a expressão de genes reguladores positivos e negativos da apoptose, sugerindo um balanço entre a influência positiva e negativa de Ki-1/57 no processo de apoptose.

Quando submetidas a diferentes agentes estressores, observou-se um efeito protetor de Ki-1/57 na prevenção da apoptose principalmente em células tratadas com tapsigargina, um inibidor específico de Ca2+-ATPase (SERCA) de retículo endoplasmático (RE). Sendo o cálcio um dos fatores requeridos para o enovelamento das proteínas no RE, a indução da depleção dos níveis de cálcio por tapsigargina, por exemplo, leva ao acúmulo e agregação de proteínas não enoveladas, uma condição conhecida como estresse de RE, que pode levar à apoptose (Szegezdi et al., 2006). Para combater os efeitos deletérios do estresse de RE, a célula adquiriu várias estratégias protetoras, coletivamente chamadas de resposta a proteína não enovelada (UPR, do inglês unfolded protein response) e que atuam, em um primero momento, em direção da sobrevivência celular por reduzir o acúmulo de proteínas não enoveladas. No entanto, se o estresse persistir, a sinalização protetora de UPR sofre uma mudança para sinalização proapoptótica (Szegezdi et al., 2006). Dentre algumas proteínas de UPR estão: GRP94/endoplasmin, GRP78/BiP, calreticulina e proteína dissulfito isomerase (PDI), localizadas no lúmen do RE, que atuam como chaperonas moleculares e enzimas de enovelamento, capazes de se ligar em alta afinidade a cálcio e, assim, contribuir para a manutenção dos estoques de cálcio no RE (Bando et al., 2004; Ying et al., 2002). Embora o mecanismo exato de atuação de Ki-1/57 na proteção contra apoptose induzida por tapsigargina não ter sido investigado nesse trabalho, é importante destacar que a superexpressão de Ki-1/57 no microarranjo levou ao aumento de expressão de GRP94, uma das chaperonas que se ligam a cálcio e é capaz de inibir a liberação desse íon do RE (Bando et al., 2004). Também, vale lembrar que a região N-terminal de Ki-1/57 indentificou a proteína GADD34 como uma de suas interactoras. GADD34 é uma proteína que participa do mecanismo de desligamento da sinalização protetora de UPR, mudando a direção da sinalização para apoptose (Nery, 2005). Assim, uma especulação para a proteção da apoptose induzida por tapsigargina nas células superexpressando Ki-1/57 seria em direção da atuação de GRP94, juntamente com a atuação de Ki-1/57 com intermediários da via UPR (Liu et al., 2012). Também, diante do grande número de genes regulados por Ki-1/57 e CGI-55, não podemos descartar a possibilidade de outras formas de atuação dessas proteínas frente a outros tipos de estresses não estudados nesse trabalho.

Certamente, o papel de Ki-1/57 e CGI-55 contribuindo para o destino de apoptose ou sobrevivência depende do contexto em que elas estão inseridas. O balanço entre as quantidades de Ki-1/57, CGI-55 e outros fatores vão determinar o destino da célula. Como exemplo, CGI-55 (ou PAIRBP1) foi descrita formar um complexo com o componente de membrana do receptor de progesterona (PGRMC1) em células da camada granulosa do ovário de ratos. Este complexo entre CGI-55 e PGRMC1 é requerido para a ação anti-apoptótica da progesterona, cuja função depende do estado de SUMOilação de PGRMC1 (Peluso et al., 2013).

Também, Ki-1/57 e CGI-55 apresentam diversas modificações pós-traducionais, como metilação em argininas por PRMT1 (Passos et al., 2006), fosforilação em resíduos de serina e treonina por PKC (Nery et al., 2004) e SUMOilação (Artigo II), o que certamente amplia as possibilidades de regulação dessas proteínas em diferentes contextos funcionais e contribui para a hipótese de que elas atuam orquestrando os mecanismos de decisão entre vida e morte da célula. Essas modificações pós-traducionais foram descritas por influenciar não somente a localização subcelular de Ki-1/57 e CGI-55 (ex., estado de metilação de ambas e a fosforliação de Ki-1//57), como também influenciar a sua interação com outras proteínas (ex., interação Ki-1/57 e RACK1). É importante lembrar que, muito possilvelmente, Ki-1/57 e CGI-55 apresentem outras interações e/ou modificações pós-traducionais ainda desconhecidas e importantes para seus papéis regulatórios em diferentes contextos funcionais (Nery et al., 2004; Passos et al., 2006).

Normalmente, Ki-1/57 e CGI-55 estão presentes no núcleo e no citoplasma e, sob condições de estresse, podem ser observadas em grânulos de estresse citoplasmáticos (SGs) e corpúsculos de processamento (PBs, *P-bodies*) (Bressan et al., 2009; Gonçalves et al., 2011; Goodier et al., 2007a; Lee et al., 2014). Esses sítios citoplasmáticos são agregados de complexos de preiniciação da tradução que foram bloqueados durante situações de estresse. Os SGs atuam na triagem do mRNA para que cada transcrito seja destinado para armazenamento, reiniciação da tradução ou degradação. Aqueles destinados ao decaimento são exportados dos SGs para os sítios de decaimento de mRNA, os corpúsculos P (Decker & Parker, 2012; Kedersha et al., 2005). O fato de Ki-1/57 e CGI-55 serem capazes de ligar a RNA, e de Ki-1/57 ter sido encontrada no complexo de alto peso molecular de pré-iniciação da tradução sugere que as duas proteínas atuem direta ou indiretamente na repressão global de genes envolvidos em resposta ao estresse, possivelmente através da participação de grânulos nucleares e citoplasmáticos, atuando nos diferentes níveis da expressão gênica, desde a nível transcricional, através de fatores de

transcrição e remodelamento da cromatina, via estabilidade e *splicing* de mRNA, até a iniciação da tradução.

6.3. Ki-1/57 e CGI-55 são proteínas parálogas

Como vem sendo discutido nesse trabalho, diversas observações de experimentos realizados anteriormente por nosso grupo e por outros sugerem que Ki-1/57 e CGI-55 sejam proteínas parálogas. Elas dividem alto grau de similaridade de sequência de aminoácidos (40,7 % de identidade e 67,4 % de similaridade) (Passos et al., 2006) e apresentam diversos parceiros de interação em comum (CHD3, TOPORS, DAXX, PIAS e PRMT1) (Lemos & Kobarg, 2006; Nery et al., 2006). Também, tanto Ki-1/57 quanto CGI-55 tem sido descritas como proteínas de ligação a RNA (Bressan et al., 2009; Heaton et al., 2001), como capazes de se localizar em grânulos de estresse citoplasmáticos em resposta a um agente estressor (Gonçalves et al., 2011; Goodier et al., 2007a) e em pequenos corpúsculos nucleares como nucléolo e corpos de Cajal (Bressan et al., 2009; Lemos & Kobarg, 2006). Ambas são metiladas em argininas pela arginino metiltransferase I (PRMTI) (Passos et al., 2006) e demonstramos no Artigo II que são modificadas em lisinas por SUMO-1 e SUMO-2. Além disso, vimos no Artigo I que tanto Ki-1/57, quanto CGI-55 apresentam um papel predominantemente repressor da expressão gênica e, embora somente uma parte dos genes alterados por ambas seja comum, processos celulares semelhantes (proliferação, apoptose, controle do ciclo celular) são afetados por ambas (Artigo I).

Outra característica em comum de Ki-1/57 e CGI-55 é a presença de um domínio enriquecido em aminoácidos carregados positivamente, classificado como um domínio HABP4 (*hyaluronan-binding protein 4*) de proteínas da família HABP4. As proteínas desta família foram descritas como capazes de se ligar *in vitro* ao hialuronato ou que estão envolvidas na estabilidade de mRNA. Embora Ki-1/57 tenha sido identificada como capaz de se ligar ao hialuronato *in vitro*, esta atividade parece não ter uma relevância funcional *in vivo*. Possivelmente, seu domínio HABP4 deve atuar como módulo de ligação a DNA e/ou RNA (Artigo I).

Entre as proteínas da família HABP4, a sequência da proteína VIG de *D. melanogaster* apresenta grande similaridade com a sequência de Ki-1/57 e CGI-55 e foi utilizada, juntamente com outras 26 proteínas da mesma família, em um estudo filogenético por inferência Bayesiana. Esses resultados, apresentados através da árvore filogenética no Artigo I, mostrou que Ki-1/57 e CGI-55 são de fato parálogas, como previamente hipotetizado, e possivelmente originaram de um evento de duplicação genômica durante a evolução dos cordados (Figura 3 - Artigo I).

Todos os membros da família HABP4 apresentam motivos ricos em arginina e glicina (RGG/RXR box) flanqueando o domínio HABP4. Estes motivos RGG/RXR box são comumente encontrados em proteínas envolvidas em regulação transcricional e processamento de RNA. O alinhamento de sequência do domínio HABP4 de Ki-1/57 e de CGI-55 mostrou que somente CGI-55 apresenta três inserções ricas em resíduos polares, que diferem da sequência de Ki-1/57 (Figura 3 – Artigo I). Dessa forma, essas descobertas podem explicar a origem em comum e as possíveis propriedades funcionais distintas entre Ki-1/57 e CGI-55 observadas nas análises de expressão gênica, no perfil de interação proteína-proteína e nos dados funcionais que estão descritos no Artigo I.

6.4. Ki-1/57 é modificada por SUMO e influencia na distribuição de PML no núcleo

A primeira indicação de que Ki-1/57 e CGI-55 poderiam ser modificadas por SUMO surgiu com a descoberta de que essas proteínas podem se associar às proteínas da maquinaria de SUMOilação (Lemos & Kobarg, 2006; Nery et al., 2006). A SUMOilação ocorre em etapas, de maneira reversível e regulada. Enzimas específicas estão envolvidas nesse processo, tais como algumas interactoras de Ki-1/57 e CGI-55: O N-terminal de Ki-1/57 (1-150) interagiu com a enzima conjugadora E2 Ubc9 e seu C-terminal (122-413) interagiu com PIAS3 e TOPORS; CGI-55 interagiu com TOPORS, PIAS1, PIAS3, PIASγ e a subunidade da enzima ativadora E1 UBA2.

