

Universidade de Lisboa  
Faculdade de Ciências  
Departamento de Biologia Vegetal



Efeito do oncogene BRAF e da GTPase Rac1b sobre a expressão  
de genes envolvidos no estado de senescência de células do  
cólon humano

Andreia Filipa Almeida Henriques

Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia

2011

Universidade de Lisboa  
Faculdade de Ciências  
Departamento de Biologia Vegetal



Efeito do oncogene BRAF e da GTPase Rac1b sobre a expressão  
de genes envolvidos no estado de senescência de células do  
cólon humano

Dissertação de Mestrado orientada pelo Doutor Peter Jordan (INSA) e co-orientada  
pelo Doutor Rui Gomes (DBV-FCUL)

O trabalho aqui descrito foi realizado no Laboratório de Oncobiologia do  
Departamento de Genética do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa.

Andreia Filipa Almeida Henriques

Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia

2011

## Agradecimentos

Este trabalho final representa mais uma etapa da minha vida em que contei com o apoio de várias pessoas e entidades que não poderia deixar de referir de forma a expressar a minha gratidão.

Em primeiro lugar, quero agradecer ao Doutor Peter Jordan pela fantástica oportunidade que me deu. Foi ótimo aprender tantas coisas com o excelente grupo que reuniu. Agradeço ainda pela disponibilidade, pelo apoio e pela forma como orientou esta tese transmitindo sempre confiança.

Ao Doutor Paulo Matos quero agradecer pela forma como me ensinou, pela paciência que teve para o fazer e pelo sorriso que mostrou sempre que lhe fui fazer mais uma perguntinha. Agradeço ainda por todo o trabalho que teve para me ajudar com os dados deste trabalho e pela revisão que fez nesta tese.

Agradeço às meninas do Laboratório de Oncobiologia – Sónia Moniz, Vânia Gonçalves e Patrícia Barros – pela forma como me mostraram e ensinaram tudo o que foi sendo necessário, pela simpatia como que me trataram desde o primeiro momento e pelo apoio que sempre me deram.

Em suma, não tenho forma de mostrar a minha gratidão a todos os referidos até aqui, a não ser dizendo que foi uma honra e que me considero uma sortuda. Muito obrigada.

Ao Doutor Rui Gomes agradeço ter aceite a co-orientação deste trabalho dando a sua opinião e pela revisão que fez desta tese.

Quero ainda manifestar o meu agradecimento ao Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa na pessoa do director, Doutor José Pereira Miguel e ao Departamento de Genética por terem aceite a realização deste trabalho.

A Faculdade foi uma altura de extremas mudanças em que os amigos tomaram um papel principal. Assim sendo não podia deixar de referir o meu obrigado aqueles que me acompanharam nestes últimos anos, Obrigada Bota, Bia, Joana, Mário, Maria, Ana Miguel, Ana Maria, Breatriz e André por tudo o que aturaram e por me terem permitido viver os melhores momentos convosco.

Finalmente os mais importantes, aos meus pais, José e Maria, ao meu irmão, Pedro e à minha avó, Delfina obrigada pelo esforço que fizeram para me deixar chegar aqui, pelo apoio incondicional que me deram e pela forma como me educaram mostrando que vale sempre a pena tentar.

## Resumo

O cancro colo-rectal é uma das principais causas de morte no mundo ocidental. Trata-se de uma doença heterogénea com diferentes vias de desenvolvimento, uma das quais é a Via Serreada caracterizada pela ocorrência de mutações no gene *BRAF* nomeadamente a mutação *BRAF V600E*. No entanto ensaios feitos com a mutação *BRAF V600E* mostraram que esta não é suficiente para induzir a transformação maligna e provoca em vários tipos celulares *Oncogene Induced Senescence* – OIS.

O facto de ter sido encontrada sobre expressão de *Rac1b* em amostras de tumores e ter sido demonstrada uma cooperação entre *BRAF-V600E* e *Rac1b* para a sobrevivência celular em células HT29 sugeriu esta GTPase como interveniente na transformação maligna quando a mutação *BRAF V600E* está presente.

Estudos preliminares sugeriram então a hipótese de haver comunicação celular por via de citocinas, nomeadamente, *PDGF-BB* e *IL-8* entre a célula tumoral e células do estroma durante o processo de progressão tumoral envolvendo a expressão do receptor *CXCR4*.

Foi então criado um novo modelo celular de células normais de cólon, NCM460, transformadas com o sistema indutível (*ProteoTuner* – Clontech) para estudar os efeitos da expressão de *Rac1b* e *BRAF-V600E*. Os níveis de expressão dos inibidores de proliferação  $p14^{ARF}$  e  $p15^{INK4b}$  aumentaram nas células NCM460 transfectadas com *pPTuner BRAF-V600E* indicando indução de OIS. Já a expressão de *Rac1b* apresenta efeito antagónico, inibindo a expressão de marcadores de senescência e ainda um aumento da expressão de *IL-8*.

Sendo o *IL-8* um estímulo para a produção de *SDF1* pelo estroma o efeito da activação do receptor de *SDF1*, o *CXCR4*, na expressão de *Rac1b* foi mimetizado pela sua sobre-expressão nas NCM460. Os resultados sugerem que *CXCR4* provoca um aumento da expressão de *Rac1b* para níveis semelhantes aos encontrados em células tumorais.

Os resultados deste trabalho sustentam o modelo de OIS induzido pela mutação *BRAF-V600E* numa célula de cólon normal e que *Rac1b* tem um efeito contrário. Posteriormente, por um processo que ainda é necessário definir ocorre na célula aumento da expressão de *Rac1b* criando um ciclo de retro alimentação entre a célula tumoral e as células envolventes do estroma pelo eixo *IL-8- SDF-1- CXCR4* que sustenta a expressão de *Rac1b* e conduz a progressão tumoral.

Palavras-chave: cancro colo-rectal; senescência celular; desenvolvimento tumoral; *BRAF-V600E*; *Rac1b*; comunicação celular

## **Abstract**

Colorectal cancer (CRC) represents one of the leading causes of cancer mortality in the Western world. It is a heterogenous disease that can evolve through different pathways, one of them called the serrated polyp pathway. Serrated tumors follow a neoplastic pathway that does not involve mutations in *KRAS* but is characterized by mutations in *BRAF* oncogene. However, in cell transformation assays the most frequent *BRAF* mutation B-Raf-V600E exhibited a much lower transforming activity than oncogenic Ras. In fact, B-Raf-V600E leads to oncogene-induced senescence (OIS) linked to increased expression of cell cycle inhibitors in several cell types.

The recent discovery that B-Raf-V600E and hyperactive Rac1b functionally cooperate in tumour cell survival led to the hypothesis that tumours are initiated by a B-Raf-V600E mutation but later require overexpression of Rac1b to overcome senescence and allow further tumour progression. Preliminary data suggested that Rac1b overexpression may involve cellular communication between cancer and stroma cells and involve the cytokines PDGF-BB and IL-8 and the receptor CXCR4.

A new cellular model was established with normal colon cells, NCM460, transformed with the inducible system (ProteoTuner - Clontech) to study the effect of Rac1b and BRAF-V600E expression. The expression levels of cell cycle inhibitors p14<sup>ARF</sup> and p15<sup>INK4b</sup> decreased upon expression of BRAF-V600E, compatible with induction of OIS. In contrast, Rac1b expression inhibited expression of these senescence markers while increasing IL-8 expression.

Because IL-8 is known to stimulate stromal fibroblast to secrete SDF-1, overexpression of the SDF1 receptor CXCR4 was used as a way to mimic its activation in NCM460 cells. Under these conditions, Rac1b expression increased to levels similar to those found in tumor cells.

The results of this study support a model in which a BRAF-V600E mutation in normal colon cell promotes OIS which is counteracted by Rac1b. How Rac1b overexpression is promoted remains undefined but it could create a positive feedback cycle by increasing IL8 secretion to stimulate SDF1 production by surrounding stromal cells which leads to CXCR4 activation and sustained Rac1b expression in tumor cells required for tumor progression.

Keywords: colorectal cancer; cellular senescence; tumor development; B-Raf-V600E; Rac1b; cellular communication

## Lista de Abreviaturas

Amp	Ampicilina
APC	Adenomatous polyposis coli
BAP	<i>Bacterial Alkaline Phosphatase</i>
cDNA	DNA complementar
CIMP	<i>CpG island methylator phenotype</i>
cm <sup>2</sup>	Centímetro quadrado
CRC	Cancro colorectal
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4
DMSO	dimetil sulfoxido
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleótido
ECL	Reacção enzimática quimiluminescente ( <i>Enhanced Chemiluminescence</i> )
EDTA	Tetra-acetato de etileno diamina
ERK	<i>Extracellular Signal-Regulated kinases</i>
FBS	Soro fetal bovino ( <i>Fetal Bovine Serum</i> )
g	Gramma
GAP	<i>GTPase Activating Protein</i>
GDI	<i>Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitor</i>
GDP	Guanosina difosfato
GTP	Guanosina trifosfato
GEF	<i>Guanine Nucleotide Exchange Factor</i>
IL-8	Interleucina 8
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinase</i>
Kan	Canamicina
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LB	Luria Broth (Meio de cultura)
LF2K	<i>Lipofectamine</i> <sup>TM</sup> 2000
mA	Miliampere
mM	Milimolar
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mRNA	RNA mensageiro
MMR	Mismatch repair
MSI	Instabilidade ao nível do DNA microsatélite
ng	Nanograma
nt	Nucleótido
nm	Nanómetro
OIS	<i>Oncogene Induced Senescence</i>
PAGE	Electroforese em gel de poliácridamida ( <i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> )
PAK	<i>p21-Activated Kinase</i>
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDGF-BB	<i>Platelet-Derived Growth Factor BB</i>

*Efeito do oncogene BRAF e da GTPase Rac1b sobre a expressão de genes envolvidos no estado de senescência de células do cólon humano*

PDGFR	<i>Platelet-Derived Growth Factor Receptor</i>
PVDF	Bifluoreto de polivinilideno
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies Reactivas de Oxigéneo
RT-PCR	<i>Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction</i>
rpm	Rotações por minuto
SB	<i>Laemmli sample buffer</i>
SDS	Dodecilsulfato de sódio ( <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> )
SDF-1	<i>Stromal Cell-Derived Factor-1</i>
sTNFRII	<i>anti-inflammatory soluble TNF receptor II</i>
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TE	Tampão tris-EDTA
V	Volt
v/v	Volume por volume
U	Unidade
X-Gal	Substrato cromogénico para a $\beta$ -galactosidase
wt	Fenótipo selvagem
w/v	Peso por volume
$\mu$ g	Micrograma
$\mu$ l	Microlitro
°C	Grau Celcius

## Índice

<b>1 Introdução</b>	1
1.1 O cancro colo-rectal	1
1.2 O oncogene <i>BRAF</i> e o mutante BRaf-V600E	1
1.3 OIS - <i>oncogene induced senescence</i>	2
1.3 As GTPases Rac1 e Rac1b	2
1.4 Experiências preliminares	4
1.5 Modelo de Trabalho	6
<b>2 Objectivos</b>	6
<b>3 Material e Métodos</b>	7
3.1 RT-PCR	7
3.2 Metodologias de Clonagem	8
3.3 Cultura de células	10
3.4 Transfecção de células	12
3.5 RNA de interferencia	13
3.6 Selecção da linha estável; protocolo diluição limite.	13
3.7 Lise Celular	14
3.7.1 <i>SDS-PAGE e Western blot</i>	15
<b>4 Resultados</b>	16
<b>5 Discussão e Conclusões</b>	25
<b>6 Referências Bibliográficas</b>	30
<b>Anexo I</b>	33
<b>Anexo II</b>	35

## **1 Introdução**

### 1.1 O cancro colo-rectal

O cancro colo-rectal (CRC) é uma das principais causas de mortalidade no mundo ocidental e a sua evolução pode ocorrer por várias vias (Jass, 2007). Na maioria dos casos ocorre em indivíduos sem antecedentes familiares, apresenta-se numa forma inicial de adenoma (tumor glandular benigno) passando depois para carcinoma (tumor que tende a invadir tecidos adjacentes originando metástases) envolvendo mutações somáticas no gene supressor de tumores *APC* e no oncogene *KRAS*. Para além destes, foi descoberta uma outra via de formação destes tumores designados de neoplasias serreadas que evoluem a partir de pólipos (Hawkins *et al.*, 2002). Estes apresentam um alto nível de MSI (instabilidade ao nível do DNA microsatélite) resultado da inactivação do gene MMR (*mismatch repair*) *MLH1*. A maioria destes tumores ocorre no cólon proximal e é acompanhada de um fenótipo de hipermetilação global das ilhas CpG (CIMP, este pode incluir a metilação do gene *MLH1*) e mutações oncogénicas no gene *BRAF* (Snover *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2007)

### 1.2 O oncogene BRAF e o mutante BRaf-V600E

*BRAF* codifica para uma proteína serina/treonina-cinase que faz parte da via de sinalização Ras/Raf/MEK/ERK. Esta via regula o crescimento, sobrevivência e diferenciação celulares e pode ser activada por diversos receptores membranares incluindo receptores de tirosina cinases ou receptores acoplados à proteína G (Wellbrock *et al.*, 2004). A estimulação destes receptores leva a activação da GTPase Ras que por sua vez activa uma das cinases da família RAF entre os quais a B-Raf. As cinases RAF continuam depois a cascata de activação, activando MEK1/2 que depois activam ERK1/2. As proteínas ERK activadas podem de seguida fosforilar as suas proteínas alvo no citoplasma ou fazer translocação para o núcleo onde os seus alvos são factores de transcrição que regulam a expressão de genes envolvidos na proliferação, diferenciação e a sobrevivência celular (Kolch, 2005; Wellbrock *et al.*, 2004).

Existem variadas mutações oncogénicas no gene *BRAF* (NM\_004333.2), a mais frequente é B-Raf-V600E que consiste na substituição do aminoácido valina por um ácido glutâmico, na posição 600, situada no *loop* de activação do domínio catalítico da cinase. Trata-se de uma alteração *missense* causada por uma mutação pontual neste codão que provoca uma activação da cinase independente de Ras, com consequente activação da via de sinalização a jusante, estando presente sobretudo em cancros da pele, da tiróide e do cólon (Davies *et al.*, 2002; Michaloglou *et al.*, 2008).

Apesar de em vários tipos de cancro a presença de mutações em *BRAF* ou *RAS* serem mutuamente exclusivas, ensaios de transformação celular demonstraram que a mutação B-Raf-V600E não era suficiente para substituir o potencial oncogénico do mutante K-Ras (Davies *et al.*, 2002), indicando a existência de outras alterações genéticas associadas. Outros estudos mostraram ainda que a expressão do B-Raf-V600E em melanocitos (Dhomen *et al.*, 2009; Goel *et al.*, 2009) ou em modelos de ratinho para o estudo de melanoma (Pritchard *et al.*, 2007), de cancro do pulmão (Dankort *et al.*,

2007) ou do tracto intestinal (Carragher et al., 2010) induz o fenótipo de senescência induzida por oncogene (OIS – *oncogene induced senescence*).

### 1.3 OIS – oncogene induced senescence

A OIS é um processo agudo de resposta a stress em que a célula perante a exposição contínua a um oncogene activado cessa o processo de proliferação aumentando a expressão de inibidores do ciclo celular do locus p16<sup>INK4a</sup>/p14<sup>ARF</sup>/p15<sup>INK4b</sup> (Kim e Sharpless, 2006; Prieur e Peeper, 2008; Collado e Serrano 2006). De facto, estas três proteínas são importantes supressores de tumor, sendo que p15 e p16 actuam como inibidores homólogos das cinases dependentes de ciclinas CDK4 e CDK6, enquanto p14 actua na via do p53, inibindo a proteína MDM2 o que leva à estabilização de p53 em resposta à proliferação celular desregulada (Kim e Sharpless, 2006).

Recentes estudos em várias amostras de tumores colo-rectais mostraram que a expressão de proteínas deste locus génico induz a inibição do crescimento confirmando a existência de OIS em tumores da via serreada com mutações em *BRAF* (Collado e Serrano 2006; Prieur e Peeper, 2008; Kriegl et al.2011).

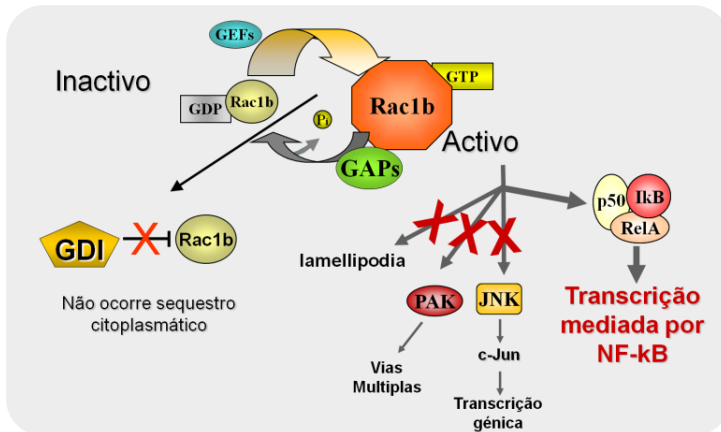
Tornou-se então importante perceber de que forma as células ultrapassam a OIS provocada pelo oncogene B-Raf-V600E para que ocorresse a sua transformação maligna. Estudos anteriores do laboratório de acolhimento mostraram que cerca de 80% dos tumores colo-rectais com a mutação B-Raf-V600E apresentavam também sobre expressão da GTPase Rac1b (Matos P. et al., 2008).

