

Estudo da influência de mutações na oncoproteína SERBP1 em células de câncer colorretal

Palavras-Chave: Câncer colorretal, SERBP1, oncoproteínas, mutações sítio-dirigidas

Autores(as):

Alessandro Locks Kawabata, FCF – UNICAMP

Prof. Dr. Prof. Dr. Jörg Kobarg, FCF – UNICAMP

Msc. Júlia Leite Cordeiro de Souza, FCF – UNICAMP

INTRODUÇÃO:

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), câncer é o nome dado para um grupo de doenças que se caracteriza pelo crescimento desordenado de células anormais, ultrapassando os limites típicos do tecido em que se encontram e espalhando-se para outros órgãos. Uma das causas desse crescimento reside nos eventos que levam a alteração na expressão gênica, como por exemplo uma mutação; essa alteração resulta no desequilíbrio de fatores que regulam eventos celulares importantes como a mitose e a apoptose, resultando no quadro citológico característico desta patologia [1][2]

A proteína SERBP1 (Serpine1 mRNA Binding Protein), alvo deste estudo, foi descrita como potencial oncoproteína nuclear intrinsecamente desordenada, que conserva dois domínios RGG e é capaz de ligar-se ao RNAm, alterando sua estrutura e conseqüentemente sua estabilidade e funcionalidade na célula. Seu primeiro alvo de ligação verificado foi o RNA do inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1 (PAI-1), e por isso também é denominada RNA PAI-1 binding protein ou PAI-RBP1. Além disso, pesquisas indicam que esse peptídeo possivelmente sofre modificações pós-traducionais, que podem ter influência sobre sua localização e função celular, como por exemplo, no processo de metilação de arginina via PMRT1, que resulta em uma alteração em sua localização entre o citoplasma e o núcleo; e no processo de sumoilação, que sugeriu sua participação na formação grânulos de estresse. [3] [4] [5] [6]

Avaliou-se ainda que, em geral, a SERBP1 comporta-se como um fator de repressão na expressão gênica. Diversos estudos demonstraram que sua superexpressão em células em cultivo leva a regulação negativa de determinados genes alvo ligados a fatores importantes na oncogênese. Alguns fatores indicam uma possível relação entre a SERBP1 e o controle dos processos de apoptose, resposta a dano celular e proliferação dentre eles estão: sua correlação com os níveis de PML-NBs (polimyelocytic leukemia nuclear bodies) e com o gene P53; sua influência nos níveis de RNAm de PGRMC1 (progesterone receptor membrane component 1) e no hormônio progesterona; ou ainda na regulação transcricional via modificações epigenéticas, na interação com a proteína de remodelagem de cromatina (CHD-3) e a ligação a histonas metiltransferases (HMT).[3] [7] [8] [9]

A superexpressão da SERBP1 em diferentes tecidos cancerosos já foi verificada em inúmeros estudos, principalmente em células tumorais em estágio avançado. Contudo, ainda que tenham sido indicadas correlações entre esse peptídeo e os processos de tumorigenicidade, progressão tumoral e resistência a drogas anticancerígenas, não se conhece exatamente seu mecanismo de ação nesses casos, sendo necessária maior investigação. [3]

METODOLOGIA

1. Análise *in silico*

Para a escolha da mutação alvo deste estudo foi consultado o banco de dados COSMIC (*Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*), de onde foi selecionada a mutação D350Y, visto que é verificada em células de câncer de cólon e é localizada no interior da RGG box da proteína. Já foi descrito na literatura que esta região é de grande importância para a ligação ao RNAm e, por isso, selecionou-se uma mutação que ocorre nela. A mutação corresponde a mudança de uma única base guanina para uma timina no gene da proteína, levando a mudança de um resíduo de aspartato para um de tirosina.[6] [10]

2. Mutagênese sítio dirigida

2.1 PCR

Para realização da reação de amplificação, foram utilizados o plasmídeo SERBP1-Flag como molde e a enzima Pfu DNA polymerase (Promega M7741), de acordo com as recomendações do fabricante. Os primers utilizados para a reação estão descritos na Tabela 1. Para facilitar a reação de anelamento, foi realizada adição de DMSO a cada eppendorf nas concentrações de 0%, 2%, 5% e 10%. Utilizou-se, ainda, um controle negativo sem a presença de polimerase para cada reação. O produto da reação foi então digerido com o uso da enzima DpnI (Biolabs R0176S) durante 1 hora à 37°C.