Através da análise da sequência de aminoácidos de Ki-1/57, foi oberservado que ela possui 7 sítios preditos de SUMOilação, dos quais as lisinas 213, 276 e 336 tiveram uma alta probabilidade de serem modificadas por SUMO (Artigo II). Ensaios de SUMOilação *in vitro* e *in vivo* foram realizados com a proteína Ki-1/57 e confirmaram a sua modificação por SUMO-1 e SUMO-2. Além disso, experimentos *in vivo* com a proteína paráloga, CGI-55, também mostraram que ela é SUMOilada. Através de mutação sítio-dirigida das lisinas preditas de SUMOilação em Ki-1/57, diversos mutantes foram gerados e possibilitou a identificação do mutante triplo (lisinas 213, 276 e 336) como principal alvo de SUMOs em Ki-1/57. Procedeu-se então com a investigação da importância da SUMOilação de Ki-1/57 para as funções exercidas por ela.

Foi observado anteriormente que Ki-1/57 participa da seleção do sítio de *splicing* do gene modelo E1A (Bressan et al., 2009). A análise sobre a relevância da SUMOilação de Ki-1/57 sobre sua função de regulação de *splicing* revelou uma dependência dessa modificação em Ki-1/57 para exercer uma modulação correta e ótima das isoformas de *splicing* do gene E1A. A proteína Ki-1/57 também foi documentada anteriormente por se associar a ribossomos e polissomos e à proteína que participa da tradução FMRP. Diante de situações de estresse celular, Ki-1/57 foi observada em grânulos de estresse

citoplasmáticos (SGs), estruturas de armazenamento de fatores de iniciação da tradução e mRNA não traduzidos (Gonçalves et al., 2011). A investigação da importância da SUMOilação de Ki-1/57 para sua localização em SGs mostrou que, assim como a selvagem, os mutantes de Ki-1/57 foram capazes de localizar em SGs diante de estresse induzido por tapsigargina.

Diversas proteínas que interagem com Ki-1/57 e CGI-55 são proteínas documentadas como serem SUMOiladas e/ou apresentarem o motivo de interação com SUMO (SIM), como DAXX, p53, UBC9, TOPORS e PIAS (Hecker et al., 2006; Lemos & Kobarg, 2006). As regiões SIM possuem uma natureza hidrofóbica e são capazes de formar uma ligação não covalente com a proteína SUMO (Hecker et al., 2006). A predição da presença de SIM na sequência de Ki-1/57 e CGI-55 revelou que ambas possuem uma região de SIM. Portanto, a interação de Ki-1/57 e CGI-55 com as proteínas que também são SUMOiladas e possuem o SIM pode ocorrer via interação SUMO-SIM, isto é, a proteína SUMO ligada covalentemente a uma das proteínas interage com o núcleo hifrofóbico do motivo SIM da outra proteína. O painel B da Figura 39 exemplifica como pode ocorrer este tipo de interação SUMO-SIM entre duas proteínas. Os painéis A e C são outros exemplos de possíveis consequências moleculares da SUMOilação. Essa modificação pode interferir com o perfil de interação entre a proteína alvo e suas parceiras, do modo que a interação só ocorre na ausência da modificação por SUMO, ou ela pode resultar em mudança conformacional da proteína modificada e alteração da atividade da proteína. Sendo assim, novos experimentos poderão ser feitos para investigar se as interações entre Ki-1/57, CGI-55 com suas parceiras (modificadas covalentemente por SUMO e portadoras de SIM) podem ser reguladas pelo estado de SUMOilação de Ki-1/57 e CGI-55 ou ainda, podem ocorrer via sequência SIM de Ki-1/57 e CGI-55.



Figura 39: As consequências moleculares da SUMOilação. A SUMOilação pode causar três consequências principais para a proteína modificada. (A) Pode interferir com a interação entre a proteína alvo (target) e a sua parceira (partner A), de modo que a interação só ocorre na ausência da modificação por SUMO. (B) A SUMOilação pode fornecer um sítio de ligação para proteína interactora (partner B), via ligação não covalente do motivo de interação com SUMO (SIM, em amarelo) da proteína interactora e a proteína SUMO. (C) A SUMOilação pode resultar em mudança conformacional da proteína modificada. (modificado de Geiss-Friedlander & Melchior, 2007).

A observação de que várias proteínas que interagem com Ki-1/57 e CGI-55 são proteínas nucleares funcionalmente relacionadas ao controle da transcrição e conhecidas por localizarem-se em corpúsculos nucleares PML (PML-NBs), como DAXX, p53, p100, UBC9, TOPORS e PIAS, sugeriu que Ki-1/57 e CGI-55 pudessem estar envolvidas com a composição ou com a função destes corpúsculos nucleares. (Lemos & Kobarg, 2006). Os PML-NBs correspondem a um sub-compartimento nuclear, compostos de proteínas PML e centenas de outras proteínas, muitas das quais são modificadas pós-traducionalmente por SUMOilação (Cheng & Kao, 2013; Sahin, Ferhi, et al., 2014). Os corpúsculos PML estão envolvidos na supressão de tumores, regulação da expressão gênica, regulação do ciclo celular e transcrição, estrutura da cromatina, apoptose e na infecção viral (Bernardi & Pandolfi, 2007; Lallemand-Breitenbach & de Thé, 2010).

Nesse trabalho (Artigo II) foi observado que, embora Ki-1/57 não tenha apresentado localização junto aos PML-NBs, a superexpressão tanto de Ki-1/57 selvagem quanto dos mutantes em células HeLa levou a uma redistribuição de proteína PML para o nucleoplasma e região perinuclear, além de formação de alguns agregados no citoplasma. Esse efeito de Ki-1/57 foi intensificado na presença de estresse induzido por As₂O₃. Um fenótipo semelhante, isto é, o aumento de PML solúvel com reduzida formação de PML-NBs foi descrito em células humanas após irradiação de UVC (Kurki et al., 2003; Seker et al., 2003) e mostrou ocorrer de forma dependente de p53. Foi sugerido que p53 participa da redistribuição

de proteína PML dos PML-NBs para sítios de reparo de lesão de DNA induzidos por UVC (Seker et al., 2003). Previamente, Ki-1/57 foi demonstrada interagir com p53 e diminuir a sua atividade transcricional (Nery et al., 2006). Portanto, embora o mecanismo exato de atuação de Ki-1/57 na redistribuição de PML não seja possível de ser explicado com esses dados, o fato de Ki-1/57 participar da modulação da expressão gênica e ser uma parceira de interação de p53, pode ser uma maneira pela qual Ki-1/57 atuaria na distribuição de PML.

6.5. As diferenças funcionais entre as regiões N- e C-terminal de Ki-1/57

A proteína Ki-1/57 não apresenta nenhum domínio funcional conhecido. O único domínio descrito para ela é o domínio HABP4 (*hyaluronan-binding protein 4*), que parece não apresentar uma relevância funcional *in vivo*. De importância funcional conhecida, Ki-1/57 apresenta regiões ricas em arginina e glicina chamadas RGG-box. Essas regiões são descritas por sofrerem metilação por PRMT1 e por serem sítios de ligação a RNA de diversas proteínas ligadoras a RNA (Burd & Dreyfuss, 1994).

Os estudos de interação proteína-proteína por duplo-híbrido em leveduras com o N- e C-terminal de Ki-1/57 identificaram diversas proteínas diferentes interagindo com Ki-1/57, algumas das quais estão representadas na Figura 1. Como descrito anteriormente, essas proteínas participam de processos biológicos distintos (regulação da transcrição, remodelamento da cromatina, processamento de RNA, mecanismo de tradução). O fator de transcrição, MEF2C, envolvido na diferenciação de cardiomioblastos em cardiomiócitos foi identificado no duplo-híbrido com o N-terminal de Ki-1/57 como isca. A caracterização do envolvimento de Ki-1/57 em metabolismo de RNA mostrou que o Nterminal de Ki-1/57 (1-150) é envolvido na interação com pelo menos três proteínas de splicing (SFRS9, SF2p32, YB-1) e seu C-terminal (122-413) foi suficiente para sua interação com uma a sonda de RNA rica em uracila em experimentos de EMSA. Por outo lado, a proteína inteira (1-413) foi necessária para a interação com outro fator de splicing hnRNPQ e para exercer a função de seleção do sítio de splicing de gene modelo E1A. Outros ensaios mostraram que a região N-terminal (1-222) de Ki-1/57 foi requerida para sua localização em corpúsculos subnucleares. Esse conjunto de dados mostra a importância do Nterminal e da proteína inteira para as funções nucleares de Ki-1/57. Por exemplo, as interações proteínaproteína podem ocorrer principalmente através do N-terminal e a ligação com o transcrito de pre-mRNA pelo C-terminal (RGG-box dessa região), mas ambas as porções são necessárias para uma correta e eficiente atividade de splicing de Ki-1/57 (Bressan et al., 2009).

6.6. A geração do nocaute de Ki-1/57

Neste trabalho utilizamos o sistema CRISPR/Cas9 em busca da obtenção de uma linhagem de camundongos nocautes para Ki-1/57. Na Figura 40 (painel A) é demonstrada a sequência alvo no exon um do gene *Habp4* com seu sítio endógeno de enzima de restrição NruI. A sequência alvo de 20 nucleotídeos foi clonada em um plasmídeo para que houvesse a expressão da endonuclease h*Sp*Cas9 e do RNA guia (sgRNA1), os quais juntos formaram um complexo no sítio de anelamento do sgRNA1 para clivagem das duas fitas de DNA pela h*Sp*Cas9 (painel B). Nesse sistema, as mutações são geradas por falhas deixadas pela própria maquinaria de reparo de quebra de dupla-fita de DNA da célula, como pelo reparo não homólogo (NHEJ). Foi observado que a injeção do plasmídeo CRISPR em zigoto de camundongo C57BL/6 gerou alelos mutantes diferentes (painel C), muitos dos quais foram identificados no mesmo animal, indicando a geração de animais mosaicos. O acasalamento desses mosaicos com camundongos selvagens segregou os alelos mutantes e gerou diferentes linhagens de heterozigotos.