### 1.4 As GTPases Rac1 e Rac1b

A GTPase Rac 1 é membro da família das Rho GTPases de massa molecular reduzida (Wennerberg & Der, 2004) e iniciando vias de sinalização controla a formação de filamentos de actina e activação transcricional de vários genes (Manser et al., 1994; Miki et al., 2000 e Eden et al., 2002). É possível ter esta proteína sob duas formas, a forma inactiva em que se encontra ligada ao GDP (Guanosina difosfato) e uma forma activa ligada ao GTP (Guanosina trifosfato) (Jaffe e Hall, 2005). O estado de activação é controlado junto à membrana plasmática por três mecanismos que interagem entre si. Em primeiro lugar temos os GEFs (factores de troca do nucleótido guanina) que promovem a troca de GDP por GTP, activando a GTPase; em segundo lugar as GAPs (proteínas activadoras de GTPase) que aceleram a hidrólise do GTP e inactivam a proteína; por fim os GDIs (inibidores da dissociação do nucleótido guanina) removem a GTPase da membrana para o citosol e impedem a troca de GDP para GTP, mantendo a GTPase inactiva (Dovas e Couchman, 2005).

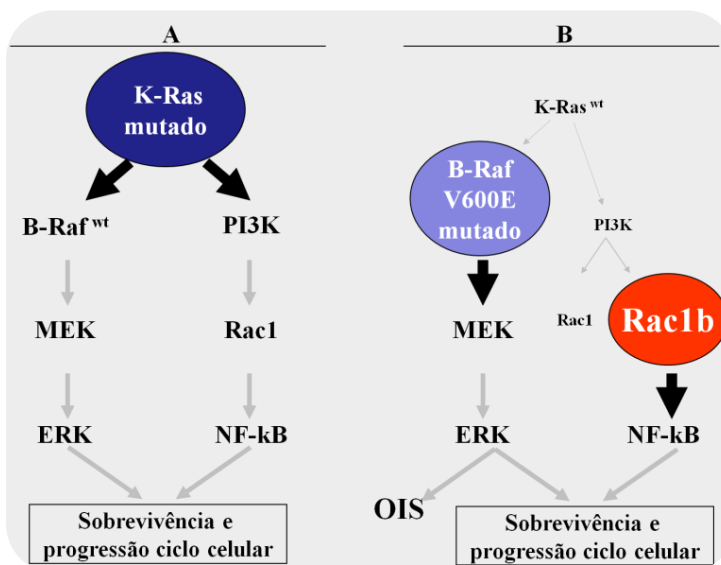
A análise de tumores colo-rectais por RT-PCR permitiu identificar uma variante desta GTPase, o Rac1b. (Jordan et al., 1999). O Rac1b provém do processamento alternativo durante o *splicing* do mRNA do gene *RAC1* com a inclusão de um exão 3b que normalmente não é traduzido. Este exão corresponde a um aumento de 57 nucleótidos que codificam para 19 aminoácidos entre os codões 75 e 76 imediatamente a seguir à região reguladora *Switch II* (Matos et al., 2000). A adição do exão 3b influencia a regulação da GTPase Rac1b pois embora a proteína seja expressa a baixos níveis

ela encontra-se predominantemente na forma activa ligada ao GTP. Isto acontece porque o *Rac1b* não interage com o Rho-GDI o que faz com que permaneça sempre junto à membrana onde pode ser activada pelas GEFs (Matos *et al.*, 2003). O processamento alternativo também altera as propriedades de sinalização a jusante de *Rac1b*, devido a uma interacção ineficaz com vários efectores de vias de sinalização clássicas de *Rac1* (Matos *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2004).



**Figura 1: Esquema representativo das principais características da GTPase *Rac1b*.** As propriedades mais relevantes são uma taxa maior de troca de GDP e a não interacção com Rho-GDI que permitem maior actividade e resultam na activação da via clássica do factor de transcrição NF-κB. (Adaptado de Jordan *et al.*, 2006)

A título de exemplo, *Rac1b* activo não induz a formação de lamellipodia, a activação da cinase PAK ou a estimulação das vias de transdução de sinal de JNK e p38 (Matos *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2004; Matos e Jordan, 2006). No entanto, estimula, em fibroblastos e células colo-rectais, a via clássica do factor de transcrição NF-κB, através da produção de ROS, aumentando a progressão do ciclo celular, pela estimulação da expressão de ciclina D1, e também a sobrevivência celular, por inibição da apoptose (Matos e Jordan, 2005; Matos e Jordan, 2006). As principais características da GTPase *Rac1b* são resumidas na Figura 1.



**Figura 2: Modelo de duas vias genéticas alternativas que estimulam a sobrevivência e progressão das células tumorais.** (A) Em tumores colorectais com mutações oncogénicas no gene *KRAS*, há estimulação da via MEK/ERK e de NF-κB via PI3K e *Rac1*. (B) No caso das mutações em *BRAF* apenas ocorre estimulação de MEK/ERK e não de PI3K pois trata-se de uma mutação a jusante de *KRAS* e não possibilita a activação de *Rac1*. Neste caso para que surja o estímulo de sobrevivência via NF-κB é necessária a sobre expressão de *Rac1b*

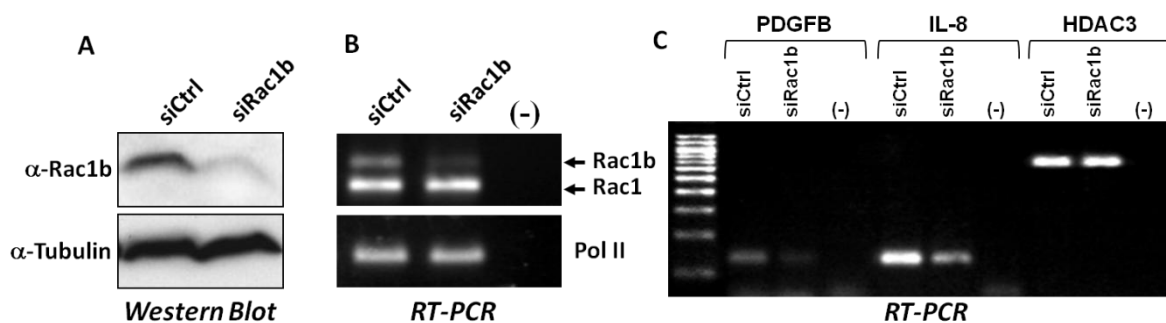
O laboratório de acolhimento demonstrou em estudos anteriores que, em células tumorais como a linha celular HT29, existe uma cooperação entre B-Raf-V600E e a GTPase Rac1b para manter a sobrevivência destas células, sugerindo uma nova via de progressão tumoral (Matos P. *et al.*, 2008; Seruca *et al.*, 2009). Nesta via os tumores são iniciados pela mutação B-Raf-V600E mas, mais tarde, necessitam da sobre expressão de Rac1b para progredir no desenvolvimento tumoral (Figura 2). Foi colocada a hipótese de que as propriedades do Rac1b são seleccionadas para ultrapassar a *OIS* provocada pelo oncogene B-Raf-V600E, levando à progressão tumoral.

### 1.5 Experiências preliminares

Tornou-se então importante, para o laboratório de acolhimento, abordar o mecanismo responsável pelo aumento de expressão de Rac1b que permite aos tumores ultrapassar o estado de *OIS* induzida por BRAf-V600E. De forma a verificar que tipo de sinais podiam intervir no aumento da expressão de Rac1b foram implantadas em ratinhos atímicos, células da linha HT29, que sobre expressam Rac1b. Estas células formaram tumores *in vivo* nos quais foram analisados os níveis de expressão de Rac1b. Verificou-se que nos tumores formados, a expressão da GTPase Rac1b era cerca de 2,3 vezes maior do que os valores analisados nas células mantidas em cultura. Estes dados indicavam que a sobre expressão de Rac1b pode ser desencadeada por sinais provenientes da interacção entre as células tumorais e as células do estroma.

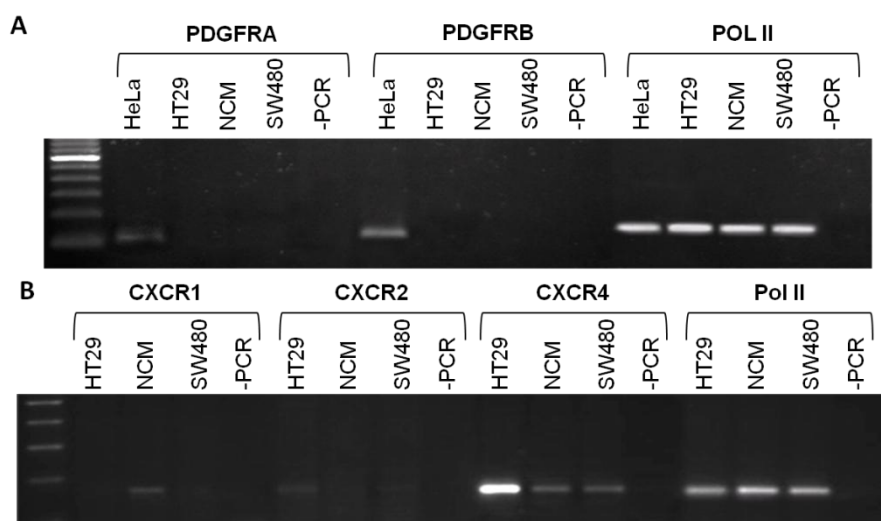
Como é já conhecida a interacção entre as células transformadas e o estroma que as rodeia através de sinalização por citocinas (Joyce e Pollard, 2009) foi usado um *array* de anticorpos (Raybiotech) de forma a comparar sobrenadantes da cultura celular da linha HT29 (que sobre expressam Rac1b) e de uma linha celular de cólon normal, NCM460 (com baixos níveis de expressão de Rac1b tal como acontece na mucosa normal). A análise dos valores de expressão de várias citocinas revelou que as células HT29 tem níveis de secreção de IL-8 (Interleucina 8) três vezes mais altos que as NCM460 ao mesmo tempo que apresentam expressão de PDGF-BB (*Platelet-Derived Growth Factor BB*) cinco vezes superior às células normais. A análise revelou também que as células HT29 produzem cerca de dez vezes menos da forma inibitória, solúvel do receptor do TNF-alfa (sTNFR<sub>II</sub> - *anti-inflammatory soluble TNF receptor II*) que as células NCM460.

De forma a testar a hipótese do aumento dos níveis de expressão de IL-8 e PDGF-BB ser resultado da actividade de Rac1b foi feita inibição da expressão desta GTPase em células HT29 através de RNA de interferência. Os resultados mostraram uma diminuição considerável da expressão de ambas as citocinas (Figura 3).



**Figura 3: Análise do efeito da inibição da GTPase Rac1b por siRNA na expressão das citocinas IL8 e PDGF-BB em células tumorais da linha HT29.** (A) Western Blot com anti-Rac1b para confirmação do efeito do siRac1b acompanhado de um controlo de carregamento da amostra anti-tubulina. (B) RT-PCR com primers que amplificam os transcritos Rac1 e Rac1b para confirmar o efeito específico do siRac1b. A amplificação da RNA polimerase II serviu como controlo de carregamento da amostra. (C) RT-PCR com primers específicos para as citocinas PDGF-BB e IL-8 e ainda da HDAC3 como controlo de carregamento da amostra.

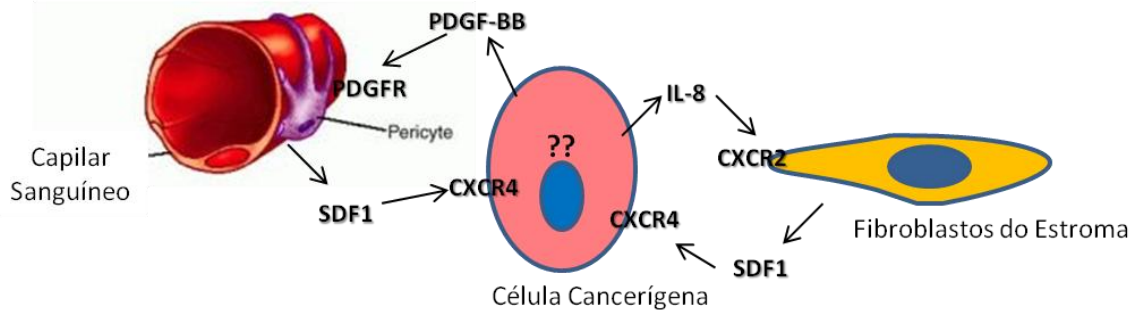
Como a secreção de IL-8 e PDGF-BB poderia ter uma acção de sinalização autócrina, foi estudada a expressão dos receptores correspondentes em várias linhas de células de cólon, HT29, NCM460 e SW480 (Figura 4). Os receptores para a citocina PDGF-BB são PDGFRA e PDGFRB e a sua expressão não foi detectada nas linhas células de cólon estudadas. No caso da citocina IL-8 existem os receptores CXCR1 e CXCR2 cuja expressão é baixa em todas as linhas estudadas. Estes resultados sugerem que IL-8 e PDGF-BB não promovem sinalização autócrina nas células estudadas, mas antes actuam de forma parácrina. Neste sentido, foi encontrada nas células HT29, que sobre expressam Rac1b, forte expressão de CXCR4 (NM\_003467.2), um receptor homólogo de CXCR1 e 2 específico para SDF-1 (*stromal cell-derived factor-1*) também designado, CXCL12 (Zlotnik e Yoshie, 2000).



**Figura 4: Análise da expressão de receptores de citocinas em linhas de cólon: HT29, NCM460 e SW480.** (A) RT-PCR com amostras de cDNA de 3 linhas de colón com primers específicos para os receptores do factor de crescimento PDGF-BB, PDGFRA e PDGFRB. O cDNA da linha HeLa foi usado como controlo positivo de PCR. (B) RT-PCR com amostras de cDNA das 3 linhas de colón com primers específicos para os receptores da citocina IL-8, CXCR1 e CXCR2 e também do receptor homologo CXCR4.. A Polimerase II foi usada como controlo de carregamento das amostras estudadas.

## 1.6 Modelo de Trabalho

Os trabalhos preliminares elaborados no laboratório de acolhimento e referidos anteriormente sugerem um modelo de comunicação entre as células tumorais e o estroma que as rodeia durante a génese tumoral. Este modelo baseia-se na produção de SDF-1 pelas células que envolvem a célula cancerígena, apoiada por publicações anteriores. A produção de SDF-1 pode ser induzida por duas vias, tal como descrito na Figura 5. Numa das vias a célula tumoral produz a citocina IL-8 que vai actuar sobre os receptores respectivos em fibroblastos do estroma (Matsuo *et al.*, 2009). A outra via implica a produção de PDGF-BB pela célula tumoral que actua sobre células endoteliais (Song *et al.*, 2009). Em ambas as vias as células do estroma respondem com a produção de SDF-1 que vai promover a sobrevivência das células epiteliais (Matsuo *et al.*, 2009).



**Figura 5: Modelo da comunicação celular durante a génese tumoral.** A produção de IL-8 e PDGF-BB pela célula tumoral induz a expressão de SDF-1 em fibroblastos e células endoteliais do estroma, respectivamente. Esta citocina poderá estimular os receptores CXCR4 na célula tumoral e induzir a sobre-expressão de Rac1b, o que por sua vez origina um ciclo de retro alimentação positiva que induz a sobrevivência de células tumorais.

## 2 Objectivos do Trabalho

O objectivo deste trabalho prático, foi criar um novo modelo de células colo-rectais para estudar o papel da GTPase Rac1b e do Oncogene BRaf-V600E na senescência celular e na expressão de IL8, PDGF-BB e do receptor CXCR4, envolvidos na comunicação com as células do estroma.

### 3 Material e Métodos

#### 3.1 RT-PCR

A técnica de *Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction* permite analisar de forma semi-quantitativa os níveis de expressão do RNA mensageiro de determinado gene. Depois da extração do RNA e da sua transcrição reversa obtém-se moléculas de DNA complementar (cDNA). Estas podem depois ser amplificadas num PCR otimizado com *primers* específicos para o mRNA de interesse de forma a obter informação dos níveis de expressão relativos (Abbas & Lichtman, 2003).

O RNA total das linhas celulares foi extraído com o *kit RNAeasy* (Qiagen) e foi sintetizado cDNA a partir de 1 µg de RNA para cada uma das amostras em estudo usando *Random primers* (Invitrogen) e *Ready-To-Go You-Prime beads* (GE Healthcare).