Tabela 1: primer utilizado para realizar a mutação D350Y

SENSE 5'-3'	ANTISSENSE 3'-5'
CGGAAGCCAGCAAATTATATAACGTCTCAG	GCCTTCGGTCGTTTAATATATTGCAGAGTC

Para assegurar o resultado, o produto da reação de PCR foi então utilizado para preparação de um gel agarose 1% (figura 1).

2.2 Transformação

Após análise, o material resultante da PCR também foi utilizado para realizar a transformação em bactérias XL1-Blue super competentes. Uma alíquota de 50 µl bactérias em conjunto com 1 µl de plasmídeo foram submetidas a banho de gelo por 30 min, choque térmico de 42°C por 30 seg e então novamente ao banho de gelo por 1 min, após ser inserido 1mL de meio LB, as amostras foram colocadas no shaker e submetidas a uma agitação constante de 300 rpm, a uma temperatura de 37°C, por 1 h. Em seguida, o material foi centrifugado à 2600g a temperatura ambiente por 2 min, e então teve a maior parte do seu sobrenadante desprezado. Por fim, o pellet remanescente foi ressuscitado e semeado em placas contendo LB-ágar com ampicilina 100 µg/ml, as quais permaneceram em uma estufa à 37°C overnight (16-18 h), visando o crescimento apenas de colônias que apresentem o plasmídeo com gene de resistência ao antibiótico e com a mutação de interesse.

2.3 Extração e purificação do plasmídeo

Após crescimento das colônias, foi realizado um pré-inóculo, onde uma das colônias foi isolada da placa e inserida em um falcon com meio LB e ampicilina na mesma concentração anterior em um shaker à 42°C e 200 rpm, onde permaneceu overnight. No dia seguinte, o conteúdo do falcon foi colocado na centrífuga a 14000 rpm durante 2 min. após a qual o sobrenadante foi desprezado, mantendo apenas um pellet ao fundo do falcon. As bactérias restantes no falcon foram ressuscitadas com 300 µl de uma solução P1 (Tris-HCl, pH= 8, 50 mM; EDTA, pH 8, 10 mM), juntamente com a adição de 10 µl de RNase, em seguida foi vortexada. Ocorreu, então, a adição de 300 µl de uma solução P2 (NaOH, 200 mM; SDS 1%) para aumentar a porosidade da membrana bacteriana, e a solução resultante foi vertida suavemente para mistura e incubada à temperatura ambiente. Após alguns minutos, 300 µl de uma solução P3 foi adicionada (Acetato de potássio 3M, pH 5,5 ajustado com ácido acético glacial,), formando um precipitado branco à medida que o recipiente foi novamente sendo suavemente vertido para devida homogeneização.

A mistura foi então centrifugada a 14000 rpm, na temperatura de 4°C, por 10 min, para então ter seu sobrenadante coletado. O mesmo processo de centrifugação e dispensação de sobrenadante foi repetido mais uma vez, e então foi adicionado isopropanol, levando à precipitação do plasmídeo no fundo do recipiente. A mistura foi novamente centrifugada e, então, teve seu sobrenadante descartado. Adicionou-se, então, etanol 70% resfriado em geladeira e a solução foi centrifugada sob as mesmas condições anteriores. Por fim, deixou-se o etanol evaporar da solução e foi adicionado 30 µl de água milli-q autoclavada para ressuscitar o DNA presente no recipiente.

O material genético da amostra foi devidamente quantificado e enviado para a empresa Omikka para sequenciamento, uma vez que apresentava tanto razão 260/280 adequada. Posteriormente, a análise do sequenciamento foi realizada pelos softwares *BioEdit Sequence Alignment Editor* e *SnapGene* (figura 2).

3. Expressão em célula de câncer de cólon (Western Blott)

Após verificação da presença da mutação no vetor, foi realizada sua transfecção em uma linhagem de células de câncer de cólon HCT 116 cultivada no laboratório, com o objetivo posterior de confirmar a expressão da proteína mutada, utilizando uma linhagem selvagem e um controle knockout como comparação.