Figura 40: Geração de mutantes para *Habp4* (Ki-1/57) pelo sistema CRISPR/Cas9. (A) Esquema representativo da região do exon 1 do gene *Habp4* que contém a sequência alvo 1 (*Target sequence 1*, em azul). A sequência PAM está indicada em vermelho e o sítio único de enzima de restrição NruI está sublinhado. (B) A sequência alvo 1 foi clonada no vetor px330 para gerar o guia de RNA (sgRNA 1, em azul). A endonuclease h*Sp*Cas9 selvagem (em verde) cliva as duas fitas de DNA em cerca de três nucleotídeos a montante da sequência PAM (em vermelho). (C) Sequências dos alelos mutantes gerados a partir de injeção pro-nuclear de plasmídeo circular px330-Habp4-sgRNA1 em zigoto de camundongo C57BL/6. Cada alelo foi segregado em uma linhagem de camundongo heterozigoto. A primeira linha contém a sequência de referência do animal selvagem (WT). A sequência alvo 1 (*Target sequence 1*)

está indicada em azul e a sequência PAM em vermelho. As deleções ou mutações estão representadas em verde. As mudanças na sequência de nucleotídeos estão entre parênteses à direita.

A identificação dos genótipos dos camundongos foi baseada em ensaios com as enzimas T7 endonuclease I e/ou NruI, e em sequenciamento do fragmento de DNA do *locus* alvo dos animais mutantes. Por meio de qRT-PCR, foi possivel demonstrar que o animal heterozigoto *Habp4*^{+/-} possui reduzidos níveis de expressão de Ki-1/57 comparado ao animal selvagem. Este resultado sugere, portanto, que o transcrito mutado de *Habp4* é degradado, uma vez que os *indels* (inserções ou deleções) gerados por CRISPR/Cas9 levaram a mudança no códon de leitura do ribossomo ou a formação de um códon de parada prematuro e não removeram uma fração grande do gene como foi feito na estratégia de recombinação homóloga. Se o transcrito mutado não fosse degradado, ele seria reconhecido pelos primers utilizados no qRT-PCR e a quantificação relativa entre o mutante e o selvagem seria a mesma.

Para obter o nocaute em homozigose, intercruzamentos entre animais contendo a mesma mutação foram feitas e geraram homozigotos viáveis. Estes homozigotos ainda não foram caracterizados quanto à expressão do gene *Habp4* (Ki-1/57) em níveis de mRNA e de proteína, constituindo um próximo passo a ser realizado. Tanto os heterozigotos quanto homozigotos nocautes desenvolveram-se normalmente, foram férteis e não apresentaram alguma anomalia aparentemente observada. Desse modo, uma caracterização minuciosa é requerida para investigar possíveis efeitos da ausência de Ki-1/57 no camundongo.

É importante lembrar que, pelo fato de Ki-1/57 apresentar um parálogo, a proteína CGI-55, alguns efeitos da inativação do gene de Ki-1/57 podem ser compensados pela atividade de CGI-55. Sendo assim, foram investigados os tecidos durante o desenvolvimento embrionário murino em que elas são expressas. Durante os estágios analisados (9.5, 10.5 e 11.5 dpc), Ki-1/57 e CGI-55 apresentaram um padrão de expressão bem semelhante, como nos arcos faríngeos, broto dos membros, somitos e medula espinhal de camundongos (Tabela 10). Entretanto, foi observado que CGI-55 é expressa em alguns tecidos em que não há expressão de Ki-1/57, como no átrio e ventrículo do coração embrionário. Um trabalho recente mostrou que CGI-55 é expressa desde o oócito, zigoto, embrião de 2 e 8 células, blastocisto e no ovário, enquanto Ki-1/57 mostrou-se expressa somente no estágio de blastocisto e no ovário (Chew et al., 2013). Em tecidos de humano adulto, os transcritos de Ki-1/57 e CGI-55 foram identificados simultaneamente em coração, músculo esquelético e rim (Lemos et al., 2003). Portanto, o fato de ambas as proteínas apresentarem algumas funções conhecidas em comum e padrão de expressão semelhante em tecidos embrionários e adultos, pode indicar uma compensação funcional de CGI-55 para a ausência de Ki-1/57. O nocaute de ambas as proteínas poderia responder essa pergunta.

Durante a análise dos níveis de expressão de Ki-1/57 por qRT-PCR em tecidos de animais adultos, foi observado um número maior de cópias do gene *Habp4* quando avaliado com primers para o final do gene do que com primers para o início, sugerindo a presença de uma variante de transcrito. Em humano, o gene Habp4 possui uma variante de *splicing* que exclui os exons 2, 3 e 4. Entretanto, em camundongos, nenhum outro transcrito foi descrito até hoje além do transcrito de 1236 pb que compreende os exons 1 a 8. Embora a presença dessa suposta variante menor pode estar compensando alguma atividade essencial da maior, sabe-se, por exemplo, que a correta e eficiente capacidade de Ki-1/47 em regular o processamento de RNA requer a presença da proteína inteira (Figura 1) (Bressan et al., 2009). Possivelmente, a atuação conjunta do N- e C-terminal se deve pela ligação da região C-terminal ao RNA e do N-terminal com proteínas de *splicing*. Por outro lado, se a variante menor ocorrer de fato, não se deve descartar a possibilidade de sua atuação como dominante negativo, por exemplo.

6.7. Ki-1/57 participa da regulação transcricional de MEF2C

As proteínas MEF2 modulam os programas gênicos que controlam proliferação, diferenciação, morfogênese, sobrevivência e apoptose em diversos tecidos, incluindo no coração, onde exercem papéis importantes no desenvolvimento e na adaptação pós-natal à sinais fisiológicos e patológicos (Potthoff & Olson, 2007). A atividade transcricional dos fatores MEF2 é influenciada por estímulos de estresse ou do desenvolvimento, os quais ativam vias de sinalização que levam a mudança de seu perfil de interação com co-fatores ou induzem modificações pós-traducionais em MEF2, e subsequente ativação ou repressão da transcrição de genes alvos de MEF2 (Black & Cripps, 2010).

Estudos realizados por Kobarg et al., 2005 mostraram que Ki-1/57 interage com o N-terminal de MEF2C e reduz ligeiramente a capacidade de MEF2C de ligar ao DNA (Kobarg et al., 2005). O N-terminal das proteínas MEF2 contém os domínios MADS-box e MEF os quais, dentre outras funções, são responsáveis por sua ligação ao DNA (Potthoff & Olson, 2007). O fato de Ki-1/57 interagir com MEF2C através da mesma região pela qual MEF2C interage com DNA e causar uma redução da atividade de ligação de MEF2C ao DNA sugere que Ki-1/57 é capaz de competir com o DNA pela interação com MEF2C e de deslocar a interação entre MEF2C e DNA, o que resultaria na redução da atividade transcricional de MEF2C.

Sendo assim, para estudar mais profundamente se Ki-1/57 pode influenciar na atividade de MEF2C, ensaios de transativação do gene repórter da luciferase foram realizados com um vetor que contém elementos regulatórios responsivos a MEF2 repetidos 3x e que é capaz de direcionar a expressão do gene da luciferase na presença da ligação do fator de transcrição MEF2C. Os resultados mostraram

que a superexpressão de Ki-1/57 em células HEK293T, juntamente com MEF2C, reduz a ativação do gene repórter da luciferase, comprovando o papel repressor de Ki-1/57 na atividade transcricional de MEF2C. Nesse contexto, outros estudos irão acrescentar mais informações com relação a regulação de Ki-1/57, como a caracterização da interface de interação entre Ki-1/57 e MEF2C através de *crosslink* e espectrometria de massas; e a investigação da capacidade de regiões diferentes de Ki-1/57 de ativar o gene responsivo a MEF2C. Este último deve contribuir principalmente para a demonstração de que a possível variante de transcrito, que compreende o C-terminal de Ki-1/57, não é capaz de ativar o gene repórter 3xMEF-Luc.

Por outro lado, os resultados de quantificação da expressão de Mef2c e de alguns genes alvos em coração de camundongo adulto selvagem e nocaute heterozigoto $Habp4^{+/-}$ revelaram que a redução da expressão de Ki-1/57 leva a uma menor expressão de Mef2c e de seus genes alvos (Myh6, Actc1 e Actn2), sugerindo que Ki-1/57 deve regular direta ou indiretamente a expressão do gene Mef2c no tecido cardíaco. Esses resultados ainda são preliminares, mas levantam questões acerca da resposta hipertrófica no camundongo $Habp4^{+/-}$. Se ele fosse submetido a estímulo de sobrecarga de pressão, a resposta hipertrófica seria menor, uma vez que ele possui reduzida expressão de genes estruturais? Portanto, estudos futuros quanto a influência de Ki-1/57 sobre o papel de MEF2C serão interessantes de serem realizados tanto com o próprio camundongo nocaute para Ki-1/57 como em ensaios de culturas de células de cardiomiócitos nocautes e de fibroblastos de embrião do camundongo nocaute.