Para amplificar as sequências correspondentes aos mRNA da GTPase Rac1b, dos factores de senescência – P14, P15 e P16 –, das citocinas – Il8 e PDGFB – bem como do receptor – CXCR4 – desenham-se pares de *primers* específicos para cada um dos transcritos (Anexo I Tabela I) considerando as sequências codificantes humanas. Estes foram usados nos cDNAs de uma linha celular de carcinoma do cólon, HT29 e numa linha celular normal de mucosa epitelial de cólon NCM460. Pontualmente foram usados cDNAs de outras linhas celulares como controlos positivos de PCR como SW480 (carcinoma do cólon) e CFBE (epitélio brônquico não transformado) e HeLa (carcinoma do colo do útero).

A amplificação de cada fragmento dos vários genes em estudo foi efectuada em paralelo com a amplificação de um gene de controlo de expressão ubiquitária que permite monitorizar variações na quantidade de RNA das várias amostras inicialmente usada para sintetizar o cDNA, bem como variações no processo de síntese que podem levar a diferentes rendimentos na reacção de síntese. Assim, efectuou-se uma mistura de reacção de PCR para o total das reacções (cada uma das linhas celulares e respectivas condições e tratamentos, bem como os controlos negativo (sem cDNA) e positivo (quando necessário, i.e., um cDNA em que a expressão do transcrito foi anteriormente confirmada), com um volume final de 25 µl, para cada. Cada mistura de reacção continha, por amostra, 0,2 µM de cada um dos *primers* específicos, 20 µl de Tampão B 1x (composição no Anexo II) e 0,03 U de *AmpliTaq® DNA Polymerase* (Applied Biosystems – [www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)). Em seguida foi adicionado a cada uma das reacções, com excepção das que desempenhavam função de controlo negativo de PCR, o cDNA da linha celular respectiva, nas quantidades optimizadas para cada um dos transcritos. Depois de homogeneizadas, as amostras foram colocadas em termocicladores (Whatman Biometra®, [www.biometra.de](http://www.biometra.de)) e amplificadas segundo os programas de PCR respectivos (Anexo I Tabela II).

Posteriormente, os produtos de PCR foram separados por electroforese, em tampão Tris-Borato-EDTA 1x (TBE – composição no Anexo II), utilizando géis de agarose (Cambrex, [www.cambrex.com](http://www.cambrex.com)) de 2% de concentração, corados com brometo de etídio (0,4 µg/ml). Os géis

foram sujeitos a uma diferença de potencial de 80 V durante 30-60 min e em seguida foram analisados e fotografados no aparelho EagleEye™ II (Stratagene, www.stratagene.com).

### 3.2 Metodologias de Clonagem

A técnica de clonagem abarca vários protocolos experimentais e tem como objectivo a transferência de um fragmento de DNA a ser clonado (*insert*), vindo de um organismo dador ou de uma amplificação por PCR, para moléculas de DNA plasmídeo (designado vector quando incorpora também promotores e outras sequências genicas necessárias à expressão dos *inserts* em células eucariotas) com capacidade de auto-replicação quando introduzidos em bactérias competentes. Os plasmídeos são isolados, hidrolisados enzimaticamente por endonucleases com especificidade para sequências de DNA apropriadas, sendo depois misturados com o fragmento *insert* (processado pela acção dos mesmos enzimas) e sujeitas a um processo de ligação, por acção do enzima DNA ligase. Assim formam-se moléculas de DNA recombinante, designadas de construções. Estas são depois usadas num processo designado de transformação, que consiste em introduzir o DNA recombinante em células procarióticas hospedeiras e promover o seu crescimento de um modo selectivo. Para que a selecção ocorra é adicionado ao meio de crescimento um antibiótico cujo gene de resistência se encontra também codificado algures na sequência do plasmídeo. Desta forma garante-se que as colónias formadas são aquelas que incorporaram uma construção, que pode ter o *insert* ou não, sendo depois, necessário sujeitá-las a procedimentos adicionais de rastreio e selecção (Purves *et al.*, 1998; Griffiths *et al.*, 2000; Glick e Pasternak, 2003).

A análise da existência de colónias positivas (i.e., colónias que integraram plasmídeos com os fragmentos desejados) foi feita por PCR (*screening*), cujo programa e *primers* utilizados se encontram descritos nas tabelas 1 e 2. As colónias positivas foram inoculadas em LB líquido com o antibiótico de resistência do plasmídeo utilizado (Amp; Kan) e colocadas, em cultura, a 37°C com 220 rpm, cerca de 16 h. Posteriormente, o plasmídeo recombinante foi isolado de culturas de 5 ml dos clones positivos, purificado (*QIAprep Spin Miniprep Kit*). De forma a definir exactamente a sequência obtida procedeu-se à sequenciação através de reacções cíclicas de amplificação linear (em 25 ciclos a 96°C 10 s, 5 s a uma temperatura óptima para o emparelhamento do *primer* e 4 min a 60°C, com uma desnaturação inicial de 30 s a 96°C) com o *BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, www.appliedbiosystems.com) e os *primers* identificados nas tabelas 1 e 2 tendo a análise sido realizada no sequenciador automático *ABI Prism® 377*. Na etapa de sub-clonagem visou-se transferir os cDNAs da GTPase Rac1b e do Oncogene BRAF-VE para o vector de expressão indutível pPTuner (Clontech – www.clontech.com). No decorrer do trabalho foi também necessário clonar o cDNA do receptor CXCR4 no vector pEGFP-C2 (Clontech – www.clontech.com). Os cDNAs do Rac1b e BRAF-VE estavam já noutros vectores usados em trabalhos anteriores no laboratório de Oncobiologia. O cDNA do CXCR4 foi amplificado a partir de uma amostra do cDNA de células da linha HT29. No caso do cDNA de Rac1b a clonagem foi feita directamente recorrendo a endonucleases que permitiram

a transferência, em fase, da totalidade da sequência codificante. No caso do BRAF-VE e do CXCR4 teve que ser feita a re-amplificação do cDNA com *primers* modificados de forma a serem inseridas nas extremidades do *insert* sequências reconhecidas pelas endonucleases necessárias à sub-clonagem no novo vector, tendo-se ainda procedido a uma clonagem intermédia, para validação da estratégia, no sistema *TOPO TA Cloning® Kit* (sistema otimizado para a clonagem de produtos de PCR) como está descrito na tabela 1. Todos procedimentos efectuados para a obtenção das três construções, depois do passo intermédio para a obtenção das sequências de corte correctas, encontram-se esquematizados de forma resumida na tabela 2 e os primers usados estão descritos no Anexo I tabela III.

**Tabela 1:** Estratégia aplicada para sub-clonar as sequências codificantes dos transcritos BRAF-VE e CXCR4 no vector de clonagem pCR® 2.1-TOPO®. Inclui os *primers* utilizados na sequenciação dos constructos obtidos. Este foi o procedimento necessário para a posterior sub-clonagem dos cDNAs dos transcritos nos vectores de expressão finais.

ETAPAS	PLASMÍDEO	
	pEGFP-BRAF-VE	cDNA HT29
<b>Amplificação</b>	- DNA: 30 ng - <i>Primers</i> : BRAF-F e BRAF-R  - Polimerase <i>Pfu</i> ®-turbo Prog.: 94°C 10 min  94°C 1 min } 66°C 30 s } x 35 68°C 2 min } 72°C 5 min }	-cDNA: 30 ng - <i>Primers</i> : CXCR4 ECO-F e CXCR4 APA-R  - Polimerase <i>Pfu</i> ®-turbo Prog.: 94°C 5 min  94°C 1 min } 58°C 1 min } x 35 68°C 1 min e 30s } 72°C 5 min }
<b>Excisão e Purificação</b>	- Banda de peso ~2300 pb - JETQUICK <i>Gel Extraction Spin kit</i>	- Banda de peso ~1059 pb - JETQUICK <i>Gel Extraction Spin kit</i>
<b>Adição dATP</b>	<i>Taq DNA Polymerase</i> – 10min a 72°C	
<b>Clonagem</b>	<i>TOPO TA Cloning® Kit</i>	
<b>Transformação</b>	- Bactérias quimicamente competentes TOP10 - Placa LB-Agar-Amp + X-Gal, 37°C	
<b>PCR screening</b>	<i>Primers</i> : M13/T7; Prog.: 94°C 8 min 94°C 30 s } 52°C 30 s } x 35 72°C 1 min } 72°C 5 min }	<i>Primers</i> : M13/T7; Prog.: 94°C 8 min 94°C 45 s } 52°C 45 s } x 35 72°C 1 min } 72°C 5 min }
<b>Mini-Cultura</b>	- LB líquido + Amp + Colónia(s) positiva(s) - Agitação constante (220 rpm) a 37°C, ~16h	- LB líquido + Amp + Colónia(s) positiva(s) - Agitação constante (220 rpm) a 37°C, ~16h
<b>Extracção de DNA Plasmídico</b>	<i>QIAprep Spin Miniprep Kit</i>	<i>QIAprep Spin Miniprep Kit</i>
<b>Sequenciação</b>	<i>Primers</i> : M13 e T7	<i>Primers</i> : M13 e T7

O vector de expressão pEGFP-C2, utilizado neste estudo, inclui a sequência codificante de uma variante da proteína fluorescente verde (GFP – Green Fluorescent Protein) isolada da hidromedusa *Aequorea victoria* (Ormo et al., 1996). Esta foi otimizada para uma fluorescência mais brilhante e para uma expressão elevada em células de mamíferos. Este vector está construído para a

uma proteína de fusão, em que a proteína GFP ocupa a posição N-terminal, funcionando como uma marca peptídica – *tag*.

O sistema Proteotuner (Clontech - [www.clontech.com](http://www.clontech.com)) consiste num vector de expressão que permite controlar os níveis de expressão da proteína de interesse em células de mamífero. O vector possui um *tag FKBP destabilization domain (DD)* que é expresso na porção N-terminal da proteína de interesse. A produção da proteína da fusão com o *DD-tag* induz a sua degradação nas células alvo, a não ser quando se adiciona uma molécula permeável designada por *Shield1*, ao meio de cultura, que se liga ao domínio DD ocultando-o, o que permite a estabilização da proteína de fusão transfectada, impedindo a sua degradação proteossomal. (Banaszynski *et al*, 2008).

### 3.3 Cultura de Células

Neste estudo foi mantida em cultura a linha celular de colonócitos não transformados, NCM460. Esta linha foi estabelecida a partir de uma amostra de tecido normal de mucosa de um indivíduo do sexo masculino de 68 anos (Moyer *et al.*, 1996) e as células apresentam uma morfologia epitelial aderente, desenvolvendo-se em monocamada.

A cultura da linha NCM460 iniciou-se com a descongelação rápida, a 37°C, de uma ampola de células (1 ml) conservada em azoto líquido, que após uma suave homogeneização foi necessário remover o agente criopreservante – dimetil sulfoxido (DMSO) – para melhorar a viabilidade celular, por centrifugação a 200xg durante 5 minutos e ressuspensão em meio de cultura fresco. Foi depois semeada em 19 ml de meio, pré-aquecido, M3:Base™ enriquecido da INCELL, juntamente com um suplemento de 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS – *Fetal Bovine Serum*, Gibco®). O frasco de cultura de células, de 80 cm<sup>2</sup> (T80 – Nunc™, [www.nuncbrad.com](http://www.nuncbrad.com)), foi colocado numa estufa de incubação a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub> (sem estar completamente fechado). Quando atingida uma confluência superior a  $\geq 90\%$ , passou-se à sub-cultura. Para tal, as células foram tripsinizadas (Trypsina + EDTA 0,05%, Gibco®) e, tendo em conta a sua confluência, foi definida a diluição (geralmente 1:2 a 1:4) a utilizar na nova cultura. Foi feita uma monitorização regular do crescimento celular, bem como da presença de infecções bacterianas ou fúngicas.

Ao longo do processo de cultura foram criopreservadas novas aliquotas das células em cultura, utilizando, para isso, o *pellet* resultante da centrifugação (5 min a 200 xg) da suspensão celular de dois frascos T80 que, em seguida, é gentilmente ressuspendido em soro FBS com 10% de DMSO. O volume final é distribuído por ampolas de criopreservação ( $\sim 10^7$  células/ml/ampola) que são colocadas inicialmente a -80°C e armazenadas, após cerca de 48 h, em contentores de azoto líquido (-196°C).

**Tabela 2:** Procedimentos utilizados na sub-clonagem dos cDNAs dos transcritos Rac1b e BRAF VE no vector de expressão indutível pPTuner e de CXCR4 no vector pEGFP-C2. Inclui a etapa de sequenciação que verificou o sucesso das metodologias aplicadas. No caso dos transcritos BRAF-VE e CXCR4 houve o passo de clonagem no vector TopoTa descrito na tabela 1.

		PLASMÍDEOS					
		Streptag pEXPR-Iba105 Rac1b wt	pPTuner	TopoTa-BRAF-VE	pPTuner	TopoTa-CXCR4	pEGFP-C2
ETAPAS	<b>Hidrólise Enzimática</b>	- BamHI (15 U/μl) - EcoRI (15 U/μl)	- BamHI (15 U/μl) - EcoRI (15 U/μl)	- SacI 15 U/μl) - SalI (15 U/μl)	- SacI 15 U/μl) - SalI (15 U/μl)	- ApaI (15 U/μl) - EcoRI (15 U/μl)	- ApaI (15 U/μl) - EcoRI (15 U/μl)
	<b>Desfosforilação e Purificação</b>	-	- BAP 65°C 1h - peqGOLD – Cycle pure kit <i>t</i>	-	-- BAP 65°C 1h - peqGOLD – Cycle pure kit <i>t</i>	-	- BAP 65°C 1h - peqGOLD – Cycle pure kit <i>t</i>
	<b>Excisão e Purificação</b>	- Banda de peso ~650 pb - JETQUICK Gel Extraction Spin kit	-	- Banda de peso ~2600pb - JETQUICK Gel Extraction Spin kit	-	- Banda de peso ~1100pb - JETQUICK Gel Extraction Spin kit	-
	<b>Ligação</b>	7ul insert:1ul vector; Rapid DNA Ligation Kit		9,5ul insert:0,5ul vector; Rapid DNA Ligation Kit		9,5ul insert:0,5ul vector; Rapid DNA Ligation Kit	
	<b>Transformação</b>	- Bactérias competentes da estirpe DH5α - Placa LB-Agar-Kan, 37°C		- Bactérias competentes da estirpe DH5α - Placa LB-Agar-Kan, 37°C		- Bactérias competentes da estirpe DH5α - Placa LB-Agar-Kan, 37°C	
	<b>PCR screening</b>	Primers: PCMV5-1F e Rac281-R		Primers: pCMV5-1F e pPTuner-R		Primers: GFP-1F e CXCR4-R	
		Prog.: 94°C 8 min 94°C 45 s 58°C 45 s 72°C 45 s 72°C 5 min } x 35		Prog.: 95°C 10 min 94°C 45 s 58°C 45 s 72°C 1min 72°C 5 min } x 35		Prog.: 94°C 8 min 94°C 45 s 58°C 45 s 72°C 30s 72°C 5 min } x 35	
	<b>Mini-Cultura</b>	- LB líquido + Kan + Colónia(s) positiva(s) - Agitação constante (220 rpm) a 37°C, ~16h		- LB líquido + Kan + Colónia(s) positiva(s) - Agitação constante (220 rpm) a 37°C, ~16h		- LB líquido + Kan + Colónia(s) positiva(s) - Agitação constante (220 rpm) a 37°C, ~16h	
	<b>Extracção de DNA Plasmídico</b>	QIAprep Spin Miniprep Kit					
	<b>Sequenciação</b>	Primers: PCMV5-1F e Rac258-F		Primers: pPtunerF e pPtunerR e mais tarde BRAF666F e BRAF 1681R		Primers: GFP-1F e GFP1R	

### 3.4 Transfecção de células

Transfecção é o processo de introduzir DNA ou RNA exógenos em células eucarióticas (Kendrem, 1994). Trata-se de uma técnica indispensável no estudo da função de proteínas, na modulação da expressão génica e na produção proteica.

Existem vários métodos de transfecção diferentes usados com diferentes objectivos, um dos métodos mais eficientes e menos citotóxico para células epiteliais é o que utiliza lipossomas catiónicos como mediadores da transfecção. Neste trabalho foi utilizado o reagente de transfecção *Lipofectamine*<sup>TM</sup> 2000 (Invitrogen<sup>TM</sup>) que apresenta elevada eficiência de transfecção numa variada gama de linhas celulares aderentes e em suspensão. Os lipossomas são moléculas sintéticas de lípidos catiónicos com uma estrutura semelhante à das membranas celulares, apresentando propriedades hidrofóbicas e hidrofílicas como as dos fosfolípidos. Em condições aquosas interagem de uma forma electrostática com o material genético carregado negativamente formando complexos (lipossoma/ácido nucleico) estáveis. Os complexos são depois integrados no citoplasma da célula por endocitose (Kendrem, 1994).