As células foram cultivadas em garrafas até atingirem confluência aproximada de 80% em uma estufa à 37 °C, antes de serem quantificadas utilizando o corante azul de tripan e a câmara de Neubauer, e transferidas para placas de cultivo de 60 mm na concentração de 10^5 células/ml. No dia seguinte ao plaqueamento, foi realizada a transfecção em uma das placas da linhagem knockout. Uma alíquota foi preparada (2 µg plasmídeo purificado, 6 µg do carreador Polietilenoimina (PEI) e 197µl de meio Opti-Mem) incubadas por 20 minutos e então adicionada na placa.

Cerca de 72h após a transfecção, foi realizada lise e quantificação do conteúdo proteico extraído. Para isso, foi adicionado 100 µL de um tampão de lise (Tris-HCl, NaCl, EDTA, SDS, Deoxicolato de sódio, Inibidor de protease, DNase e Triton, X-100) sobre o pellet formado em um falcon após tripsinização e centrifugação à 450g por 5min de cada uma das três placas (selvagem, knockout e mutada). O conteúdo foi então submetido a um banho de gelo (30 min) e centrifugado (13000 rpm, 4°C, 30 min). O sobrenadante foi então quantificado pelo método Bradford.

Para realização do Western Blot, foram preparados um gel de separação de acrilamida 12% e um um gel de entrada de acrilamida 4%, onde 50µg de proteína foram adicionados em cada poço. O gel foi adicionado a uma cuba de eletroforese contendo um tampão de corrida (Tris 250mM, Glicina 1,92M, SDS 1%). O experimento foi conduzido sob 100 V por 35min e depois 120 V por 65min, aproximadamente. O gel resultante foi então transferido para uma membrana de nitrocelulose na presença de um tampão de transferência (Tris 250mM, Glicina 1,92M, Etanol 20%) por 1h40min a 220 mA. A membrana foi então transferida para um novo recipiente contendo um tampão de bloqueio (TBST 0,1%, Leite 5%), onde permaneceu por 1h. Após essa etapa, foram feitas lavagens com TBS-T 0,01% para retirar o tampão de bloqueio.

Foi então adicionado o anticorpo primário anti-SERBP-1 (1:250, Sigma-Aldrich HPA020559; 2% BSA, 0,02% de azida em TBS-T) sob a membrana (4°C, overnight sob agitação). O excesso de anticorpo foi retirado do recipiente e feitas sucessivas lavagens utilizando TBS-T 0,01%, posteriormente, adicionou-se o anticorpo secundário anti-rabbit (1:5000 Sigma A0545; 5% leite em TBS-T). Após 1 hora sob agitação, a membrana foi revelada sob quimioluminescência. Para controle endógeno, foi utilizado o anticorpo primário beta actina (1:1000, Abcam AB8226; 2% BSA, 0,02% de azida em TBS-T) sob a membrana. Após a incubação, o anticorpo foi retirado e foram realizadas lavagens utilizando TBS-T 0,01%, sendo então adicionado o anticorpo secundário anti-mouse (1:5000 Calbiochem 401253; 5% leite em TBS-T). Após 1h da adição do anticorpo secundário, foi feita uma última lavagem com TBST e a membrana foi revelada novamente por quimioluminescência gerando uma segunda imagem.

4. Análise da proteína mutante sobre a proliferação celular (CCK-8)

Após confirmação da expressão da proteína contendo a mutação, realizou-se o ensaio de proliferação celular CCK-8, comparando a variação da proliferação celular em diferentes tempos de transfecção. Em uma garrafa contendo células HCT116 *knockout* para o gene *Serbp1*, cultivou-se em estufa (37°C), até atingir aproximadamente 80% de confluência. Essas células foram então quantificadas e transferidas para uma placa de 96 poços na concentração de 2.10^4 células/ml em cada poço. Foram feitos três tipos de amostra em triplicata: knockout para o gene *Serbp1*, transfectadas com vetor contendo o gene *Serbp1* com a mutação D350Y, e transfectadas com vetor contendo o gene *Serbp1* selvagem. No dia seguinte ao plaqueamento das células knockout, foi realizada a transfecção de todas os poços contendo células com a mutação e com o gene selvagem (0,2 µg de plasmídeo purificado, 0,6 µg PEI e 25µL de solução contendo 150mM de NaCl estéril). Após 24, 48 e 72h da transfecção, realizou-se a análise das respectivas amostras, adicionando-se, cada vez, quantidade recomendada do reagente do kit comercial (Boster AR1160) e, após 1h30min, realizando a análise em espectrofotômetro. Para análise dos dados, foi realizado o teste de ANOVA, utilizando o software GraphpadPrism.