7. CONCLUSÃO e PERSPECTIVAS

O presente trabalho obteve diferentes dados experimentais que demonstram o envolvimento de Ki-1/57 e CGI-55 na regulação da expressão gênica e em mecanismos de resposta celular a estresse, os quais estão de acordo com os achados anteriores de interação proteína-protéína e localização subcelular de ambas as proteínas. Esses dados apontam, portanto, para a participação de Ki-1/57 e CGI-55 na regulação integrada da expressão gênica, a nível transcricional, de processamento e estabilidade de RNA e de tradução. Também, foram demonstradas evidências adicionais que suportam a paralogia entre Ki-1/57 e CGI-55, como o semelhante perfil de expressão durante o desenvolvimento embrionário e a modificação por SUMOilação. O animal nocaute para Ki-1/57 é viável, talvez pela compensação funcional da proteína paráloga CGI-55 ou pela possível variante de transcrito menor que precisa ser melhor investigada. Especificamente:

 Por meio da análise do perfil global de expressão de mRNA por microarranjos de DNA, foi revelado um papel predominantemente repressor na transcrição gênica quando Ki-1/57 ou CGI-55 são superexpressas em células HEK293. Diversos genes regulados por elas estão relacionados ao controle da proliferação, do ciclo celular e da apoptose;

 A análise por qRT-PCR de alguns genes encontrados no microarranjo em células contendo a superexpressão ou o knockdown de Ki-1/57 e CGI-55 comprovou a participação dessas proteínas nos processos de proliferação, apoptose e ciclo celular;

 Experimentos de proliferação e ciclo celular permitiram observar uma redução da proliferação com a superexpressão de Ki-1/57 e CGI-55, possivelmente devido a uma parada na fase G1 do ciclo celular;

- Células superexpressando Ki-1/57 apresentaram menores taxas de apoptose quando induzida por tapsigargina (estresse de retículo endoplasmático), demonstrando um papel protetor de Ki-1/57 contra a apoptose sob esse estímulo;

 Análises de evolução molecular das sequências de Ki-1/57 e CGI-55 por inferência Bayesiana demonstraram que elas são parálogas e surgiram possivelmente por duplicação do genoma durante a evolução dos cordados;

- Ensaios de SUMOilação *in vitro* e *in vivo* demonstraram que Ki-1/57 é modificada por SUMO-1 e SUMO-2. A SUMOilação de Ki-1/57 mostrou-se importante para a sua atividade de regulação do sítio de *splicing* do gene modelo E1A; CGI-55 também foi demonstrada ser SUMOilada e a investigação da relevância desta modificação para as funções de CGI-55 é uma perspectiva a ser realizada; - Ensaios de imunofluorescência demonstraram que a superexpressão de Ki-1/57 em células HeLa altera a distribuição e organização de PML-NBs, importantes estruturas subnucleares formadas em resposta a uma variedade de estresses e funcionalmente relacionadas a regulação da transcrição;

- Ensaios de hibridação de RNA *in situ* com sondas específicas para Ki-1/57 e CGI-55 demonstraram que esses genes são amplamente expressos durante o desenvolvimento embrionário. Nos estágios avaliados, ambas são expressas nos arcos faríngeos, broto dos membros, somitos e em estruturas do encéfalo; somente a CGI-55 apresentou expressão nos territórios atriais e ventriculares do coração embrionário;

 Foram geradas células-tronco embrionárias deficientes em Ki-1/57 pelo procedimento de recombinação homóloga. Os ensaios iniciais de diferenciação *in vitro* sugeriram um papel regulatório de Ki-1/57 para a diferenciação neural;

- Linhagens de camundongos nocautes para Ki-1/57 (proteína de 412 aa) foram geradas utilizando o sistema CRISPR/Cas9 e revelou que o nocaute é viável;

- Os ensaios de qRT-PCR e Western blot com tecidos de camundongos adultos sugerem a presença de uma possível variante de transcrito iniciando no meio do gene *Habp4* e/ou variante de *splicing* alternativo, nunca descritos anteriormente para o gene murino. A expressão desses variantes parecem ser tecido-específica, constituindo uma perspectiva interessante de ser investigada em detalhes;

- A superexpressão de Ki-1/57 em células HEK293T, juntamente com MEF2C, reduziu a capacidade de ativação de MEF2C do gene repórter da luciferase 3xMEF2-Luc, comprovando o papel regulatório de Ki-1/57 na atividade transcricional de MEF2C;

- Tecidos de coração do camundongo nocaute heterozigoto para Ki-1/57 foram analisados por qRT-PCR quanto à expressão de MEF2C, alguns de seus genes estruturais alvos e do gene de p21. Esses resultados iniciais apontaram para o papel regulatório de Ki-1/57 na expressão desses genes. Portanto, estudos acerca da influência de Ki-1/57 sobre o papel de MEF2C serão perspectivas interessantes de estudo tanto com o próprio camundongo nocaute para Ki-1/57 como em ensaios de culturas de células de cardiomiócitos nocautes e de fibroblastos de embrião do camundongo nocaute.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akanuma, H., Qin, X.-Y., Nagano, R., Win-Shwe, T.-T., Imanishi, S., Zaha, H., ... Sone, H. (2012). Identification of Stage-Specific Gene Expression Signatures in Response to Retinoic Acid during the Neural Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells. *Frontiers in Genetics*, 3(August), 141.
- Ambrosetti, D. C., Schöler, H. R., Dailey, L., & Basilico, C. (2000). Modulation of the activity of multiple transcriptional activation domains by the DNA binding domains mediates the synergistic action of Sox2 and Oct-3 on the fibroblast growth factor-4 enhancer. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(30), 23387–97.
- Anderson, P., & Kedersha, N. (2009). RNA granules: post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 10(6), 430–6.
- Asakura, T., Iwaki, S., Okada, H., Sobel, B. E., & Fujii, S. (2011). Posttranscriptional regulation of expression of plasminogen activator inhibitor type-1 by cAMP in HepG2 liver cells. *Journal of Biochemistry*, 150(6), 687– 94.
- Assmann, E. M., Alborghetti, M. R., Camargo, M. E. R., & Kobarg, J. (2006). FEZ1 dimerization and interaction with transcription regulatory proteins involves its coiled-coil region. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(15), 9869–81.
- Bando, Y., Katayama, T., Aleshin, A. N., Manabe, T., & Tohyama, M. (2004). GRP94 reduces cell death in SH-SY5Y cells perturbated calcium homeostasis. *Apoptosis : An International Journal on Programmed Cell Death*, 9(4), 501–8.
- Barrangou, R. (2012). RNA-mediated programmable DNA cleavage. Nature Biotechnology, 30(9), 836-8.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., ... Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science (New York, N.Y.)*, 315(5819), 1709–12.
- Barysch, S. V, Dittner, C., Flotho, A., Becker, J., & Melchior, F. (2014). Identification and analysis of endogenous SUMO1 and SUMO2/3 targets in mammalian cells and tissues using monoclonal antibodies. *Nature Protocols*, 9(4), 896–909.
- Bayer, P., Arndt, A., Metzger, S., Mahajan, R., Melchior, F., Jaenicke, R., & Becker, J. (1998). Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. *Journal of Molecular Biology*, 280(2), 275– 86.
- Bernardi, R., & Pandolfi, P. P. (2007). Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(12), 1006–16.
- Bernier-Villamor, V., Sampson, D. A., Matunis, M. J., & Lima, C. D. (2002). Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1. *Cell*, 108(3), 345–56.
- Bibikova, M., Beumer, K., Trautman, J. K., & Carroll, D. (2003). Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Science (New York, N.Y.)*, 300(5620), 764.
- Bibikova, M., Golic, M., Golic, K. G., & Carroll, D. (2002). Targeted Chromosomal Cleavage and Mutagenesis in Drosophila Using Zinc-Finger Nucleases. *Genetics*, 161(3), 1169–1175.

- Black, B. L., & Cripps, R. M. (2010). Myocyte Enhancer Factor 2 Transcription Factors in Heart Development and Disease. *Heart Development and Regeneration*, 673–699.
- Boheler, K. R. (2002). Differentiation of Pluripotent Embryonic Stem Cells Into Cardiomyocytes. *Circulation Research*, 91(3), 189–201.
- Boiani, M., & Schöler, H. R. (2005). Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. Nature Reviews. Molecular Cell Biology, 6(11), 872–84.
- Borrelli, E., Heyman, R., Hsi, M., & Evans, R. M. (1988). Targeting of an inducible toxic phenotype in animal cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 85(20), 7572–6.
- Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M. H., & Robertson, E. (1984). Formation of germ-line chimaeras from embryoderived teratocarcinoma cell lines. *Nature*, 309(5965), 255–256.
- Bressan, G. C. (2009). Ki-1/57 é uma proteína intrinsecamente desordenada envolvida em mecanismos de regulação gênica. Tese.
- Bressan, G. C., & Kobarg, J. (2010). From protein interaction profile to functional assignment: The human protein Ki-1/57 is associated with pre-mRNA splicing events. *RNA Biology*, 7(3), 268–271.
- Bressan, G. C., Moraes, E. C., Manfiolli, A. O., Kuniyoshi, T. M., Passos, D. O., Gomes, M. D., & Kobarg, J. (2009). Arginine methylation analysis of the splicing-associated SR protein SFRS9/SRP30C. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 14(4), 657–69.
- Bressan, G. C., Quaresma, A. J. C., Moraes, E. C., Manfiolli, A. O., Passos, D. O., Gomes, M. D., & Kobarg, J. (2009). Functional association of human Ki-1/57 with pre-mRNA splicing events. *The FEBS Journal*, 276(14), 3770–83.
- Bressan, G. C., Silva, C., Borges, C., Passos, D. O., Ramos, C. H. I., Torriani, I. L., & Ma, G. (2008). Human Regulatory Protein Ki-1 / 57 Has Characteristics of an Intrinsically Unstructured Protein research articles, 4465–4474.
- Bultman, S. J., Klebig, M. L., Michaud, E. J., Sweet, H. O., Davisson, M. T., & Woychik, R. P. (1994). Molecular analysis of reverse mutations from nonagouti (a) to black-and-tan (a(t)) and white-bellied agouti (Aw) reveals alternative forms of agouti transcripts. *Genes & Development*, 8(4), 481–90.
- Burd, C. G., & Dreyfuss, G. (1994). Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. Science (New York, N.Y.), 265(5172), 615-21.
- Cáceres, J. F., Stamm, S., Helfman, D. M., & Krainer, A. R. (1994). Regulation of alternative splicing in vivo by overexpression of antagonistic splicing factors. *Science (New York, N.Y.)*, 265(5179), 1706–9.
- Capecchi, M. R. (1980). High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell*, 22(2 Pt 2), 479–88.
- Capecchi, M. R. (1989). Altering the Genome Homologous Recombination by From ES Cells to Germ Line Chimera. *Science*, 236(1987), 1288–1291.
- Capecchi, M. R. (1989). The new mouse genetics: Altering the genome by gene targeting. *Trends in Genetics*, 5, 70–76.