A transfecção pode ser transiente, i.e., quando não se dá a integração da construção no genoma, não sendo por isso replicada aquando da mitose celular (Kendrem, 1994), ou transfecção estável, quando há integração da construção no genoma. Sendo esta última uma ocorrência menos frequente, o isolamento de células com expressão estável após transfecção requer, normalmente, passos ulteriores de selecção clonal, um processo que foi feito neste trabalho e que será descrito posteriormente.

As transfecções dos construtos foram realizadas em células NCM460 com cerca de 80% de confluência. É utilizado Opti-MEM<sup>®</sup> I *Reduced Serum Medium* (Invitrogen<sup>TM</sup>) para diluição dos DNAs plasmídicos ou siRNAs a transfectar e da *Lipofectamine*<sup>TM</sup> 2000 (LF2K) que devem estabilizar, já diluídos, durante 5 minutos. Depois é feita a sua mistura para desencadear a reacção de formação dos complexos Lipossoma/Ac. nucleico. Esta ocorre nos 20 minutos seguintes sendo de seguida adicionados às células a transfectar, após renovação do seu meio de cultura. Para cada placa de 10 cm<sup>2</sup> foram usados 2 µg de DNA e 4 µL de LF2K juntamente com aproximadamente 250 µL de Opti-MEM<sup>®</sup>. No caso das transfecções de pEGFP-CXCR4 foi necessário ajustar as quantidades de reagentes para 4 µg de DNA e 8 µL de LF2K, por forma a conseguir uma nível de expressão adequado. Já nas placas de cultura de células com 96 poços (2 cm<sup>2</sup>/poço) foram usados 750 ng de DNA e 1,5 µL de LF2K juntamente com aproximadamente 100 µL de Opti-MEM<sup>®</sup>.

Foram feitas várias transfecções iniciais para a optimização do sistema de expressão pPtuner em termos da concentração de *Shield1* (0, 125, 250 e 500 nM) a usar para obter os níveis de expressão desejados. Foi depois necessário optimizar o tempo de indução adequado e mais uma vez foram testados vários intervalos de tempo (0, 2, 4, 8 e 12 horas). Em todos os testes foi usado um controlo positivo de transfecção e expressão do cDNA exógeno em causa (vectores pEGFP-Rac1b ou pEGFP-BRAF-VE).

Depois da otimização do sistema foi feita uma transfecção dos contrutos pPTuner, pPTuner-Rac1b e pPTuner-BRAF-VE em placas de 96 poços para indução com *Shield1* por 0, 6, 12 e 24 horas. Foi também feita a transfecção em placas de 10 cm<sup>2</sup> do construto pEGFP-CXCR4 e do vector vazio pEGFP nas células NCM460 sendo estas analisadas 16 horas depois.

### 3.5 RNA de interferência

A técnica de RNA interferência permite uma diminuição da expressão de um gene alvo pela utilização de um pequeno oligonucleótido de RNA com uma sequência complementar às moléculas alvo de RNA mensageiro, onde a sua hibridação gera uma região de RNA em cadeia dupla que desencadeia a hidrólise desse mRNA alvo, impedindo a sua tradução (Dykxhoorn *et al.*, 2003).

As transfecções de RNAs de interferência (siRNAs) foram feitas com células a confluência de 30% a 40% transfectadas nas placas de 10 cm<sup>2</sup> com 8 µL do reagente LF2K e 400 pmol dos siRNAs, diluídos num volume de aproximadamente 250 µL de Opti-MEM<sup>®</sup> de acordo com as instruções do fabricante. As sequências dos siRNAs utilizados encontram-se descritas na tabela 3. Os siRNAs siGFP, siRac1b, siMua (BRAF-VE) e siCXCR4 foram transfectados em células HT29 gentilmente cedidas pelas colegas do laboratório que mantinham esta linha celular em cultura. Os siRNAs, siRac1b e siGFP, foram também usados em células NCM460. Todas transfecções com siRNAs foram analisadas 48 horas depois da adição dos complexos e a expressão dos genes alvos analisados por *RT-PCR* ou *Western blot*.

**Tabela 3:** Sequências das moléculas de siRNA usadas.

siRNA	Sequência
siRac1b MWGBiotech AG	5' CAG UUG GAG AAA CGU ACG GTT 3' 5' CGU ACG GUA AGG AUA UAA CTT 3'
si BRAf-VE	5' GCU ACA GAG AAA UCU CGA UTT 3'* <sup>1</sup>
si CXCR4	Mix de oligos comercial (Santa Cruz Biotechnologies)
si GFP	5' GGC UAC GUC CAG GAG CGC ACC TT 3'

<sup>1</sup>Descrito anteriormente como si Mua por Hingorani *et al.*, 2003.

### 3.6 Selecção da linha estável; protocolo diluição limite.

Para fazer a selecção das linhas estáveis de NCM460 pPTuner, pPTuner-Rac1b e pPTuner-BRAF-VE fizeram-se transfecções paralelas das 3 construções em placas de 10 cm<sup>2</sup> tal como descrito anteriormente. Foi também mantida uma placa de células não transfectadas para controlo do processo de selecção. 48 horas após transfecção iniciou-se o processo de selecção adicionando o antibiótico G418 [125 µg/mL] a todas as placas, que permite que apenas sobrevivam células que integraram as construções (que incluem também o gene de resistência ao antibiótico de selecção). Esta selecção foi mantida durante 2 semanas após todas as células na placa controlo terem morrido, tendo-se procedido à tripsinização periódica das células em selecção para facilitar a remoção das células mortas e divisão

dos *pools* de células resistentes. Depois da selecção inicial foram congeladas ampolas dos *pools* de cada transfecção e fez-se a transferência de uma diluição limite das restantes células para placas de 100 cm<sup>2</sup>.

Inicialmente fez-se uma tentativa de isolar os clones individuais a partir desta placa mas, devido às características migratórias destas células quando a densidades muito baixas, não houve formação de clones isolados, tendo-se então optado a um protocolo de diluições limite seriadas. Para tal partiu-se das *pools* iniciais de cada transfecção e diluíram-se as células em meio M3:Base com 125 µg/mL de G418 (para manter a selecção) de forma a, em teoria, obter entre 1 a 10 células/ poço em cada uma das várias placas de 96 poços. Após 2-3 dias de incubação, para permitir que as células viáveis aderissem completamente, as placas foram analisadas, sendo feita uma selecção de 10 clones por cada construção tendo como critério o menor número de células inicial aparente. Depois do seu crescimento e passagem para placas de sucessivamente maior área foi feita uma indução com *Shield 1* por 12 horas para os 30 clones inicialmente seleccionados.

### 3.7 Lise Celular

As células foram semeadas e transfectadas como descrito anteriormente. No caso de amostras para análise exclusiva por *Western blot*, passados os tempos de expressão indicados fez-se uma lavagem inicial das células com uma solução equilibrada de sais fria antes de adicionar o tampão de lise Laemmli sample buffer 2x (SB – composição no Anexo II) juntamente com 0,01x volume de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>, 1 M) e benzonase (20 U/ul – Sigma®, www.sigmaaldrich.com) para digerir os ácidos nucleicos.

No caso do teste de indução final às 0, 6, 12 e 24 horas das construções em pPTuner, e das transfecções de siRNAs, o procedimento envolveu a recolha de amostra para análise de proteínas e mRNA. Assim, depois de ser feita a lavagem inicial, distribuíram-se 50 a 60 µl de tampão de lise NP40 (composição no Anexo II) por placa e deixou-se actuar durante 5 min. O conteúdo das placas foi depois, gentilmente raspado, recolhido para tubos de 1,5 ml e centrifugado a 10.000 xg durante 10 min, a uma temperatura de 4°C. Removeram-se então Cada 24 a 32 µL de sobrenadante que foram solubilizados em 6 a 8 µl de Laemmli sample buffer 5x (SB – composição no Anexo II). Estes foram então desnaturados a 95°C durante 10 min e submetidos a análise electroforética em gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) e *Western blot*. Por sua vez, os *pellets* foram ressuspensos na solução RA1 do kit *RNAeasy* (Qiagen) para posterior extracção tal como indicado nas instruções do fabricante e análise por *RT-PCR*.

No caso da transfecção da construção pEGFP-CXCR4, devido às modificações pós-traducionais, que este receptor sofre durante a sua biosíntese, e que alteram a sua migração electroforética, foi necessário alterar a composição do tampão de lise tornando-o menos desnaturante. Assim, estas células foram lisadas em 100 µL do tampão SBII (composição no Anexo II), contendo

com 0,01 volume de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>, 1M) e benzonase (20 U/ul – Sigma®, www.sigmaaldrich.com), não se tendo procedido à desnaturação dos lisados a 95°C.

### 3.7.1 SDS-PAGE e Western blot

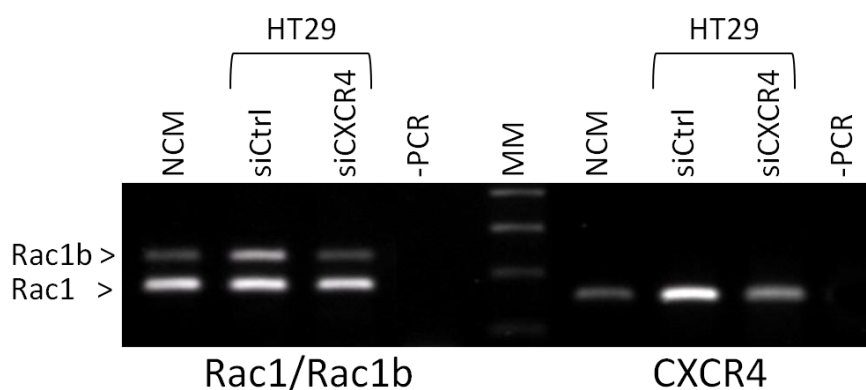
As amostras foram resolvidas por SDS-PAGE 1x (composição no Anexo II) em mini-géis de acrilamida a uma concentração de 10 a 12% (w/v) (composição no Anexo II), durante 50 min (para visualizar o Rac1b) a uma amperagem constante de 20 mA por gel ou durante 155 min (para visualizar o BRAF-VE) onde se fixava a voltagem a 150 V para garantir a separação de bandas de maior peso, sendo, neste caso, a corrida era feita a 4°C. No caso da visualização do CXCR4 foi necessário usar um mini-gel de acrilamida a 10% (w/v), modificado para conter 1% de glicerol (w/v) e 0,1% de SDS sendo as corridas feitas a 150 V, durante 90 min a 4°C.

Todas as amostras foram aplicadas com um marcador de proteínas de peso molecular conhecido – *Precision Plus Protein™ Standards (Bio-Rad)*. Fez-se depois a transferência para membranas de PVDF (Bio-Rad), previamente hidratadas, utilizando um dispositivo de transferência da Bio-Rad, o *Mini Trans-Blot Cell*, que submerso em tampão de transferência 1x (composição no Anexo II) foi submetido a uma diferença de potencial constante (100 V), durante 60 min. No caso dos géis de CXCR4 foi necessário usar um tampão de transferência modificado (composição no Anexo II) e a transferência foi feita durante 60 min mas a 300 mA em gelo.

As membranas foram, depois, coradas com azul de Coomassie (composição no Anexo II), mergulhadas em solução descorante (solução Destain – composição no Anexo II) para revelar as proteínas coradas. Procedeu-se depois ao bloqueio das membranas que foram mergulhadas em tampão de bloqueio (solução de leite magro em pó (2.5%) com tampão TBST – composição no Anexo II) durante um período de 60 min à temperatura ambiente ou durante 16 a 18 h a 4°C. Depois do bloqueio foram lavadas três vezes com tampão TBST e incubadas durante 1 h, em câmara húmida, com os anticorpos primários necessários (Anexo I tabela IV) diluídos em tampão de bloqueio. Depois de três lavagens (dois ciclos de 5 min e um final de 10 min) em tampão TBST fez-se entretanto a incubação das membranas com os anticorpos secundários (Anexo I tabela IV) diluídos em tampão de bloqueio. Depois de mais três lavagens de 10 minutos, prepararam-se as duas soluções para a detecção por quimioluminescência (ECL; composição no Anexo II) e na câmara escura, incubaram as membranas durante 1 min com uma mistura em partes iguais destas duas soluções. As membranas foram depois colocadas e seladas em cassetes de autoradiografia e expostas a chapas autoradiográficas por períodos variáveis de 1 s a 15 min. As chapas foram reveladas num revelador automático (Kodak XOMat, www.kodak.com).

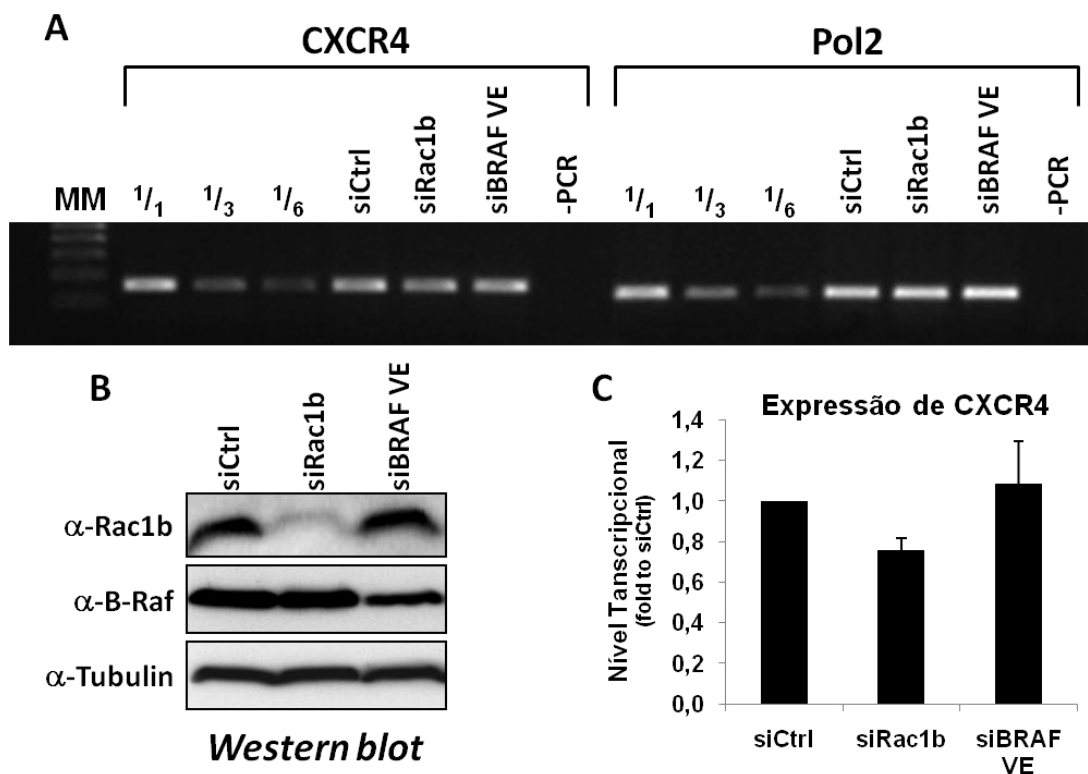
## 4 Resultados

O modelo de desenvolvimento tumoral proposto anteriormente sugere o envolvimento do receptor CXCR4 na sobre expressão da GTPase Rac1b. No sentido de uma validação preliminar deste modelo de trabalho, utilizou-se uma metodologia de RNA de interferência (siCXCR4) para inibir a expressão do receptor CXCR4 em células HT29. Em paralelo foi usada como controlo uma sequência do transcrito da proteína heteróloga GFP (*green fluorescent protein*- siCtrl). Como demonstrado na figura 6 o siCXCR4 levou à redução acentuada da expressão de Rac1b nas células HT29 para níveis semelhantes aos encontrados nas células NCM460, células de cólon não tumorais. Este resultado sugere que o receptor CXCR4 em células HT29 estimula a expressão de Rac1b.



**Figura 6: RT-PCR para análise da expressão de Rac1b e CXCR4.** Os níveis de expressão foram analisados em cDNA de células NCM460 e de células HT29 transfectadas com siCXCR4 ou siCtrl e lisadas 48 horas depois. A expressão da GTPase Rac1b, à esquerda, apresenta uma diminuição com o tratamento de siCXCR4 em HT29. A expressão do Receptor CXCR4, à direita foi analisada de forma a confirmar o efeito do siCXCR4, mostrando a diminuição da expressão do receptor na presença do siRNA. MM- Marcador de peso molecular 100 pares de bases, -PCR – controlo negativo de PCR

Foi então testado o papel da GTPase Rac1b e do oncogene B-Raf V600E na expressão do receptor CXCR4 em células HT29. Uma vez mais usando a técnica de RNA interferência foi feita a inibição da expressão de Rac1b ou do alelo mutante de BRAF (BRAF V600E), tal como descrito anteriormente (Matos *et al.*, 2008), com siRac1b e siBRAF VE respectivamente. Tal como se pode observar na figura 7 confirmou-se a actividade dos siRNA através de análise das proteínas por *Western Blot* (figura 7B) mostrando grande diminuição da expressão de Rac1b. A diminuição de BRAF é menos acentuada uma vez que o siRNA é específico para o alelo mutante. Seguidamente usando amostras de cDNA foi testado, por *RT-PCR*, o efeito que a inibição da expressão quer de Rac1b quer de BRAF-V600E tem sobre a expressão de CXCR4 (figura 7A). Apesar da clara diminuição da expressão das duas proteínas alvo ter sido alcançada, não se verificaram alterações nos níveis de expressão do transcrito de CXCR4 nestas células. Este resultado visual é confirmado no gráfico 7C que expõe as razões entre as densitometrias dos siRNA usados e o controlo.