- Capecchi, M. R. (2005). Gene targeting in mice : functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nature Reviews Genetics*, *6*, 507–513.
- Capo-Chichi, C. D., Rula, M. E., Smedberg, J. L., Vanderveer, L., Parmacek, M. S., Morrisey, E. E., ... Xu, X.-X. (2005). Perception of differentiation cues by GATA factors in primitive endoderm lineage determination of mouse embryonic stem cells. *Developmental Biology*, 286(2), 574–86.
- Chambers, I. (2004). The molecular basis of pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Cloning and Stem Cells*, 6(4), 386–91.
- Chang, N., Sun, C., Gao, L., Zhu, D., Xu, X., Zhu, X., ... Xi, J. J. (2013). Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in zebrafish embryos. *Cell Research*, 23(4), 465–72.
- Chen, B., Gilbert, L. A., Cimini, B. A., Schnitzbauer, J., Zhang, W., Li, G.-W., ... Huang, B. (2013). Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. *Cell*, 155(7), 1479–91.
- Chen, F., Pruett-Miller, S. M., Huang, Y., Gjoka, M., Duda, K., Taunton, J., ... Davis, G. D. (2011). High-frequency genome editing using ssDNA oligonucleotides with zinc-finger nucleases. *Nature Methods*, 8(9), 753–5.
- Cheng, X., & Kao, H.-Y. (2013). Post-translational modifications of PML: consequences and implications. *Frontiers in Oncology*, 2, 210.
- Chew, T. G., Peaston, A., Lim, A. K., Lorthongpanich, C., Knowles, B. B., & Solter, D. (2013). A tudor domain protein SPINDLIN1 interacts with the mRNA-binding protein SERBP1 and is involved in mouse oocyte meiotic resumption. *PloS One*, 8(7), e69764.
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., ... Zhang, F. (2013). Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. Science, 339(6121), 819–23.
- Costa, F. C., Saito, A., Gonçalves, K. A., Vidigal, P. M., Meirelles, G. V, Bressan, G. C., & Kobarg, J. (2014). Ki-1/57 and CGI-55 ectopic expression impact cellular pathways involved in proliferation and stress response regulation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1843(12), 2944–56.
- Decker, C. J., & Parker, R. (2012). P-bodies and stress granules: possible roles in the control of translation and mRNA degradation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(9), a012286.
- Déclais, A.-C., Fogg, J. M., Freeman, A. D. J., Coste, F., Hadden, J. M., Phillips, S. E. V, & Lilley, D. M. J. (2003). The complex between a four-way DNA junction and T7 endonuclease I. *The EMBO Journal*, 22(6), 1398–409.
- Deng, C., & Capecchi, M. R. (1992). Reexamination of Gene Targeting Frequency as a Function of the Extent of Homology between the Targeting Vector and the Target Locus. *Molecular and Cellular Biology*, 12(8), 3365–3371.
- Dianov, G. L., & Hübscher, U. (2013). Mammalian base excision repair: the forgotten archangel. *Nucleic Acids Research*, 41(6), 3483–90.
- Doetschman, T., Gregg, R. G., Maeda, N., Hooper, M. L., Melton, D. W., Thompson, S., & Smithies, O. (1987). Targetted correction of a mutant Hprt gene in mouse embryonic stem cells. *Nature*, 330, 576–578.
- Doetschman, T., Maeda, N., & Smithies, O. (1988). Targeted mutation of the Hprt gene in mouse embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(22), 8583–7.

- Duprez, E., Saurin, A. J., Desterro, J. M., Lallemand-Breitenbach, V., Howe, K., Boddy, M. N., ... Freemont, P. S. (1999). SUMO-1 modification of the acute promyelocytic leukaemia protein PML: implications for nuclear localisation. *Journal of Cell Science*, *112 (Pt 3*, 381–93.
- Dyson, H. J., & Wright, P. E. (2005). Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nature Reviews*. *Molecular Cell Biology*, 6(3), 197–208.
- Edmondson, D. G., Lyons, G. E., Martin, J. F., & Olson, E. N. (1994). Mef2 gene expression marks the cardiac and skeletal muscle lineages during mouse embryogenesis. *Development (Cambridge, England)*, 120(5), 1251–63.
- Elliott, B., Richardson, C., Winderbaum, J., Nickoloff, J. a, & Jasin, M. (1998). Gene conversion tracts from double-strand break repair in mammalian cells. *Molecular and Cellular Biology*, 18(1), 93–101.
- Evans, M. J., & Kaufman, M. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292, 154–156.
- Folger, K. R., Wong, E. a, Wahl, G., & Capecchi, M. R. (1982). Patterns of integration of DNA microinjected into cultured mammalian cells: evidence for homologous recombination between injected plasmid DNA molecules. *Molecular and Cellular Biology*, 2(11), 1372–87.
- Fujita, T., & Fujii, H. (2013). Efficient isolation of specific genomic regions and identification of associated proteins by engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP) using CRISPR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 439(1), 132–6.
- Gaj, T., Gersbach, C. a, & Barbas, C. F. (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology*, 31(7), 397–405.
- Gareau, J. R., & Lima, C. D. (2010a). The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11(12), 861–71.
- Gareau, J. R., & Lima, C. D. (2010b). The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11(12), 861–71.
- Geiss-Friedlander, R., & Melchior, F. (2007). Concepts in sumoylation: a decade on. Nature Reviews. Molecular Cell Biology, 8(12), 947–56.
- Gilbert, L. a, Larson, M. H., Morsut, L., Liu, Z., Brar, G. a, Torres, S. E., ... Qi, L. S. (2013). CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*, 154(2), 442–51.
- Gill, G. (2004). SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? Genes & Development, 18(17), 2046–59.
- Golebiowski, F., Matic, I., Tatham, M. H., Cole, C., Yin, Y., Nakamura, A., ... Hay, R. T. (2009). System-wide changes to SUMO modifications in response to heat shock. *Science Signaling*, 2(72), ra24.
- Gonçalves, K. de A., Bressan, G. C., Saito, A., Morello, L. G., Zanchin, N. I. T., & Kobarg, J. (2011). Evidence for the association of the human regulatory protein Ki-1/57 with the translational machinery. *FEBS Letters*, 585(16), 2556–60.
- Goodier, J. L., Zhang, L., Vetter, M. R., & Kazazian, H. H. (2007a). LINE-1 ORF1 protein localizes in stress granules with other RNA-binding proteins, including components of RNA interference RNA-induced silencing complex. *Molecular and Cellular Biology*, 27(18), 6469–83.

- Goodier, J. L., Zhang, L., Vetter, M. R., & Kazazian, H. H. (2007b). LINE-1 ORF1 protein localizes in stress granules with other RNA-binding proteins, including components of RNA interference RNA-induced silencing complex. *Molecular and Cellular Biology*, 27(18), 6469–83.
- Gordon, J. W., & Ruddle, F. H. (1981). Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science (New York, N.Y.)*, 214(4526), 1244–6.
- Gratz, S. J., Cummings, A. M., Nguyen, J. N., Hamm, D. C., Donohue, L. K., Harrison, M. M., ... O'Connor-Giles, K. M. (2013). Genome engineering of Drosophila with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease. *Genetics*, 194(4), 1029–35.
- Gray-McGuire, C., Guda, K., Adrianto, I., Lin, C. P., Natale, L., Potter, J. D., ... Wiesner, G. L. (2010). Confirmation of linkage to and localization of familial colon cancer risk haplotype on chromosome 9q22. *Cancer Research*, 70(13), 5409–18.
- Gu, H., Marth, J., Orban, P., Mossmann, H., & Rajewsky, K. (1994). Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science*, 265(5168), 103–106.
- Hadden, J. M., Convery, M. A., Déclais, A. C., Lilley, D. M., & Phillips, S. E. (2001). Crystal structure of the Holliday junction resolving enzyme T7 endonuclease I. *Nature Structural Biology*, 8(1), 62–7.
- Hansen, H., Bredfeldt, G., Havsteen, B., & Lemke, H. (1990). Protein kinase activity of the intracellular but not of the membrane-associated form of the KI-1 antigen (CD30). *Research in Immunology*, 141(1), 13–31.
- Hansen, H., Lemke, H., Bredfelt, G., Könnecke, I., & Havsteen, B. (1989). The Hodgkin-Associated Ki-1 Antigen Exists in an Intracellular and a Membrane-Bound Form. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 370, 409–416.
- Hasty, P., & Bradley, A. (1993). Gene targeting: a practical approach. In *Gene targeting: a practical approach* (pp. 1–31).
- Hasty, P., Rivera-perez, J., & Bradley, A. (1991). The Length of Homology Required for Gene Targeting in Embryonic Stem Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 11(11), 5586–5591.
- Hasty, P., Rivera-perez, J., Chang, C., Bradley, A., & Al, H. E. T. (1991). Target Frequency and Integration Pattern for Insertion and Replacement Vectors in Embryonic Stem Cells, *11*(9), 4509–4517.
- Heaton, J. H., Dlakic, W. M., Dlakic, M., & Gelehrter, T. D. (2001). Identification and cDNA Cloning of a Novel RNA-binding Protein That Interacts with the Cyclic Nucleotide-responsive Sequence in the Type-1 Plasminogen Activator Inhibitor mRNA. *Journal of Biological Chemistry*, 276(5), 3341–3347.
- Hecker, C.-M., Rabiller, M., Haglund, K., Bayer, P., & Dikic, I. (2006). Specification of SUMO1- and SUMO2interacting motifs. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(23), 16117–27.
- Hendriks, I. A., D'Souza, R. C. J., Yang, B., Verlaan-de Vries, M., Mann, M., & Vertegaal, A. C. O. (2014). Uncovering global SUMOylation signaling networks in a site-specific manner. *Nature Structural & Molecular Biology*, 21(10), 927–936.
- Hou, Y., Zhang, H., Miranda, L., & Lin, S. (2010). Serious overestimation in quantitative PCR by circular (supercoiled) plasmid standard: microalgal pcna as the model gene. *PloS One*, 5(3), e9545.
- Hsu, P. D., Lander, E. S., & Zhang, F. (2014). Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell*, 157(6), 1262–1278.