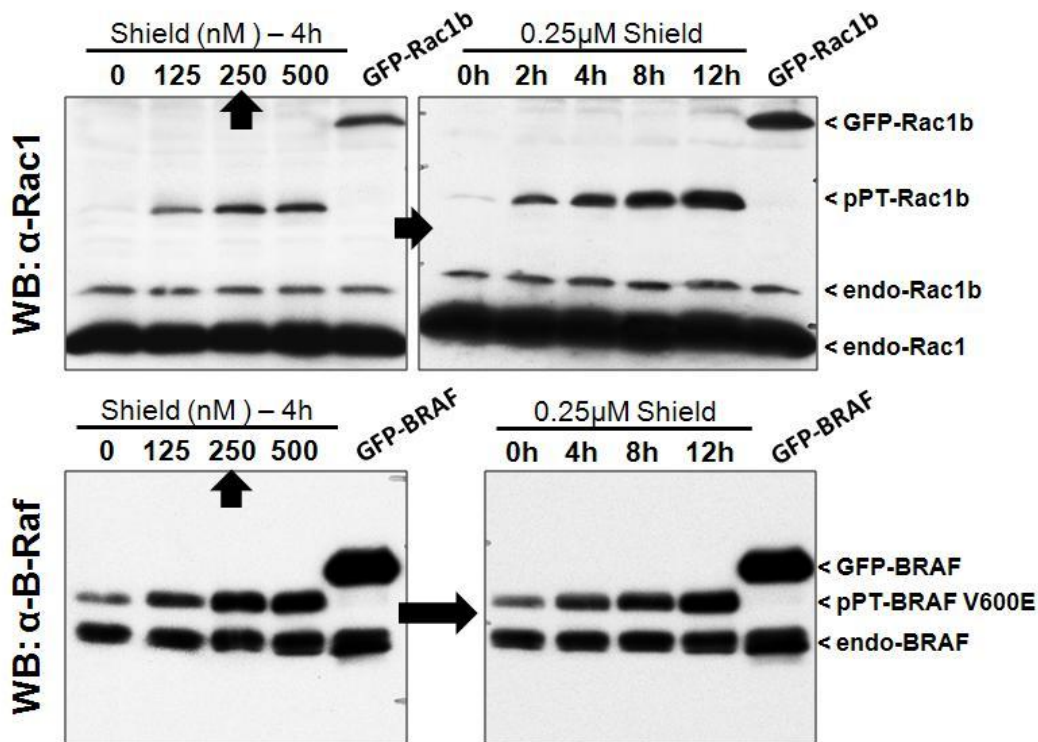


**Figura 7: Análise do efeito da inibição específica de Rac1b e BRaf-V600E na expressão de CXCR4 em células HT29.** Células HT29 foram transfectadas com os oligos indicados e lisadas 48 horas depois. (A) RT-PCR com primers específicos para o receptor CXCR4 e para a RNA polimerase II, como controlo interno. Os níveis de expressão de CXCR4 foram analisados nos cDNA de células HT29 tratadas com siCtrl, siRac1b e siBRAF VE. Para garantir que ambas as reacções de PCR se encontravam na fase linear e com eficiências equivalentes, de forma a permitir análises semi-quantitativas das amostras em estudo, foram também usadas 3 diluições de cDNA de células HT29 não tratadas (1/1, 1/3 e 1/6). MM- Marcador de peso Molecular 100 pares de bases, -PCR – controlo negativo de PCR (B) Western Blot para confirmação do efeito dos siRNA em células HT29 com os anticorpos indicados. Os níveis de proteína mostram a especificidade dos siRNAs uma vez que só há alteração de Rac1b quando está presente o siRac1b, verificando-se o mesmo efeito em BRaf. (C) Gráfico representando o resultado da análise densitométrica do nível de expressão do transcrito CXCR4 apresentado em (A). Os valores apresentados são as razões entre os valores das amostras e a do siCtrl. Os traços a negro representam o desvio padrão dos resultados obtidos em dois ensaios.

De forma a analisar melhor a contribuição do oncogene BRaf-V600E ou da GTPase Rac1b para o eixo de estimulação de CXCR4/SDF-1, foi criado um novo modelo celular. Células NCM460, foram modificadas de forma a terem uma expressão indutível de Rac1b ou BRaf-V600E usando o sistema *ProteoTuner* (Clontech). Este sistema permite a regulação da expressão da proteína de interesse através da adição de *Shield1* ao meio de cultura celular. Depois de clonados os cDNAs de Rac1b e BRaf V600E no vector pPTuner foi necessário otimizar os tempos de indução bem como as concentrações de Shield1 a utilizar para cada um dos construtos criados.

Usando transfecções transientes foi feita a validação do sistema *ProteoTuner* (Clontech) e demonstração da indução de pPTuner-Rac1b e pPTuner- BRAFV600E por

tratamento com o *Shield 1* de forma comparar várias concentrações e intervalos de tempo de indução.



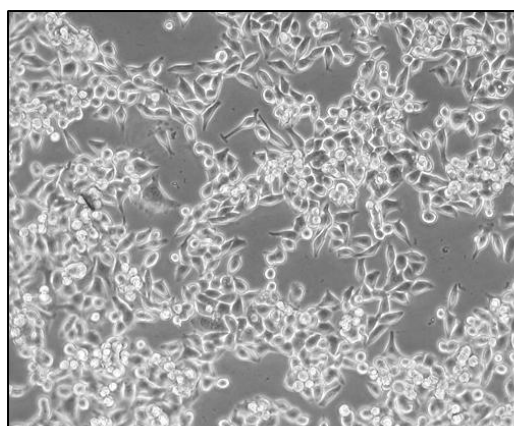
**Figura 8: Determinação dos parâmetros de indução do sistema *ProteoTuner* analisando a quantidade da proteína produzida por Western Blot com os anticorpos indicados.** À esquerda as transfecções transientes em células NCM460 de pPTuner Rac1b (em cima) e pPTuner BRAF V600E (em baixo) foram sujeitas a diferentes concentrações, 0, 125, 250 e 500 nM de *Shield1* durante 4 horas. Depois de escolhida a concentração de 250 nM de *Shield1* foram feitas novas transfecções transientes, à direita, com diferentes tempos de indução, entre as 0 e as 12 horas. Células transfectadas com GFP-Rac1b ou GFP-BRAF serviram de controlo positivo no Western Blot.

Em primeiro lugar, de forma a determinar qual a concentração de *Shield1* que levaria ao maior aumento da produção da proteína de interesse, foram feitas transfecções transientes com 0, 125, 250 e 500 nM de *Shield1* durante 4 horas representadas na figura 8. Ao analisar a figura é possível observar que na ausência de *Shield1* existe alguma expressão da proteína de interesse mostrando que não há total eliminação da proteína com o *tag* de degradação. Verifica-se depois um aumento progressivo do nível de proteína com o aumento da concentração de *Shield1*, quer com pPTuner Rac1b quer com pPTuner BRAF V600E. Com 250 nM de *Shield1* existe o maior aumento do nível de proteína que estabiliza com o valor seguinte de 500 nM sugerindo que o melhor valor para indução das construções seja 250 nM de *Shield1*.

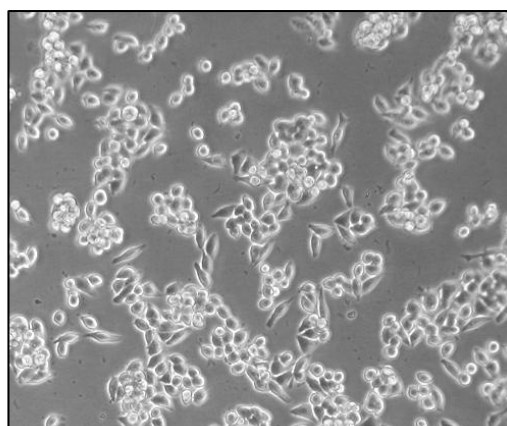
De seguida foi necessário otimizar o tempo de indução para cada um dos construtos. Para tal, fizeram-se novas transfecções transientes e a indução foi feita para o pPTuner Rac1b

durante 0, 2, 4, 8 e 12 horas. A figura 8 mostra que a presença da proteína Rac1b aumenta de forma constante o que indica as 12 horas como o tempo óptimo de indução. Foram também feitas transfecções transientes para indução do construto pPTuner BRaf V600E durante 0, 4, 8 e 12 horas de forma a comparar o efeito dos diferentes tempos em ambos os construtos. Mais uma vez a figura 8 mostra que BRaf V600E aumenta com o tempo de indução. O conjunto dos testes permitiram definir que a indução do sistema *ProteoTuner* (Clontech) seria feita com 250 nM de *Shield1* durante 12 horas.

De forma a desenvolver clones estáveis para o estudo foram feitas transfecções das construções pPTuner Rac1b, pPTuner BRaf V600E e do vector vazio pPTuner para posterior selecção com o antibiótico de resistência, G418. A figura 9 mostra a evolução da selecção das células transfectadas depois de 15 dias e a diferença entre os dois *pools* de células. Verificou-se uma clara diferença no número de células por campo nas duas linhas que foram sujeitas às mesmas condições de selecção mostrando uma menor taxa de crescimento das células transfectadas com pPTuner BRaf V600E. O *pool* de selecção do vector vazio pPTuner não é apresentado. No entanto, tinha um aspecto semelhante ao *pool* de selecção de pPTuner Rac1b.



pPT-Rac1b wt



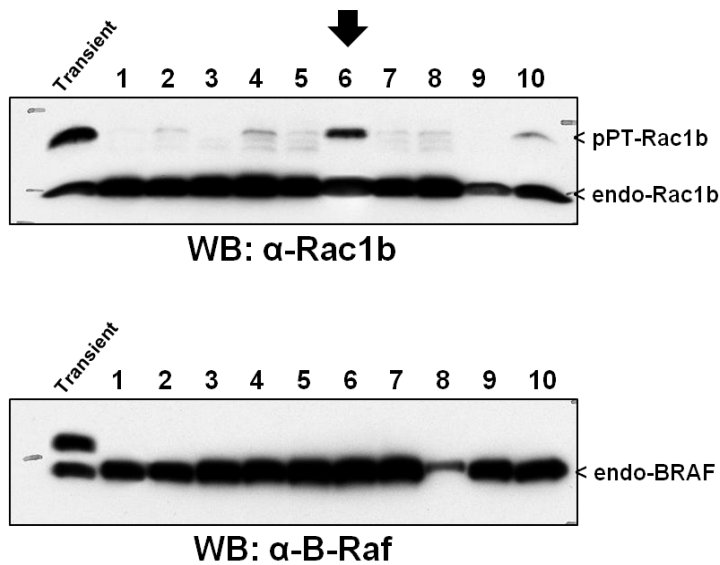
pPT-BRAF V600E

**Figura 9:** Fotografias obtidas por microscopia de contraste de fase dos *pools* de selecção. À esquerda a selecção dos clones transfectados com pPTuner Rac1b e à direita os de pPTuner BRAF, ambas após 15 dias de selecção com G418.

Através do protocolo de diluição limite foram isolados 10 clones para cada uma das construções e todos foram induzidos com 250 nM de *Shield1* durante 12 horas. Foi feita a análise da produção de Rac1b e BRaf V600E por *Western Blot* de forma a escolher aqueles que tivessem maior produção da proteína de interesse. A figura 10 mostra os 10 clones de cada uma das linhas em comparação com uma transfecção transiente. No caso de pPTuner Rac1b alguns dos clones apresentam expressão de Rac1b em níveis bastante variáveis, com o clone 6 a apresentar um nível de expressão mais promissor. Ainda assim a expressão de pPT-

Rac1b deste clone é inferior à expressão endógena de Rac1b. Já os clones pPTuner BRaf V600E não apresentam qualquer expressão do transgene, sendo visível na imagem apenas a expressão da transfecção transiente. Os clones estáveis com expressão de pPTuner, vector vazio foram também analisados por *Western Blot* de forma a confirmar que não apresentavam expressão de nenhum dos outros transgenes (dados não apresentados).

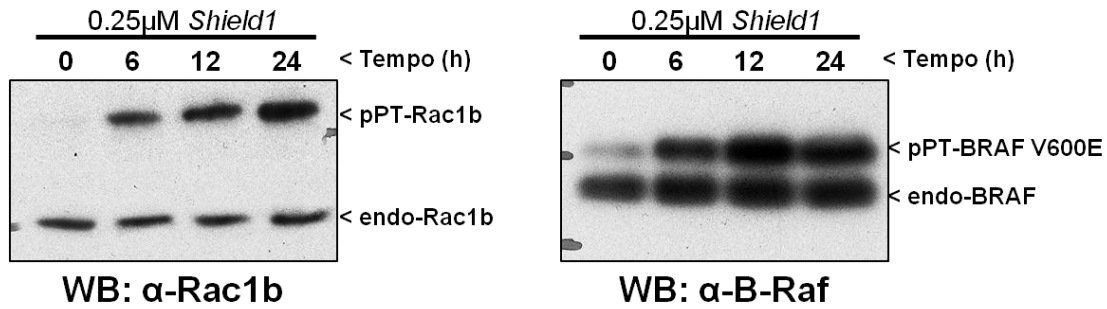
Uma vez que não foi possível obter clones estáveis com a sobre expressão adequada dos transgenes foi feita uma nova transfecção transiente dos 3 construtos, pPTuner, pPTuner Rac1b e pPTuner BRaf V600E para posterior indução com *Shield1* de forma a prosseguir o estudo.



**Figura 10: Western Blot para análise dos clones isolados tratados com *Shield1* numa indução de 12 horas.** Em cima os 10 clones de pPTuner Rac1b. Apenas o clone 6 apresenta uma expressão apreciável de Rac1b. Em baixo os 10 clones de pPTuner BRAF V600E. Foram usados os anticorpos indicados e em ambos os casos uma transfecção transiente serviu de controlo positivo.

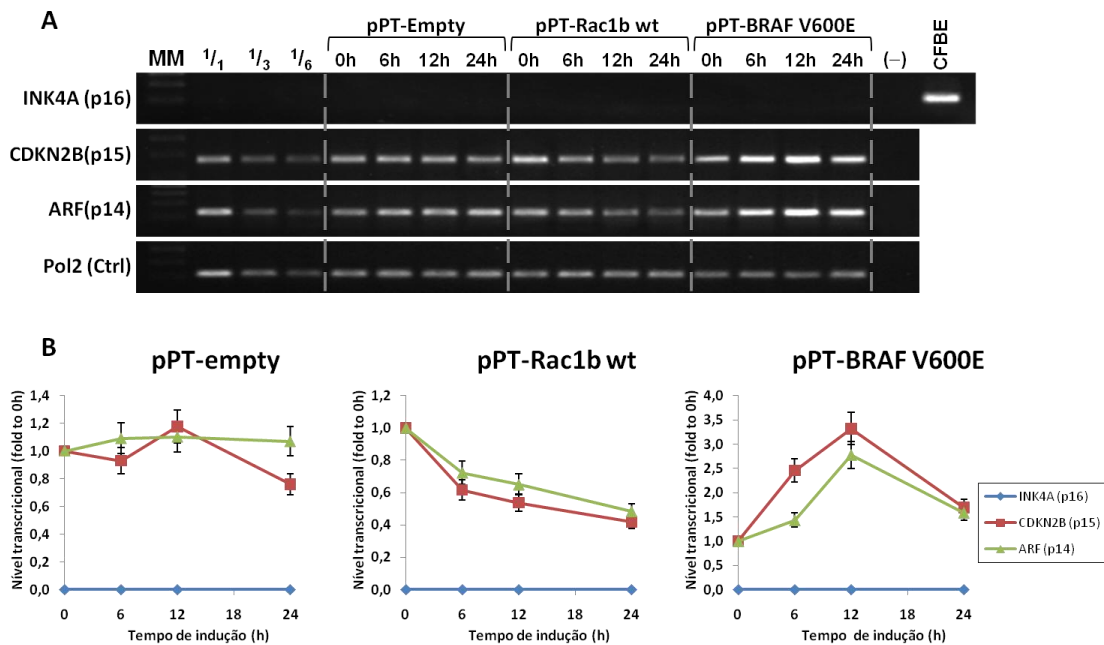
As transfecções transientes foram induzidas por 0, 6, 12 e 24 horas e depois da lise celular foi feita a extracção de proteína e RNA. Os níveis de indução foram confirmados, analisando as proteínas por *Western Blot*, representado na figura 11. Verifica-se um aumento constante na expressão de pPT-Rac1b com o tempo de indução, enquanto em pPT-BRAF V600E às 12 horas é atingida a maior expressão do transgene.