- Hsu, P. D., Scott, D. A., Weinstein, J. A., Ran, F. A., Konermann, S., Agarwala, V., ... Zhang, F. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature Biotechnology*, 31(July), 1–8.
- Huang, L., Grammatikakis, N., Yoneda, M., Banerjee, S. D., & Toole, B. P. (2000). Molecular characterization of a novel intracellular hyaluronan-binding protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(38), 29829–39.
- Hwang, W. Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M. L., Tsai, S. Q., Sander, J. D., ... Joung, J. K. (2013). Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*, 31(3), 227–9.
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakata, a. (1987). Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, 169(12), 5429–33.
- Ittner, L. M., & Götz, J. (2007). Pronuclear injection for the production of transgenic mice. *Nature Protocols*, 2(5), 1206–15.
- Iwaki, S., Yamamura, S., Asai, M., Sobel, B. E., & Fujii, S. (2012). Posttranscriptional regulation of expression of plasminogen activator inhibitor type-1 by sphingosine 1-phosphate in HepG2 liver cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1819(11-12), 1132–41.
- Jansen, R., Embden, J. D. A. Van, Gaastra, W., & Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 43, 1565–1575.
- Jao, L.-E., Wente, S. R., & Chen, W. (2013). Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 110(34), 13904–9.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. a, & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6096), 816– 21.
- Johnson, E. S. (2004). Protein modification by SUMO. Annual Review of Biochemistry, 73, 355-82.
- Kedersha, N., Stoecklin, G., Ayodele, M., Yacono, P., Lykke-Andersen, J., Fritzler, M. J., ... Anderson, P. (2005). Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *The Journal of Cell Biology*, 169(6), 871–84.
- Kerscher, O. (2007). SUMO junction—what's your function? New insights through SUMO-interacting motifs. *EMBO Reports*, 8(6), 550–555.
- Kiesslich, A., von Mikecz, A., & Hemmerich, P. (2002). Cell cycle-dependent association of PML bodies with sites of active transcription in nuclei of mammalian cells. *Journal of Structural Biology*, 140(1-3), 167–79.
- Kim, M., Habiba, A., Doherty, J. M., Mills, J. C., Mercer, R. W., & Huettner, J. E. (2009). Regulation of mouse embryonic stem cell neural differentiation by retinoic acid. *Developmental Biology*, 328(2), 456–71.
- Kobarg, C. B., Kobarg, J., Crosara-Alberto, D. P., Theizen, T. H., & Franchini, K. G. (2005). MEF2C DNA-binding activity is inhibited through its interaction with the regulatory protein Ki-1/57. *FEBS Letters*, 579(12), 2615– 22.
- Kobarg, J., Schnittger, S., Fonatsch, C., Lemke, H., Bowen, M. A., Buck, F., & Hansen, H. P. (1997). Characterization, mapping and partial cDNA sequence of the 57-kD intracellular Ki-1 antigen. *Experimental and Clinical Immunogenetics*, 14(4), 273–80.

- Koensgen, D., Mustea, A., Klaman, I., Sun, P., Zafrakas, M., Lichtenegger, W., ... Sehouli, J. (2007). Expression analysis and RNA localization of PAI-RBP1 (SERBP1) in epithelial ovarian cancer: association with tumor progression. *Gynecologic Oncology*, 107(2), 266–73.
- Kunkle, B. W., Yoo, C., & Roy, D. (2013). Reverse engineering of modified genes by Bayesian network analysis defines molecular determinants critical to the development of glioblastoma. *PloS One*, 8(5), e64140.
- Kuo, I.-Y., Wu, C.-C., Chang, J.-M., Huang, Y.-L., Lin, C.-H., Yan, J.-J., ... Wang, Y.-C. (2014). Low SOX17 expression is a prognostic factor and drives transcriptional dysregulation and esophageal cancer progression. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 135(3), 563–73.
- Kurki, S., Latonen, L., & Laiho, M. (2003). Cellular stress and DNA damage invoke temporally distinct Mdm2, p53 and PML complexes and damage-specific nuclear relocalization. *Journal of Cell Science*, 116(Pt 19), 3917–25.
- Lallemand-Breitenbach, V., & de Thé, H. (2010). PML nuclear bodies. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2(5), a000661.
- Lallemand-Breitenbach, V., Zhu, J., Puvion, F., Koken, M., Honoré, N., Doubeikovsky, A., ... de Thé, H. (2001). Role of promyelocytic leukemia (PML) sumolation in nuclear body formation, 11S proteasome recruitment, and As2O3-induced PML or PML/retinoic acid receptor alpha degradation. *The Journal of Experimental Medicine*, 193(12), 1361–71.
- Lee, Y., Hsieh, W., Chen, L., & Li, C. (2012). Protein arginine methylation of SERBP1 by protein arginine methyltransferase 1 affects cytoplasmic / nuclear distribution. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113, 2721– 28.
- Lee, Y.-J., Wei, H.-M., Chen, L.-Y., & Li, C. (2014). Localization of SERBP1 in stress granules and nucleoli. *The FEBS Journal*, 281(1), 352–64.
- Lemos, T. A., & Kobarg, J. (2006). CGI-55 Interacts With Nuclear Proteins and Co-Localizes to p80-Coilin Positive-Coiled Bodies in the Nucleus. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 44, 463–474.
- Lemos, T. A., Passos, D. O., Nery, F. C., & 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 Letters, 533, 14–20.
- Levine, A. J. (1997). p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. Cell, 88(3), 323-331.
- Lin, D., Tatham, M. H., Yu, B., Kim, S., Hay, R. T., & Chen, Y. (2002). Identification of a substrate recognition site on Ubc9. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(24), 21740–8.
- Lin, J.-Y., Ohshima, T., & Shimotohno, K. (2004). Association of Ubc9, an E2 ligase for SUMO conjugation, with p53 is regulated by phosphorylation of p53. *FEBS Letters*, *573*(1-3), 15–8.
- Lin, Q., Schwarz, J., Bucana, C., & Olson, E. N. (1997). Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C. Science (New York, N.Y.), 276(5317), 1404–7.
- Liu, X.-A., Song, J., Jiang, Q., Wang, Q., Tian, Q., & Wang, J.-Z. (2012). Expression of the hyperphosphorylated tau attenuates ER stress-induced apoptosis with upregulation of unfolded protein response. *Apoptosis : An International Journal on Programmed Cell Death*, 17(10), 1039–49.

- Lu, J., McKinsey, T. A., Nicol, R. L., & Olson, E. N. (2000). Signal-dependent activation of the MEF2 transcription factor by dissociation from histone deacetylases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(8), 4070–5.
- Ma, L., Aslanian, A., Sun, H., Jin, M., Shi, Y., Yates, J. R., & Hunter, T. (2014). Identification of small ubiquitinlike modifier substrates with diverse functions using the Xenopus egg extract system. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 13(7), 1659–75.
- Mali, P., Esvelt, K. M., & Church, G. M. (2013). Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nature Methods*, 10(10), 957–63.
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., Dicarlo, J. E., ... Church, G. M. (2013). RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. *Science*, 339(February), 823–826.
- Mansour, S. L., Thomas, K. R., & Capecchi, M. R. (1988). Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature*, 336(6197), 348–52.
- Martin, G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells Developmental Biology:, 78(12), 7634–7638.
- Martin, G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(12), 7634–8.
- Melnick, A., & Licht, J. D. (1999). Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood*, *93*(10), 3167–215.
- Miller, J. C., Holmes, M. C., Wang, J., Guschin, D. Y., Lee, Y.-L., Rupniewski, I., ... Rebar, E. J. (2007). An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nature Biotechnology*, 25(7), 778–85.
- Miller, J. C., Tan, S., Qiao, G., Barlow, K. a, Wang, J., Xia, D. F., ... Rebar, E. J. (2011). A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nature Biotechnology*, 29(2), 143–8.
- Mojica, F. J., Díez-Villaseñor, C., Soria, E., & Juez, G. (2000). Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular Microbiology*, *36*, 244–6.
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., & Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution*, 60(2), 174–82.
- Morrissey, C., True, L. D., Roudier, M. P., Coleman, I. M., Hawley, S., Nelson, P. S., ... Vessella, R. L. (2008). Differential expression of angiogenesis associated genes in prostate cancer bone, liver and lymph node metastases. *Clinical & Experimental Metastasis*, 25(4), 377–88.
- Nagy, A. (2000). Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. Genesis, 26(2), 99-109.
- Nagy, A., Gertsenstein, M., Vintersten, K., & Behringer, R. (2003). Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual (Third Edition). In *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual (Third Edition)* (Cold Sprin). Cold SpringHarbor Laboratory Press.