Com os RNAs extraídos foi feita a síntese de DNA complementar (cDNA) para estudar o efeito da sobre expressão de Rac1b e BRaf V600E na expressão de genes associados à senescência celular. Através da técnica de *RT-PCR* foi estudada a expressão de p16<sup>INK4A</sup>, p14<sup>ARF</sup> e p15<sup>INK4b</sup> (CDKN2B) nas células NCM460 transfectadas com os 3 construtos, conforme representado na figura 12. A expressão de p16<sup>INK4A</sup> não foi observada em nenhuma das amostras, sendo apenas obtida no controlo positivo de PCR com cDNA da linha pulmonar CFBE. Tal como esperado, a expressão do vector vazio pPTuner não tem influência aparente sobre a expressão dos marcadores de senescência em estudo. No caso das células transfectadas com o vector pPTuner Rac1b verifica-se a diminuição da expressão de dois dos



**Figura 11: Análise por Western Blot dos níveis de expressão de transgene obtidos nas diferentes induções** À esquerda a indução das transfecções transientes com pPTuner Rac1b que mostram maior expressão do transgene com maiores tempos de indução. À direita a indução das transfecções transientes com pPTuner BRAF V600E, mostrando maior expressão com 12 horas de indução. Foram usados os anticorpos indicados e todas as células foram induzidas com uma concentração de *Shield1* de 0,25 μM.

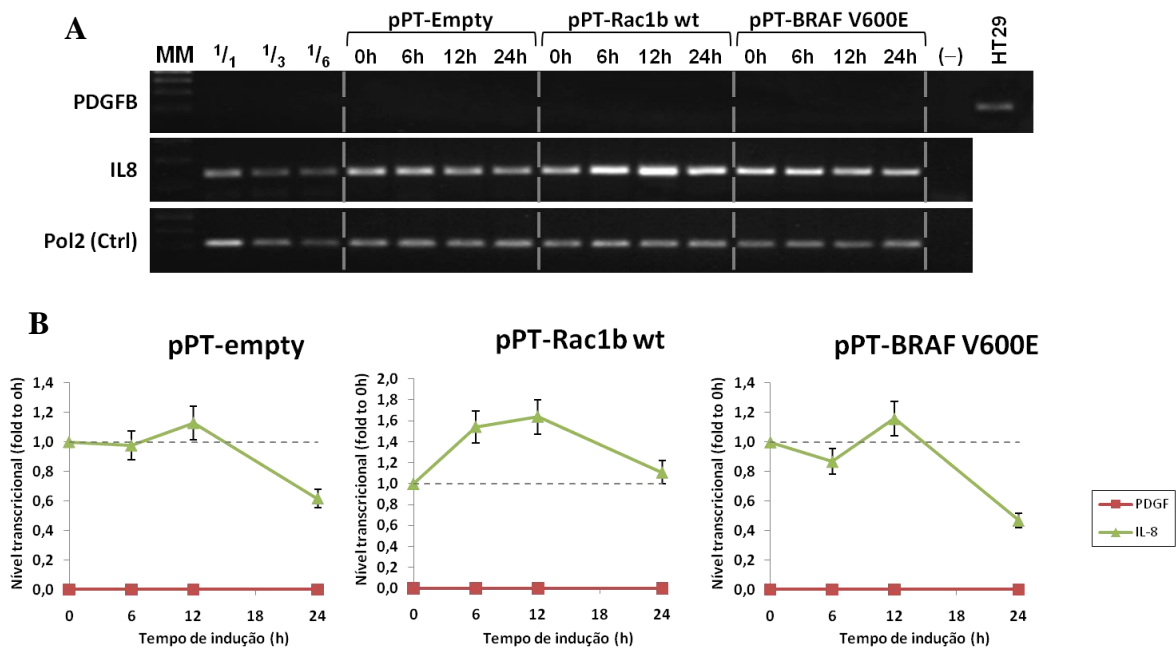
três dos marcadores de senescência. Tanto p15 como o p14 diminuem a expressão com o aumento da expressão de Rac1b apresentando às 24 horas cerca de 40% da expressão inicial. Nas células transfectadas com pPTuner BRAF V600E verifica-se uma tendência contrária na expressão dos genes marcadores de senescência. Com a expressão de pPT-BRAF-V600E existe um claro aumento de p15 atingindo o valor máximo às 12 horas de indução.



**Figura 12: Análise dos níveis de expressão de marcadores de senescência** Células NCM460 foram transfectadas com os construtos indicados e sujeitas a um processo de indução com *Shield1* durante os tempos indicados (A) *RT-PCR* com *primers* específicos para as sequências de p16<sup>INK4A</sup>, p15 CDKN2B e p14ARF. Os *primers* específicos para a RNA polimerase II foram usados como controlo de carregamento da amostra. Na reacção de PCR para amplificar o p16<sup>INK4A</sup> foi usado cDNA de CFBE como controlo positivo Para garantir que as reacções de PCR se encontravam na fase linear e com eficiências equivalentes, de forma a permitir uma análise semi-quantitativa das amostras em estudo, foram também usadas 3 diluições de cDNA de células NCM460 não tratadas (1/1, 1/3 e 1/6). MM- Marcador de peso Molecular 100 pares de bases, -PCR – controlo negativo de PCR (B) Os gráficos representam os níveis de expressão de cada um dos marcadores de senescência. Cada um dos pontos apresenta a razão entre os valores obtidos por densitometria para determinada construção e tempo de indução e o valor do tempo 0 h. Os traços a negro representam o desvio padrão entre dois ensaios.

Neste ponto a expressão de p15 é 3,3 vezes superior ao das células transfectadas não induzidas. No caso do p14 verifica-se novamente o aumento de expressão que às 12 horas é 2,7 vezes superior ao das células transfectadas, não induzidas. O padrão de indução do vector pPTuner BRAF V600E é semelhante nos dois genes de senescência havendo uma diminuição da expressão às 24 horas. Este facto é concordante com o Western blot da figura 11 que mostra que às 24 horas de indução há uma diminuição da expressão do transgene BRaf V600E. Estes resultados sugerem que a sobre expressão de BRaf-V600E induz a expressão de genes associados à senescência enquanto Rac1b a inibe.

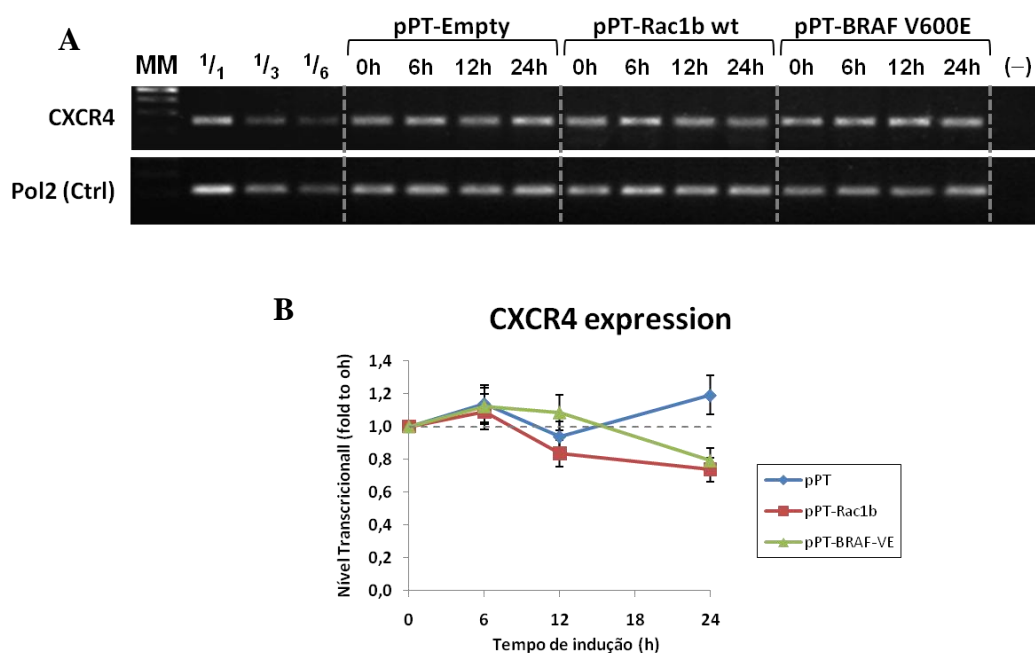
Depois de verificado o efeito dos genes em estudo, Rac1b e BRaf V600E, na senescência celular, tornou-se importante estudar o efeito dos mesmos genes em processos que possam induzir a progressão tumoral de acordo com o modelo de trabalho. Para tal foi testada o seu efeito na expressão das citocinas PDGFB e IL-8, através de *RT-PCR* nas amostras de cDNA das células NCM460 usadas anteriormente representado na figura 13.



**Figura 13: Análise dos níveis de expressão de citocinas.** Células NCM460 foram transfectadas com os construtos indicados e sujeitas a um processo de indução com *Shield1* durante os tempos indicados (A) *RT-PCR* com *primers* específicos para as sequências de PDFGB e IL-8. Os *primers* específicos para a RNA polimerase II foram usados como controlo de carregamento da amostra. Na reacção de PCR para amplificar o PDGFB foi usado cDNA de HT29 como controlo positivo. Para garantir que as reacções de PCR se encontravam na fase linear e com eficiências equivalentes, de forma a permitir uma análise semi-quantitativa das amostras em estudo, foram também usadas 3 diluições de cDNA de células NCM460 não tratadas (1/1, 1/3 e 1/6). MM- Marcador de peso Molecular, -PCR – controlo negativo de PCR (B) Os gráficos representam os níveis e expressão de cada um das citocinas. Cada um dos pontos apresenta a razão entre os valores obtidos por densitometria para determinado construto e tempo de indução e o valor do tempo 0 h. Os traços a negro representam o desvio padrão entre dois ensaios.

A análise da figura mostra que não foi detectada expressão de PDGFB nas células NCM460 em qualquer das condições testadas. A expressão de IL-8 não aparenta ser afectada pela sobre expressão de BRaf V600E uma vez que os gráficos referentes à indução do vector vazio e de pPTuner BRAF V600E apresentam um padrão muito semelhante. Curiosamente, o tratamento destas células com Shield1 durante 24h parece ser suficiente para induzir uma diminuição artefactual dos níveis endógenos de IL-8, pois acontece mesmo nas células transfectadas com o vector vazio e de pPTuner. Com a expressão de pPTuner Rac1b verifica-se um aumento de IL-8 que atinge o máximo de expressão às 12 horas de indução, provavelmente devido ao efeito artefactual do tratamento com Shield1. Este resultado sugere que a sobre expressão de Rac1b induz a expressão da citocina IL-8.

No início do trabalho prático determinou-se que a inibição específica de Rac1b e BRaf V600E não altera a expressão de CXCR4 nas células tumorais HT29. De forma a verificar se a sobre-expressão destes dois genes tem algum efeito sobre a expressão do receptor em células normais testou-se por *RT-PCR* o nível transcricional de CXCR4 nas amostras de NCM460 transfectadas com os vectores pPTuner, pPTuner Rac1b e pPTuner BRAF V600E usadas nos ensaios anteriores.

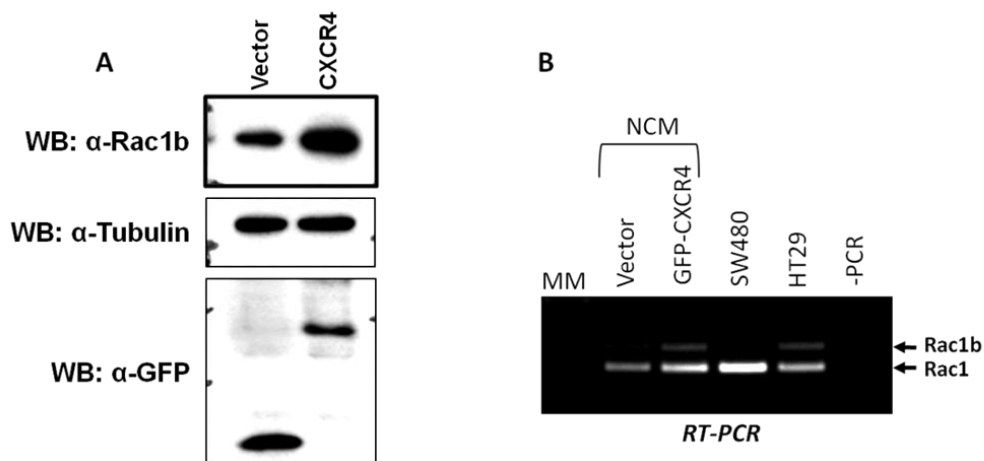


**Figura 14: Análise dos níveis de expressão do receptor CXCR4** Células NCM foram transfectadas com os construtos indicados e sujeitas a um processo de indução com *Shield1* durante os tempos indicados (A) *RT-PCR* com *primers* específicos para a sequência do receptor CXCR4. Os *primers* específicos para a RNA polimerase II foram usados como controlo de carregamento da amostra. Para garantir que as reacções de PCR se encontravam na fase linear e com eficiências equivalentes, de forma a permitir uma análise semi-quantitativa das amostras em estudo, foram também usadas 3 diluições de cDNA de células NCM460 não tratadas (1/1, 1/3 e 1/6). MM-Marcador de peso Molecular, -PCR – controlo negativo de PCR (B) O gráfico representa os níveis de expressão do receptor. Cada um dos pontos apresenta a razão entre os valores obtidos por densitometria para determinado construto e tempo de indução e o valor do tempo 0 h. Os traços a negro representam o desvio padrão.

A figura 14 mostra que nenhuma das construções testadas, pPTuner, pPTuner Rac1b ou pPTuner BRAF V600E, provoca alterações significativas na expressão do receptor CXCR4 nos vários tempos de indução analisados. Este resultado reforça a ideia de que a expressão da GTPase Rac1b e do oncogene BRaf V600E não influenciam a expressão do receptor CXCR4 na própria célula.

Tornou-se então importante estudar se a sobre-expressão do receptor CXCR4 terá algum efeito sobre a expressão da GTPase Rac1b em células NCM460. Foi então necessário desenvolver uma nova construção para expressão do receptor CXCR4, clonando o seu cDNA no vector pEGFP-C2. Células NCM460 foram transfectadas com vector pEGFP vazio ou com o vector pEGFP-CXCR4 e sujeitas a um período de expressão de 16 horas.

Após a lise celular foi confirmado o nível de expressão de GFP-CXCR4 por *Western blot* como é demonstrado na figura 15A. Existe grande expressão de GFP na presença do vector vazio pEGFP e na transfecção com pEGFP-CXCR4 há produção de GFP-CXCR4. Ainda por *Western blot* foi também testada a expressão da GTPase Rac1b endógena verificando-se um claro aumento da expressão de Rac1b com a sobre-expressão de GFP-CXCR4. De forma a confirmar estes resultados ao nível do transcrito, foi feita a análise, por *RT-PCR*, da expressão das GTPases Rac1 e Rac1b em amostras de cDNA das células transfectadas e das linhas SW480 e HT29 representado na figura 15B.



**Figura 15: Análise do efeito da sobre expressão de CXCR4 na expressão de Rac1b em células NCM460.** Células NCM460 foram transfectadas com pEGFP ou PEGFP-CXCR4 e lisadas 16 horas depois. (A) Western blot para confirmação do efeito dos construtos com os anticorpos indicados. Os níveis de proteína mostram que a sobre expressão de CXCR4 provoca um aumento da expressão de Rac1b. A tubulina foi usada como controlo de carregamento da amostra (B) RT-PCR com primers específicos para as GTPases Rac1 e Rac1b. Os níveis de expressão foram comparados com os das linhas SW480 e HT29. MM- Marcador de peso Molecular, -PCR – controlo negativo de PCR

A análise da figura 15 B mostra que com a sobre expressão de GFP-CXCR4 existe um aumento de transcrito Rac1b endógeno que atinge um nível semelhante ao que é encontrado nas células tumorais de cólon, HT29. Estes resultados sugerem que, apesar da indução do oncogene BRaf V600E não ser, por si só, capaz de fazer aumentar a expressão de CXCR4 em células NCM460, a sobre expressão de CXCR4 é, no entanto, suficiente para promover a sobre-expressão de Rac1b.

## **5 Discussão e Conclusões**

Um dos objectivos deste trabalho foi determinar quais os efeitos da expressão de BRaf-V600E e da sobreexpressão da GTPase Rac1b no crescimento e viabilidade de células epiteliais normais da mucosa do cólon humano.

De forma a estudar estes efeitos de Rac1b e B-Raf-V600E, foi escolhido como modelo a linha celular NCM460, uma linha de colonócitos não transformados humanos (Moyer *et al.*, 1996). As células foram transfectadas utilizando o sistema *ProteoTuner* (Clontech), numa tentativa de obter linhas estáveis com expressão indutível dos diferentes transgenes. No entanto, após os processos de selecção clonal necessários, verificou-se um baixo nível de expressão dos transgenes transfectados. Os baixos níveis obtidos com pPTuner Rac1b (Figura 10) podem ser justificados com o processo pelo qual foram obtidos. Mesmo após as sucessivas diluições seriadas, provavelmente ainda existem células com diferente número de cópias do transgene ou, nalguns casos, uma elevada percentagem de células em que a integração da construção provocou disrupção da correcta grelha de leitura do transgene. Assim, serão necessários novos passos de subclonagem de forma a obter clones com uma sobre expressão aproximadamente duas vezes superior à endógena, semelhante ao observado em células HT29.

No caso dos clones de BRaf-V600E (Figura 10) a baixa taxa de crescimento observada nas fases iniciais de selecção das *pools* (Figura 9) poderá justificar o facto de no final do procedimento não termos detectado expressão do transgene em nenhum dos clones isolados. Possivelmente o nível de expressão residual do transgene, que o sistema *ProteoTuner* revelou na ausência de Shield1, terá sido suficiente para desencadear o processo de OIS (*oncogene induced senescence*), limitando assim o crescimento e viabilidade das células com integração bem sucedida de BRaf-V600E. Na realidade, como foi já demonstrado por experiências anteriores em melanocitos (Dhomen *et al.*, 2009; Goel *et al.*, 2009) ou em modelos de ratinho para o estudo de melanoma (Pritchard *et al.*, 2007), de cancro do pulmão (Dankort *et al.*, 2007) ou do tracto intestinal (Carragher *et al.*, 2010) a expressão de BRaf-V600E reprime a

progressão do ciclo celular ao desencadear o processo de OIS. De facto, como será discutido mais à frente, observámos que a expressão de BRaf-V600E em células NCM460 promove a expressão de genes repressores do ciclo celular, o que, durante o processo de selecção, terá dado uma vantagem proliferativa apenas às células em que a integração da construção provocou disrupção da correcta grelha de leitura do transgene, mantendo a integridade do gene de resistência.

Uma vez que não foi possível desenvolver clones estáveis, preferenciais por se garantir uma expressão mais homogénea do transgene por célula, foi necessário usar transfecções transientes e posterior indução com *Shield1*. Em todas as experiências de indução foi usada como controlo a indução do vector vazio pPTuner e, inesperadamente, a sua utilização mostrou uma alteração da expressão da citocina IL-8 às 24 horas de tratamento com o *Shield1*. Uma interferência não específica da substância indutora, de um sistema de expressão indutível, já tem sido documentada em vias celulares de citocinas como é o caso da IL-8, no caso da droga ecdysona (Constantino, *et al.* 2001) e mostra a importância da utilização do controlo de forma a afastar possíveis resultados artefactuais que o tratamento pode induzir na expressão génica.

As transfecções transientes foram então usadas para estudar a expressão dos marcadores de senescência e verificou-se que perante a indução da expressão do oncogene BRaf-V600E em células NCM460, existiu um aumento da expressão das proteínas supressoras de tumor, p14<sup>ARF</sup> e p15<sup>INK4b</sup> (figura 12). Estes resultados sugerem que a sobre expressão de BRaf-V600E induz, de facto, a OIS em células de cólon, mostrando que esta mutação típica da via serreada provoca inibição da proliferação celular, tal como havia já sido demonstrado (Collado e Serrano 2006; Prieur e Peeper, 2008; Kriegl *et al.* 2011). Já a indução da expressão de Rac1b parece apresentar um efeito antagónico, diminuindo de forma acentuada a expressão de p14<sup>ARF</sup> e p15<sup>INK4b</sup> (figura 12). Estes resultados são concordantes com a hipótese de cooperação observada em células tumorais HT29, onde B-Raf-V600E e a GTPase Rac1b actuam para manter a sobrevivência celular (Matos *et al.*, 2008). É importante referir neste ponto que as células HT29 usadas neste trabalho são já um modelo cancerígeno, pelo que já ultrapassaram a fase de senescência que estamos a estudar. Torna-se então interessante para futuras experiências testar o efeito de Rac1b em células que já expressam BRaf-V600E. Para tal, será necessário ultrapassar o obstáculo da expressão residual, não induzida, do transgene de forma a obter a linha estável com expressão indutível de BRaf-V600E para que depois seja feita a transfecção transiente de Rac1b e analisar os efeitos da expressão da GTPase na superação do processo de senescência celular. Uma possibilidade

será testar outros sistemas indutíveis, disponíveis comercialmente, para encontrar condições nas quais expressão residual constitutiva seja negligenciável.

Um dos resultados que se destaca deste trabalho é que a indução da expressão transiente de BRaf-V600E em células NCM460 aumenta a expressão dos marcadores de senescência p14 e p15 enquanto os mesmos marcadores diminuem quando se induz a expressão da GTPase Rac1b, o que reforça o conceito de que a sobreexpressão desta GTPase é crucial para ultrapassar o efeito de OIS induzido pela presença de BRaf-V600E em células do cólon. Curiosamente, do painel de marcadores de senescência estudados, não foi possível detectar a expressão de p16<sup>INK4a</sup> em células NCM460 em qualquer das condições de indução utilizadas (figura 12). A expressão de p16<sup>INK4a</sup> foi já estudada em várias amostras de tumores de cólon e verificou-se que apesar de ausente em células normais sofre um aumento de expressão em amostras de tumores de cólon com mutações em *BRAF* e que a perda da sua expressão está ligada à transformação maligna (Kriegel *et al.* 2011). No entanto outros autores têm verificado que a linha NCM460 apresenta metilação do gene p16<sup>INK4a</sup> não tendo também conseguido detectar a sua expressão nestas células (Minoio *et al.* 2007). Assim sendo, o facto de não expressarem p16<sup>INK4a</sup> aquando da sobreexpressão de BRaf-V600E pode significar que a expressão deste marcador de senescência ocorre mais tarde no processo de OIS ou que as 24 horas de indução não são suficientes para a alteração do estado de metilação deste gene nas células NCM460.

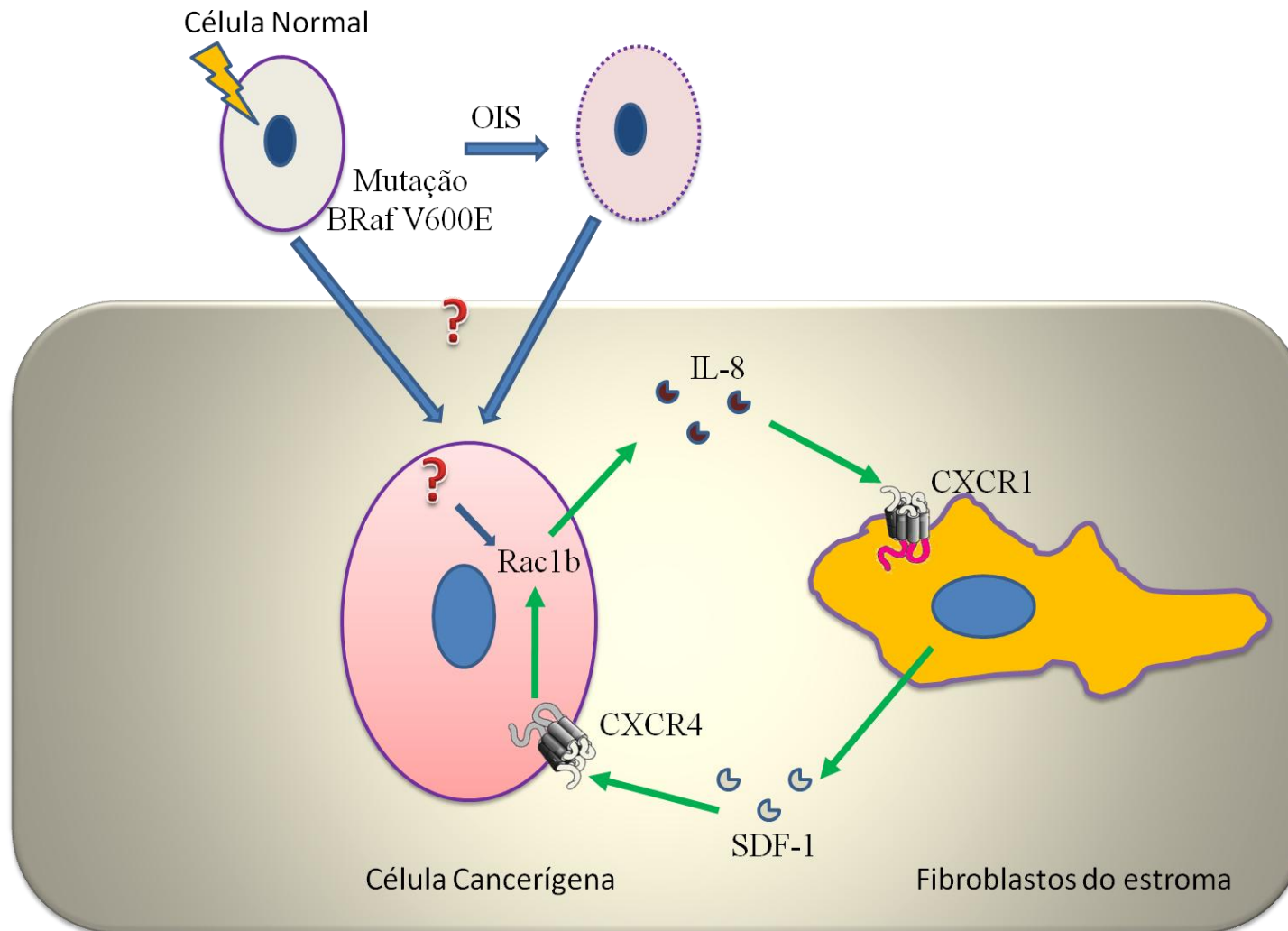
Um segundo resultado que se destaca deste trabalho foi que a estimulação dos receptores CXCR4 na célula tumoral induz a sobre expressão de Rac1b e consequente sobrevivência da célula tumoral.

Considerando a cooperação anteriormente descrita entre BRaf-V600E e Rac1b e de acordo com o modelo de trabalho (figura 5) verificou-se que a sobre expressão de CXCR4 nas células NCM460, que neste trabalho foi usada como forma de mimetizar a activação da sinalização deste receptor, leva ao aumento da expressão de Rac1b. Esta sobre expressão de CXCR4 levou ao aumento da expressão de Rac1b em células NCM460 para níveis semelhantes aos encontrados nas células tumorais HT29 (figura 15). Vice-versa, a inibição da expressão de CXCR4 em células tumorais, HT29 levou à diminuição da expressão de Rac1b para níveis semelhantes aos encontrados nas células NCM460 (figura 6). Estes resultados mostraram que a expressão de Rac1b aumenta quando existe sobre expressão de CXCR4.

A hipótese de cooperação com Rac1b (Matos *et al.*, 2008) poderia então sugerir que a expressão de BRaf-V600E fosse a responsável pelo aumento da expressão de CXCR4. Esta

hipótese não se verificou na experiência mostrada na figura 14 em que se observou que a indução da expressão de Braf-V600E aparenta não afectar a expressão do receptor CXCR4. Esta experiência tem resultados concordantes com o facto da expressão de BRaf-V600E induzir a OIS (Collado e Serrano 2006; Prieur e Peeper, 2008; Kriegl *et al.* 2011) e não ser suficiente para substituir o potencial oncogénico do mutante K-Ras como demonstraram anteriores ensaios de transformação celular (Davies *et al.*, 2002). O facto de a inibição da expressão do oncogene BRaf-V600E em HT29 não provocar a diminuição da expressão da GTPase Rac1b (figura 7B) reforça o resultado da experiência anterior, porque se BRaf-V600E fosse responsável pelo aumento da expressão de CXCR4 a inibição da sua expressão teria por consequência a diminuição da expressão de Rac1b. Assim sendo, os resultados deste trabalho sugerem que o mecanismo que leva ao aumento inicial de Rac1b não depende apenas da presença da mutação V600E em B-Raf mas sim de alterações adicionais, sejam estas genéticas ou resultantes da interacção da célula tumoral com o estroma envolvente.

Em suma, os resultados deste trabalho sugerem que numa célula de colón normal quando surge a mutação BRaf-V600E ocorre um processo de resposta aguda, a OIS. No entanto, por um processo que ainda é necessário definir ocorre na célula aumento da expressão de Rac1b. A expressão de Rac1b provoca um aumento da expressão da citocina IL-8 (figura 13). Esta citocina está descrita de actuar sobre os receptores respectivos em fibroblastos do estroma que posteriormente respondem com a produção de SDF-1 (Matsuo *et al.*, 2009). A citocina SDF-1 vai promover a sobrevivência das células epiteliais activando o receptor específico, CXCR4 que por sua vez provoca o aumento de expressão da GTPase Rac1b, criando assim um ciclo de retro alimentação entre a célula tumoral e as células envolventes do estroma que conduz a progressão tumoral (Figura 16).



**Figura 16: Modelo actualizado da comunicação celular durante a gênese tumoral.** Quando a mutação BRaf-V600E surge em células normais de cólon induz a OIS. O aumento da expressão de Rac1b leva à produção de IL-8 pela célula tumoral. Ocorre depois a indução da expressão de SDF-1 em fibroblastos do estroma. Esta citocina estimula os receptores CXCR4 na célula tumoral e induz a sobre expressão de Rac1b, o que por sua vez origina um ciclo de retro alimentação positiva que induz a sobrevivência de células tumorais. A interação com as células endoteliais por parte do PDGF-BB não está referida pois não foi detectada a sua expressão em nenhuma das condições de indução testadas podendo indicar que este processo ocorre mais tarde no desenvolvimento tumoral.

## 6 Referências Bibliográficas

- Abbas, A. K. e Lichtman, A. H. (2003), Cellular and Molecular Immunology (5th edition). Saunders, USA.
- Banaszynski, L., Chen, L., Maynard-Smith, L., Ooi, L. e Wandless, T. (2008), A Rapid, Reversible, & Tunable Method to Regulate Protein Function in Living Cells. *Clontechiques*.
- Carragher, L., Snell, K., Giblett, S., Aldridge, V., Patel, B., Cook, S., Winton, D., Marais, R. e Pritchard, C. (2010), V600EBraf induces gastrointestinal crypt senescence and promotes tumour progression through enhanced CpG methylation of p16INK4a. *EMBO Mol Med.* **2**, 458-471.
- Collado M, e Serrano M. (2006), The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 472-476.
- Constantino, S., Santos, R., Gisselbrecht, S. e Gouilleux, F. (2001), The ecdysone inducible gene expression system: unexpected effects of muristerone A and ponasterone A on cytokine signaling in mammalian cells. *Eur. Cytokine Netw.* **12**(2), 365-367.
- Dankort, D., Filenova, E., Collado, M., Serrano, M., Jones, K. e McMahon M. (2007), A new mouse model to explore the initiation, progression, and therapy of BRAF<sup>V600E</sup>-induced lung tumors. *Genes Develop* **21**, 379–384.
- Davies, H., Bignell, G., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M., Bottomley, W., Davis, N., *et al.* (2002), Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **417**, 949-954
- Dhomen, N., Reis-Filho, J., da Rocha Dias S., Hayward, R., Savage, K., Delmas, V., Larue, L., Pritchard, C. e Marais, R. (2009), Oncogenic Braf induces melanocyte senescence and melanoma in mice. *Cancer Cell* **15**, 294-303.
- Dovas, A. e Couchman, J.R. (2005), RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities. *Biochem J* **390**, 1-9.
- Dykxhoorn, D., Novina, C. e Sharp, P. (2003), Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nature Review Molecular Cell Biology*, **4** :457-467;
- Eden, S., Rohatgi, R., Podtelejnikov, A.V., Mann, M. e Kirschner, M.W. (2002), Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature* **418**, 790-793.
- Glick, B. R. e Pasternak, J. J. (2003), *Molecular Biotechnology: Principles and applications of recombinant DNA* (3rd edition). ASM Press, Washington, D. C.
- Goel, V., Ibrahim, N., Jiang, G., Singhal, M., Fee, S., Flotte, T., Westmoreland, S., Haluska, F., Hinds, P. e Haluska, F. (2009), Melanocytic nevus-like hyperplasia and melanoma in transgenic BRAFV600E mice. *Oncogene* **28**, 2289-2298.
- Griffiths, A., Miller, J., Suzuki, D., Lewontin, R. e Gelbart, W. (2000), *An Introduction to Genetic Analysis* (7th edition). W. H. Freeman and Company, New York.
- Hawkins N., Bariol C. e Ward R. (2002), The serrated neoplasia pathway. *Pathology* **34**, 548-555
- Hingorani, S., Jacobetz, M., Robertson, G., Herlyn, M. e Tuveson, D. (2003), Suppression of BRAF(V599E) in human melanoma abrogates transformation. *Cancer Res* **63**, 5198–5202.
- Jaffe, A., Hall, A. (2005), Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 247-269.
- Jass, J. R. (2007), Molecular heterogeneity of colorectal cancer: implications for cancer control. *Surg Oncol* **16**, S7-S9