- Nakagawa, K., & Yokosawa, H. (2002). PIAS3 induces SUMO-1 modification and transcriptional repression of IRF-1. *FEBS Letters*, 530(1-3), 204–208.
- Narita, N., Bielinska, M., & Wilson, D. B. (1997). Cardiomyocyte differentiation by GATA-4-deficient embryonic stem cells. *Development (Cambridge, England)*, 124(19), 3755–64.
- Nery, F. C. (2005). Estudos funcionais e estruturais da proteína reguladora humana Ki-1/57. Tese.
- Nery, F. C., Passos, D. O., Garcia, V. S., & 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(12), 11444–55.
- Nery, F. C., Rui, E., Kuniyoshi, T. M., & Kobarg, J. (2006). Evidence for the interaction of the regulatory protein Ki-1/57 with p53 and its interacting proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 341(3), 847–55.
- Niwa, H., Miyazaki, J., & Smith, A. G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature Genetics*, 24(4), 372–6.
- Owerbach, D., McKay, E. M., Yeh, E. T. H., Gabbay, K. H., & Bohren, K. M. (2005). A proline-90 residue unique to SUMO-4 prevents maturation and sumoylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 337(2), 517–20.
- Passos, D. O., Bressan, G. C., Nery, F. C., & Kobarg, J. (2006). Ki-1/57 interacts with PRMT1 and is a substrate for arginine methylation. *The FEBS Journal*, 273(17), 3946–61.
- Pease, S., Braghetta, P., Gearing, D., Grail, D., & Williams, R. L. (1990). Isolation of Embryonic Stem (ES) Cells in Media Supplemented with Recombinant Leukemia Inhibitory Factor (L1F). *Developmental Biology*, 141, 344–352.
- Pelisch, F., Gerez, J., Druker, J., Schor, I. E., Munoz, M. J., Risso, G., ... Srebrow, A. (2010). The serine/argininerich protein SF2/ASF regulates protein sumoylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(37), 16119–16124.
- Peluso, J. J., Yuan, A., Liu, X., & Lodde, V. (2013). Plasminogen Activator Inhibitor 1 RNA-Binding Protein Interacts with Progesterone Receptor Membrane Component 1 to Regulate Progesterone 's Ability to Maintain the Viability of Spontaneously Immortalized Granulosa Cells and Rat Granulosa Cells 1, 88(December 2012), 1–10.
- Pesce, M., & Schöler, H. R. (2001). Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells* (*Dayton, Ohio*), 19(4), 271-8.
- Potthoff, M. J., & Olson, E. N. (2007). MEF2: a central regulator of diverse developmental programs. *Development* (*Cambridge, England*), 134(23), 4131–40.
- Raffetseder, U., Frye, B., Rauen, T., Jurchott, K., Royer, H.-D., Jansen, P. L., & Mertens, P. R. (2003). Splicing Factor SRp30c Interaction with Y-box Protein-1 Confers Nuclear YB-1 Shuttling and Alternative Splice Site Selection. *Journal of Biological Chemistry*, 278(20), 18241–18248.
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Lin, C.-Y., Gootenberg, J. S., Konermann, S., Trevino, A. E., ... Zhang, F. (2013). Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 154(6), 1380–9.

- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. a, & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, 8(11), 2281–308.
- Riley, T., Sontag, E., Chen, P., & Levine, A. (2008). Transcriptional control of human p53-regulated genes. Nature Reviews. Molecular Cell Biology, 9(5), 402–12.
- Rodriguez, M. S., Dargemont, C., & Hay, R. T. (2001). SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(16), 12654–9.
- Rohde, D., Hansen, H., Hafner, M., Lange, H., Mielke, V., Hansmann, M. L., & Lemke, H. (1992). Cellular localizations and processing of the two molecular forms of the Hodgkin-associated Ki-1 (CD30) antigen. The protein kinase Ki-1/57 occurs in the nucleus. *The American Journal of Pathology*, 140(2), 473–82.
- Rytinki, M. M., Kaikkonen, S., Pehkonen, P., Jääskeläinen, T., & Palvimo, J. J. (2009). PIAS proteins: pleiotropic interactors associated with SUMO. *Cellular and Molecular Life Sciences* : *CMLS*, *66*(18), 3029–41.
- Sabbadini, R. A. (2006). Targeting sphingosine-1-phosphate for cancer therapy. *British Journal of Cancer*, 95(9), 1131–5.
- Sahin, U., Ferhi, O., Jeanne, M., Benhenda, S., Berthier, C., Jollivet, F., ... Lallemand-Breitenbach, V. (2014). Oxidative stress-induced assembly of PML nuclear bodies controls sumoylation of partner proteins. *The Journal of Cell Biology*, 204(6), 931–45.
- Sahin, U., Lallemand-Breitenbach, V., & de Thé, H. (2014). PML nuclear bodies: regulation, function and therapeutic perspectives. *The Journal of Pathology*, 234(3), 289–91.
- Saleh-Gohari, N., & Helleday, T. (2004). Conservative homologous recombination preferentially repairs DNA double-strand breaks in the S phase of the cell cycle in human cells. *Nucleic Acids Research*, 32(12), 3683– 8.
- Sanjana, N. E., Cong, L., Zhou, Y., Cunniff, M. M., Feng, G., & Zhang, F. (2012). A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering. *Nature Protocols*, 7(1), 171–92.
- Schwab, U., Stein, H., Gerdes, J., Lemke, H., Kirchner, H., Schaadt, M., & Diehl, V. (1982). Production of a monoclonal antibody specific for Hodgkin and Sternberg–Reed cells of Hodgkin's disease and a subset of normal lymphoid cells. *Nature*, 299(5878), 65–67.
- Seker, H., Rubbi, C., Linke, S. P., Bowman, E. D., Garfield, S., Hansen, L., ... Harris, C. C. (2003). UV-C-induced DNA damage leads to p53-dependent nuclear trafficking of PML. *Oncogene*, 22(11), 1620–8.
- Seydoux, G., & Braun, R. E. (2006). Pathway to totipotency: lessons from germ cells. Cell, 127(5), 891-904.
- Smith, J., Grizot, S., Arnould, S., Duclert, A., Epinat, J.-C., Chames, P., ... Duchateau, P. (2006). A combinatorial approach to create artificial homing endonucleases cleaving chosen sequences. *Nucleic Acids Research*, 34(22), e149.
- Smithies, O., Gregg, R. G., Boggs, S. S., Koralewski, M. A., & Kucherlapati, R. S. (1985). Insertion of DNA sequences into the human chromosomal β-globin locus by homologous recombination. *Nature*, 317(6034), 230–234.
- Sokol, S. Y. (2011). Maintaining embryonic stem cell pluripotency with Wnt signaling. *Development (Cambridge, England)*, 138(20), 4341–50.

- Soudais, C., Bielinska, M., Heikinheimo, M., MacArthur, C. A., Narita, N., Saffitz, J. E., ... Wilson, D. B. (1995). Targeted mutagenesis of the transcription factor GATA-4 gene in mouse embryonic stem cells disrupts visceral endoderm differentiation in vitro. *Development (Cambridge, England)*, 121(11), 3877–88.
- Stephens, C., & Harlow, E. (1987). Differential splicing yields novel adenovirus 5 E1A mRNAs that encode 30 kd and 35 kd proteins. *The EMBO Journal*, 6(7), 2027–35.
- Sun, W., Guo, C., Meng, X., Yu, Y., Jin, Y., Tong, D., ... Bai, J. (2012). Differential expression of PAI-RBP1, Clorf142, and COTL1 in non-small cell lung cancer cell lines with different tumor metastatic potential. Journal of Investigative Medicine: The Official Publication of the American Federation for Clinical Research, 60(4), 689–94.
- Szegezdi, E., Logue, S. E., Gorman, A. M., & Samali, A. (2006). Mediators of endoplasmic reticulum stressinduced apoptosis. *EMBO Reports*, 7(9), 880–5.
- Tatham, M. H., Jaffray, E., Vaughan, O. A., Desterro, J. M., Botting, C. H., Naismith, J. H., & Hay, R. T. (2001). Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(38), 35368–74.
- Thomas, K. R., & Capecchi, M. R. (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*, 51(3), 503–512.
- Thomas, K. R., Folger, K. R., & Capecchi, M. R. (1986). High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. *Cell*, 44, 419–428.
- Van Damme, E., Laukens, K., Dang, T. H., & Van Ostade, X. (2010). A manually curated network of the PML nuclear body interactome reveals an important role for PML-NBs in SUMOylation dynamics. *International Journal of Biological Sciences*, 6(1), 51–67.
- Vasquez, K. M., Marburger, K., Intody, Z., & Wilson, J. H. (2001). Manipulating the mammalian genome by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci US A*, 98(1), 8403–8410.
- Wang, H., Yang, H., Shivalila, C. S., Dawlaty, M. M., Cheng, A. W., Zhang, F., & Jaenisch, R. (2013). One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 153(4), 910–8.
- Wang, J., Shiels, C., Sasieni, P., Wu, P. J., Islam, S. A., Freemont, P. S., & Sheer, D. (2004). Promyelocytic leukemia nuclear bodies associate with transcriptionally active genomic regions. *The Journal of Cell Biology*, 164(4), 515–26.
- Wefers, B., Panda, S. K., Ortiz, O., Brandl, C., Hensler, S., Hansen, J., ... Kühn, R. (2013). Generation of targeted mouse mutants by embryo microinjection of TALEN mRNA. *Nature Protocols*, 8(12), 2355–79.
- Weger, S., Hammer, E., & Heilbronn, R. (2005). Topors acts as a SUMO-1 E3 ligase for p53 in vitro and in vivo. *FEBS Letters*, 579(22), 5007–12.
- Wu, S., Ying, G., Wu, Q., & Capecchi, M. R. (2008). A protocol for constructing gene targeting vectors: generating knockout mice for the cadherin family and beyond. *Nature Protocols*, 3(6), 1056–1076.
- Xiao, A., Cheng, Z., Kong, L., Zhu, Z., Lin, S., Gao, G., & Zhang, B. (2014). CasOT : a genome-wide Cas9 / gRNA off-target searching tool. *Bioinformatics*, (3), 3–5.

- Yang, H., Wang, H., Shivalila, C. S., Cheng, A. W., Shi, L., & Jaenisch, R. (2013). One-Step Generation of Mice Carrying Reporter and Conditional Alleles by CRISPR / Cas-Mediated Genome Engineering. *Cell*, 1–10.
- Yen, S.-T., Zhang, M., Deng, J. M., Usman, S. J., Smith, C. N., Parker-Thornburg, J., ... Behringer, R. R. (2014). Somatic mosaicism and allele complexity induced by CRISPR/Cas9 RNA injections in mouse zygotes. *Developmental Biology*, 293(1), 3–9.
- Ying, M., Sannerud, R., Flatmark, T., & Saraste, J. (2002). Colocalization of Ca2+-ATPase and GRP94 with p58 and the effects of thapsigargin on protein recycling suggest the participation of the pre-Golgi intermediate compartment in intracellular Ca2+ storage. *European Journal of Cell Biology*, 81(9), 469–83.
- Zhang, Y., Cooke, M., Panjwani, S., Cao, K., Krauth, B., Ho, P.-Y., ... Fan, Y. (2012). Histone h1 depletion impairs embryonic stem cell differentiation. *PLoS Genetics*, 8(5), e1002691.