- Jordan, P., Brazão, R., Boavida, M., Gespach, C. e Chastre, E. (1999), Cloning of a novel human Rac1b splice variant with increased expression in colorectal tumours. *Oncogene* **18**, 6835–6839.
- Jordan, P., Gonçalves, V. e Matos, P. (2006), Alternative splicing changes regulation and signalling properties of the small GTPase Rac1. In: *Alternative Splicing and Cancer*, (Ed) J. P. Venables, Transworld Research Network, Kerala (India), pp. 45-65 (ISBN: 81-7895-235-1)
- Joyce, J. e Pollard J. (2009), Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 239-252.
- Kendrem, J. (1994), *The Encyclopedia of Molecular Biology*. Blackwell Science, Great Britain.
- Kim, W. e Sharpless, N. (2006), The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell* **127**(2) 265-75. Review. PMID:17055429
- Kolch, W. (2005), Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(11), 82-837
- Kriegl, L., Neumann, J., Vieth, M., Greten, F., Reu, S., Jung, A. e Kirchner, T. (2011), Up and downregulation of p16(Ink4a) expression in BRAF-mutated polyps/adenomas indicates a senescence barrier in the serrated route to colon cancer. *Mod. Pathol.* **24**, 1015–102
- Manser, E., Leung, T., Salihuddin, H., Zhao, Z.S. e Lim, L. (1994), A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. *Nature* **367**, 40-46.
- Matos, P. e Jordan, P. (2005), Expression of Rac1b stimulates NF- $\kappa$ B-mediated cell survival and G1/S progression. *Exp. Cell Res.*, **305** (2), 292-299.
- Matos, P. e Jordan, P. (2006), Rac1, but not Rac1b, stimulates RelB-mediated gene transcription in colorectal cancer cells. *J. Biol. Chem.* **281**(19), 13724-13732.
- Matos, P., Collard, J. e Jordan, P. (2003), Tumour-related alternative-spliced Rac1b is not regulated by Rho-GDI and exhibits selective downstream signalling. *J Biol Chem* **278**, 50442-50448.
- Matos, P., Oliveira, C., Velho, S., Gonçalves, V., da Costa, L., Moyer, M., Seruca, R. e Jordan, P. (2008), B-RafV600E cooperates with alternative spliced Rac1b to sustain colorectal cancer cell survival. *Gastroenterology*, **135**, 899-906.
- Matos, P., Skaug, J., Marques, B., Beck, S., Veríssimo, F., Gespach, C., Boavida, M.G., Scherer, S.W. e Jordan, P. (2000), Small GTPase Rac1: structure, localisation and expression of the human gene. *Biochem Biophys Res Commun* **277**, 741 – 51.
- Matsuo, Y., Ochi, N., Sawa, H., Yasuda, A., Takahashi, H., Funahashi, H., Takeyama, H., Tong, Z. e Guha, S. (2009), CXCL8/IL-8 and CXCL12/SDF-1 $\alpha$  co-operatively promote invasiveness and angiogenesis in pancreatic cancer. *Int. J. Cancer* **124**, 853-861.
- Michaloglou C., Vredeveld L., Mooi W. e Peeper D. (2008) BRAF<sup>E600</sup> in benign and malignant human tumours. *Oncogene* **27**, 877–895.
- Miki, H., Yamaguchi, H., Suetsugu, S. e Takenawa, T. (2000), IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling. *Nature* **408**, 732-735.
- Minoo, P., Moyer, M. e Jass, J. (2007), Role of BRAF-V600E in the serrated pathway of colorectal tumorigenesis. *J. Pathol.* **212**, 124-133.
- Moyer, M., Stauffer, J., Manzano, L., Tanzer, L., e Merriman, R. (1996), NCM460, A Normal Human Colon Mucosal Epithelial Cell Line. *In Vitro Cell Dev Biol: Animal* **32**, 315-317.
- Ormo, M., Cubitt, A., Kallio, K., Gross, L., Tsien, R. e Remington, S. (1996). Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science*, **273** (5280), 1392-1395;
- Prieur, A. e Peeper, D. (2008). Cellular senescence in vivo: a barrier to tumorigenesis. *Curr Opin Cell Biol* **20**, 150-155

Pritchard, C., Carragher, L., Aldridge, V., Giblett, S., Jin, H., Foster, C., Andreadi, C. e Kamata, T. (2007), Mouse models for BRAF-induced cancers. *Biochem. Soc. Trans.* **35**, 1329-33.

Purves, W., Orians, G., Heller, H. e Sadava, D. (1998), *Life – The science of biology* (5th edition). Sinauer Associates, Inc., U.S.A.;

Seruca, R., Velho, S., Oliveira, C., Leite, M., Matos, P. e Jordan, P. (2009), Unmasking the role of KRAS and BRAF pathways in MSI colorectal tumors. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **3**, 5-9.

Shen, L., Toyota, M., Kondo, Y., Lin, E., Zhang, L., Guo, Y., Hernandez, N., Chen, X., Ahmed, S., Konishi, K., Hamilton, S. e Issa, J. (2007), Integrated genetic and epigenetic analysis identifies three different subclasses of colon cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 18654-18659

Singh, A., Karnoub, A. E., Palmby, T. R., Lengyel, E., Sondek, J. e Der, C. J. (2004), Rac1b, a tumor associated, constitutively active Rac1 splice variant, promotes cellular transformation. *Oncogene*, **23** (58), 9369-9380.

Snover D., Jass J., Fenoglio-Preiser C. e Batts K. (2005), Serrated polyps of the large intestine: a morphologic and molecular review of an evolving concept. *Am. J. Clin. Pathol.* **124**, 80-91.

Song, N., Huang, Y., Shi, H., Yuan, S., Ding, Y., Song, X., Fu, Y. e Luo, Y. (2009), Overexpression of platelet-derived growth factor-BB increases tumor pericyte content via stromal-derived factor-1alpha/CXCR4 axis. *Cancer Res.* **69**, 6057-6064.

Wellbrock, C., Karasadires, M. e Marais, R. (2004), The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(11), 875-885

Wennerberg, K. e Der, C. J. (2004), Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J. Cell. Sci.*, **117**, 1301-1312.

Zlotnik, A. e Yoshie, O. (2000), Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* **12**, 121-127.

## 7 ANEXOS

### ANEXO I

**Tabela I:** *Primers* específicos para as sequências humanas codificantes dos vários genes em estudo. Na tabela constam a designação dos *primers*, a sua sequência e temperatura aproximada de desnaturação [ $T_m = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$ ].

Designação	Sequência	T <sub>m</sub>	Amplificação
RacEx3F	5' CCT CCC GGG GCA AAG ACA AGC C 3'	74°C	84 pb (Rac1)
Rac281R	5' CGG ACA TTT TCA AAT GAT GCA GG 3'	66°C	141 pb (Rac1b)
P14ARF-F	5' AGG GCA GCA GCC GCT TCC T 3'	64°C	127 pb (p14 AFR)
P14ARF-R	5' TGC ACG GGT CGG GTG AGA GT 3'	66°C	
INK4A-F	5' TAC GGT CGG AGG CCG ATC CA 3'	66°C	119 pb(p16INK4A)
INK4A-R	5' TGC ACG GGT CGG GTG AGA GT 3'	66°C	
CDKN2B-F	5' CTGCGGAATGCGCGAGGAGA 3'	66°C	170 pb(p15)
CDKN2B-R	5' TCATGACCTGGATCGCGCGC 3'	66°C	
Qpol2-F	5' CGC AAT GAG CAG AAC GGC GC 3'	66°C	118 pb (pol2)
Qpol2-R	5' TCT GCA TGG CAC GGG GCA AG 3'	66°C	
hIL8-F	5' GCA GCT CTG TGT GAA GGT GCA GTT 3'	74°C	140 pb (IL-8)
hIL8-R	5' TTG GCG CAG TGT GGT CCA CTC 3'	68°C	
PDGFB-F	5' TAC CTG CGT CTG GTC AGC GC 3'	66°C	139 pb (PDGFB)
PDGFB-R	5' ACT CGG CCC CAT CTT CCT CTC C 3'	68°C	
CXCR4-F	5' TCT GGG CAG TTG ATG CCG TGG 3'	68°C	151 pb (CXCR4)
CXCR4-R	5' TTG GTG GCG TGG ACG ATG GC 3'	66°C	

**Tabela II:** Delineamento da amplificação dos factores de senescência e das GTPases Rac1 e Rac1b a partir de cDNAs da linha celular de cancro colorectal, HT29 e da linha celular normal NCM460, sintetizados por RT-PCR. No programa de PCR são apenas descritos o número de ciclos e a temperatura de emparelhamento dos *primers* pois o restante programa é igual, inicia com 5 minutos a 94°C, depois seguem-se os ciclos onde temos 94°C 30s, T de emparelhamento 30s e 72°C 30s. No final dos ciclos existe uma extensão final de 5 minutos a 72°C

Transcrito	Mix por amostra	Quantidade cDNA (estimado a partir da quantidade de RNA usado na síntese)	Programa PCR
Rac1 e Rac1b	-Tampão B [1x]	50ng NCM 50ng SW480 e 50ng HT29	62° 32 ciclos
P14		50ng NCM	60° 32ciclos
P15	-0,02µM do primer forward	50ng NCM	60° 35 ciclos
P16		50ng NCM e 50ng CFBE	60° 40 ciclos
PolII	-0,02µM do primer reverse	50ng NCM, 50ng SW480, 50ng HT29 e 50ng HeLa	60°C 28 ciclos
IL8		50ng NCM e 50ng HT29	62° 35ciclos
PDGFB	-0,03U de <i>AmpliTaq</i> ® <i>DNA Polymerase</i>	50ng NCM e 50ng HT29	62° 38 ciclos
CXCR4		50ng NCM, 50ng HT29 e SW480	60°C 28ciclos

**Tabela III:** *Primers* utilizados no processo de sub-clonagem Apresenta-se a designação dos *primers* utilizados, a sua sequência e temperatura aproximada de desnaturação [ $T_m = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$ ].

Designação	Sequência	T <sub>m</sub>
M13	5' CAG GAA ACA GCT ATG AC	50°C
T7	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	56°C
pCMV5-1F	5' GGG ACT TTC CAA AAT GTC GTA	60°C
GFP-1F	5' ACT TCA AGA TCC GCC ACA ACA T	64°C
GFP-1R	5' AAC CTC TAC AAA TGT GGT ATG	60°C
Rac281-R	5' CGG ACA TTT TCA AAT GAT GCA GG	66 °C
Rac258-F	5' CCT GCA TCA TTT GAA AAT GTC CG	66°C
BRAF F	5'GAG CTC TGG CGG CGC TGA GCG GTG G	68°C
BRAR R	5'GTC GAC TCA GTG GAC AGG AAA CGC ACC	66°C
pPTuner F	5' ATG CCA CTC TCG TCT TCG AT	60°C
pPTuner R	5'TGA GTT TGG ACA AAC CAC AAC	60°C
CXCR4 APAR	5' GGG CCC TTA GCT GGA GTG AAA ACT TGA A	60°C
CXCR4 ECO F	5' GAA TTC ATG GAG GGG ATC AGT ATA TAC A	62°C
BRAF666F	5' GCA TGT GGA AGT GTT GGA GA	60°C
BRAF1681R	5' AAG TAA TCC ATG CCC TGT GC	60°C
CXCR4R	5' TTG GTG GCG TGG ACG ATG GC	66°C

**Tabela IV:** Anticorpos primários e secundários utilizados na análise por Western blot das amostras obtidas pelos protocolos de lise celular. Apresenta para cada amostra analisada, o tipo e marca de cada anticorpo utilizado e as respectivas diluições. rb – coelho, m – rato, gt – cabra.

Amostra	Anticorpo Primário	Anticorpo Secundário
Lises celulares de NCM e HT29	m- $\alpha$ -Tubulin (1:1000) Sigma Aldrich	Anticorpo de cabra anti-rato-HRP (Bio-Rad):gt- $\alpha$ -m (1:3000)
	m- $\alpha$ -BRaf (1:200) Santa Cruz	
	m- $\alpha$ -GFP (1:250) Roche	
	rb- $\alpha$ -Rac1b (1:1000) Millipore	Anticorpo de cabra anti-coelho-HRP (Bio-Rad):gt- $\alpha$ -rb (1:3000)

## **ANEXO II**

### **Composição dos tampões utilizados na técnica de PCR e na electroforese**

#### **Tampão B**

##### Stock – 40 ml

- 500 mM KCl
  - 100 mM Tris-HCl pH 9
  - 15 mM MgCl<sub>2</sub>
  - 40 mg Gelatina 0,1%
- Autoclavar

##### Alíquotas

- 2,5 ml Stock Tampão B
- 22,5 ml H<sub>2</sub>O bidestilada (ddH<sub>2</sub>O)
- 50 µl de cada dNTP (100 mM)

#### **TBE (10x) pH 8,0**

- 890 mM Tris
- 890 mM Ácido bórico
- 20 mM EDTA

### **Composição dos tampões utilizados nos procedimentos de lise celular**

#### ***Laemmli Sample Buffer SB(5x)***

- 200 mM Tris-HCl pH 6,8
- 25% Glicerol
- 11,25% SDS
- 500 mM DTT 5%
- 0,01% Azul de Bromofenol
- ddH<sub>2</sub>O

#### **SB II (2x)**

- 62.5 mM Tris-HCl, pH6.8
- 10% (w/v) Glycerol
- 2.5% (w/v) SDS
- 0.02% (w/v) Azul de Bromofenol

#### **Tampão de lise (NP-40)**

- 50 mM Tris-HCl pH 7,5 (filtrado)
- 100 mM NaCl (filtrado)
- 2 mM MgCl<sub>2</sub>
- 8,7% Glicerol
- 1% Nonidet P-40 (NP-40)
- Cocktail de Inibidores de Proteases (Sigma<sup>®</sup>)

### **Composição dos géis de poli-acrilamida**

#### ***Running – 10%***

- 2,45 ml H<sub>2</sub>O
- 1,25 ml *Lower Buffer*
- 1,25 ml Bis-Acrilamida 40%
- 50 µl SDS 10%
- 50 µl Persulfato de amónio (APS) 10%
- 2,5 µl TEMED

#### ***Stacking – 4%***

- 1,5 ml H<sub>2</sub>O
- 0,25 ml *Upper Buffer*
- 0,20 ml Bis-Acrilamida 40%
- 20 µl SDS 10%
- 40 µl APS 10%
- 2 µl TEMED

### Composição dos géis modificados

#### **Running – 10%**

- 1,95 ml H<sub>2</sub>O
- 2,25 ml *Lower Buffer*
- 3 ml Bis-Acrilamida 30%
- 90 µl Glicina
- 90 µl SDS 10%
- 90 µl Persulfato de amónio (APS) 10%
- 10 µl TEMED

#### **Lower Buffer**

- 1,5M Tris-HCl pH 6,8
- 20 ml HCl 37%

#### **Stacking – 4%**

- 3,5 ml H<sub>2</sub>O
- 1,5 ml *Upper Buffer*
- 0,80 ml Bis-Acrilamida 30%
- 90 µl Glicina
- 60 µl SDS 10%
- 90 µl APS 10%
- 10 µl TEMED

#### **Upper Buffer**

- 1,5M Tris-HCl pH 8,8
- 30 ml HCl 37%

### Composição dos tampões utilizados nos procedimentos de SDS-PAGE, Western blot e ECL

#### **Tampão SDS-PAGE (10x)**

- 25 g SDS
- 76 g Tris
- 360 g Glicina

#### **Tampão de transferência (25x)**

- 72,5 g Glicina
- 145 g Tris
- 9,3 g SDS

#### **Tampão de transferência modificado (10x)**

- 144 g Glicina
- 30 g Tris

#### **Azul de Coomassie**

- 1,25 g *Coomassie Brilliant Blue R-250*
- 225 ml MetOH
- 50 ml Ácido acético
- 225 ml H<sub>2</sub>O

#### **TBS (10x) pH 7,6**

- 151 g Tris
- 219 g NaCl
- ~ 70 ml HCl 37%

#### **ECL (para uma membrana)**

##### Solução 1

- 980 µl tampão ECL
- 5 µl Ácido Cumárico
- 15 µl Luminol

#### **Tampão SDS-PAGE (1x)**

- 100 ml SDS-PAGE *Buffer* 10x
- 900 ml H<sub>2</sub>O

#### **Tampão de transferência (1x)**

- 200 ml MetOH
- 40 ml *Blot Buffer* 25x
- 760 ml H<sub>2</sub>O

#### **Tampão de transferência modificado (1x)**

- 200 ml MetOH
- 100 ml *CFTR Buffer* 10x
- 700 ml H<sub>2</sub>O

#### **Solução Destain**

- 450 ml Metanol
- 100 ml Ácido Acético
- 450 ml H<sub>2</sub>O

#### **TBST (1x)**

- 100 ml TBS 10x
- 500 µl Triton X-100
- 900 ml H<sub>2</sub>O

##### Solução 2

- 1 ml tampão ECL
- 1 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>