APÊNDICES 9.

Artigos em colaboração publicados ou submetidos:

Artigo 1:



	Article	
ubs.acs.org	/Langmuir	

p

Tailored Silica-Antibiotic Nanoparticles: Overcoming Bacterial Resistance with Low Cytotoxicity

Larissa Brentano Capeletti,^{†,‡} Luciane França de Oliveira,[‡] Kaliandra de Almeida Gonçalves,[§] Jessica Fernanda Affonso de Oliveira,^{‡,||} Ângela Saito,[§] Jörg Kobarg,[§] João Henrique Zimnoch dos Santos,[†] and Mateus Borba Cardoso*^{,‡,||}

[†]UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil [‡]LNLS - Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, CEP 13083-970, Caixa Postal 6192, Campinas, SP, Brazil [§]LNBio - Laboratório Nacional de Biociências, CEP 13083-970, Caixa Postal 6192, Campinas, SP, Brazil Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CEP 13083-970, Caixa Postal 6154, Campinas, SP, Brazil

Supporting Information

ABSTRACT: New and more aggressive antibiotic resistant bacteria arise at an alarming rate and represent an evergrowing challenge to global health care systems. Consequently, the development of new antimicrobial agents is required to overcome the inefficiency of conventional antibiotics and bypass treatment limitations related to these pathologies. In this study, we present a synthesis protocol, which was able to entrap tetracycline antibiotic into silica nanospheres. Bactericidal efficacy of these structures was tested against bacteria that were susceptible and resistant to antibiotics. For nonresistant bacteria, our composite had bactericidal efficiency comparable to that of free-tetracycline. On the other hand, the synthesized composites were able to avoid bacterial growth of



resistant bacteria while free-tetracycline has shown no significant bactericidal effect. Finally, we have investigated the cytotoxicity of these nanoparticles against mammalian cells to check any possible poisoning effect. It was found that these nanospheres are not apoptosis-inducers and only a reduction on the cell replication rate was seen when compared to the control without nanoparticles.

1. INTRODUCTION

Infections and several diseases caused by resistant microorganisms in which the conventional treatment often fails result in prolonged illness and greater risks of death. The inappropriate and irrational use of antibiotics and antimicrobial drugs can lead to resistant microorganisms and provide them with favorable conditions to emerge, spread, and persist.¹ According to the World Health Organization (WHO), a high percentage of hospital-acquired infections are caused by highly resistant bacteria and 440 000 new cases of multidrug-resistant tuberculosis emerge annually, causing at least 150 000 deaths.

In the European Union, about 25 000 patients die each year from infections caused by selected multidrug-resistant bacteria and the treatments cost associated with these infections is estimated at about 1.5 billion euros per year.^{6,7} In parallel, in the United States of America, infections with these pathogens cost an excess of 20 billion dollars (US\$) while the annual societal costs surpass US\$ 35 billion.^{6,8} Comparatively, for patients infected with resistant or susceptible organisms, the resistant ones were associated with higher treatment charges, longer hospital stays, and increased death rates.^{8,9} Without

effective last-line antibiotics, hospitals face the dilemma of not having any treatment options left.

In this context, the emergence of different antibiotic-resistant and multidrug-resistant pathogenic bacteria^{3,10} has boosted the development of new technologies and alternative materials to overcome this public health problem. $^{\rm 11-15}$ One of the possible strategies is based on the production of antimicrobial and antiadhesive surfaces.^{16,17} However, the resistance comes from the self-selection of the pathogens since the antibiotic or antimicrobial drug can inhibit susceptible bacteria and select to grow only the resistant ones.¹⁸ At the same time, commensal organisms are common reservoirs of antibiotic resistance plasmids. For example, Escherichia coli can serve as a carrier from which several antibiotic resistance genes can be transduced to other strains³ and *Staphylococcus epidermidis* can serve in the same way as a genetic source for the more pathogenic *Staphylococcus aureus.*¹⁹ Therefore, great efforts are needed in this area to overcome resistance-related problems, to

Received: December 2, 2013 Revised: March 21, 2014 Published: June 5, 2014



ACS Publications © 2014 American Chemical Society

7456

dx.doi.org/10.1021/la4046435 | Langmuir 2014, 30, 7456-7464

Artigo 2:

Rational design of antimicrobial nanoparticles to overcome bacterial resistance

Jessica Fernanda Affonso de Oliveira^{1,2}, Ângela Saito ^{3,4}, Ariadne Tuckmantel Bido^{1,2}, Jörg Kobarg^{4,5}, Hubert Karl Stassen⁶, Mateus Borba Cardoso^{1,2*}

¹ Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), CEP 13083-970, Caixa Postal 6192, Campinas, SP, Brazil.

² Instituto de Química (IQ), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CEP 13083-970, Caixa Postal 6154, Campinas, SP, Brazil.

³ Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), CEP 13083-970, Caixa Postal 6192, Campinas, SP, Brazil,

⁴ Departamento de Bioquímica-Programa de Pós-graduação em Biologia Funcional e Molecular, Instituto de Biologia (IB), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CEP 13083-970, Caixa Postal 6154, Campinas, SP, Brazil.

⁵ Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CEP 13083-970, Caixa Postal 6154, Campinas, SP, Brazil.

⁶ Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), CEP 91501-970, Caixa Postal 15003, Porto Alegre, RS, Brazil.

* Corresponding author (M.B.C.) E-mail: cardosomb@lnls.br Fax: +55 19 3512 1004 Tel: +55 19 3512 1045

Abstract

Tailored and rational synthesis of new materials and alternatives to prevent bacterial resistance is highly demanding due to the outbreak of infectious diseases and resistance to antibiotics. Herein, we present a system based on silver nanoparticles coated with mesoporous silica functionalized with ampicillin where high antimicrobial effects against susceptible and antibiotic-resistant *Escherichia coli* were observed. In addition, these structures did not induce apoptosis and different steps of the mitotic cell cycle (prophase, anaphase and metaphase) were clearly identified. The superior biological results can be attributed to an effective novel combination of molecular dynamics (MD) simulations and a tailored synthesis strategy. We suggest that MD can be used as a guide to predict nanoparticle functionalization in the rational design of antimicrobial nanoparticles.

Keywords: Antimicrobial nanoparticles; bacterial resistance; surface functionalization; mitotic cell cycle; molecular dynamics

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado/tese de Doutorado intitulada "Estudos funcionais da proteína reguladora Ki-1/57 em células e camundongos":

☐ não se enquadra no § 4º do Artigo 1º da Informação CCPG 002/13, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões): CIBio e CEUA

CIBio – Comissão Interna de Biossegurança, projeto No. JK 4.2.1, Instituição: CIBio/CNPEM.

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais, projeto No. 2661-1, Instituição: CEUA/UNICAMP.

CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No.

* Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.

Assinatura: Nome do(a) aluno(a): Ângela Saito Assinatura: Nome do(a) orientador(a) Dr. Jörg Kobai

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente hvine (X) Deferido () Indeferido

Rdz. Dn. HULM CONTINO PRANCO DE CUIVER Carimbo e assinatura CIBio/IB-UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente: (X) Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud Presidente CEUA/UNICAMP




CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "<u>Estudos funcionais da proteína reguladora Ki-1/57 em</u> <u>celulas e camundongos</u>", protocolo nº <u>2661-1</u>, sob a responsabilidade de <u>Prof. Dr. Jorg Kobarg /</u> <u>Ângela Saito</u>, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica ou ensino, encontra-se de acordo com os preceitos da LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais e do DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal - CONCEA, e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em <u>09 de abril de 2012</u>.

Vigência do projeto: <u>02/2011-01/2015</u> Espécie/Linhagem: <u>Camundongo isogênico / C57BL/6</u> No. de animais: <u>48</u> Peso/Idade: <u>06 semanas / 25gr</u> Sexo: <u>24 machos e 24 fêmeas</u> Origem: <u>LNBio</u>

Vigência do projeto: <u>02/2011-01/2015</u> Espécie/Linhagem: <u>Camundongo heterogênico / Swiss</u> No. de animais: <u>18</u> Peso/Idade: <u>06 semanas / 25gr</u> Sexo: <u>09 machos e 09 fêmeas</u> Origem: <u>LNBio</u>

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio.

Campinas, 17 de junho de 2015.

linde

Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud Presidente

Fátima Alonso

Secretaria Executiva



Campinas, 24 de Junho de 2015

Para Programa de pós-graduação

Assunto aprovação de projeto na CIBio - CNPEM

Prezado coordenador, declaramos para os devidos fins que Ângela Saito, teve seu projeto analisado e aprovado pela CIBio do CNPEM em 16/12/2010, protocolo JK 4.2.1. O Título originalmente submetido foi "<u>Caracterização funcional da proteína humana</u> reguladora Ki-1/57: estudos celulares e em modelo *in vivo*", sob orientação de Jörg Kobarg, PhD. Este projeto rendeu resultados que foram utilizados para o desenvolvimento da tese, intitulada "<u>Estudos funcionais da proteína reguladora Ki-1/57 em células e camundongos</u>". Outrossim, informamos que os trabalhos contidos na sua tese estão contemplados no projeto aprovado pela CIBio.

Atenciosamente,

Ângela Šáito Doutoranda em Biologia Molecular e Funcional IB – UNICAMP

Jörg Kobarg, PhD Orientador, Depto. de Bioquímica e Biologia Tecidual IB- UNICAMP

Marcio Chaim Bajgelman, PhD Presidente da CIBio - CNPEM

CNPEM é uma Organização Social qualificada pelo Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) Campus: Rua Giuseppe Máximo Scolfaro, 10.000 - Polo II de Alta Tecnologia - Caixa Postal 6192 - 13083-970 - Campinas/SP Fone: +55.19.3512.1010 | Fax: +55.19.3512.1004 | www.cnpem.br