RESULTADOS

Purificação do Plasmídeo

O gel de agarose confirmou a presença da banda característica do vetor amplificado na altura aproximada esperada de 6000 pares de base, bem como a ausência dessa banda no controle sem polimerase. Foi possível observar bandas nas reações realizadas com as concentrações de 0%, 2% e 5% de DMSO (figura 1).

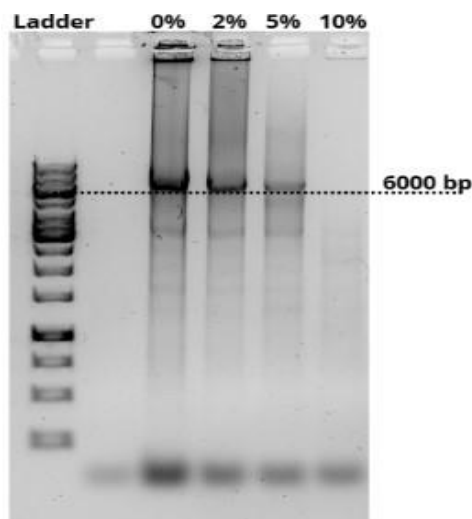
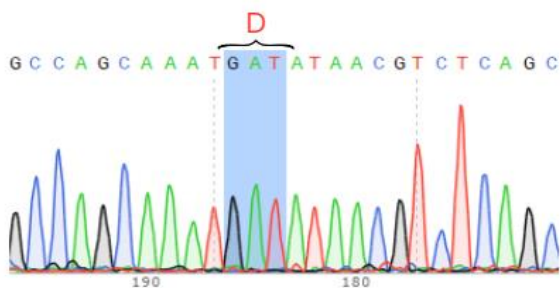


Figura 1 - Produto da reação de PCR comparativamente à DNA ladder (fotografia coletada por ChemiDoc). Da direita para esquerda na figura, tem-se a coluna da DNA ladder, a coluna C contendo o controle sem polimerase, e as colunas correspondentes às reações utilizando 0, 2, 5 e 10% de DMSO, respectivamente. De acordo com o padrão disposto na DNA ladder, as bandas localizadas nas colunas de 0, 2 e 5% de DMSO correspondem a 6 kb.

Sequenciamento

A)



B)

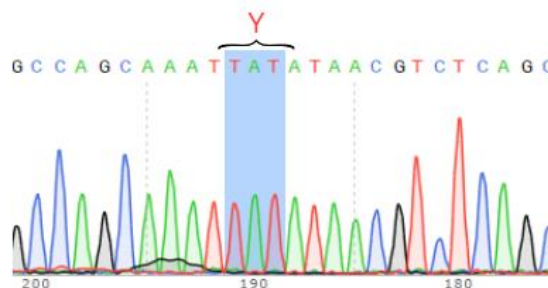


Figura 2 - Sequenciamento do plasmídeo SERBP1-Flag. Na figura A, o sequenciamento de um fragmento da proteína selvagem, e em B um fragmento da proteína contendo a mutação. As letras correspondem às bases do DNA. O resíduo (GAT) destacado pela coluna em azul corresponde ao aspartato (D), e o resíduo (TAT) destacado pela coluna azul na figura da direita corresponde à tirosina (Y)

O resultado do sequenciamento assegurou a ocorrência da mutação sítio dirigida no local adequado, bem como a ausência de demais mutações. Foi possível observar que, em relação à proteína selvagem, a amostra enviada continha o plasmídeo mutado e que não foram observadas mutações adicionais nem deleções indicando o sucesso da mutação pontual (figura 2).

Western Blot

Ambas imagens obtidas por quimioluminescência, utilizando anticorpo beta actina e SERBP1, foram alinhadas para melhor comparação dos resultados (figura3).

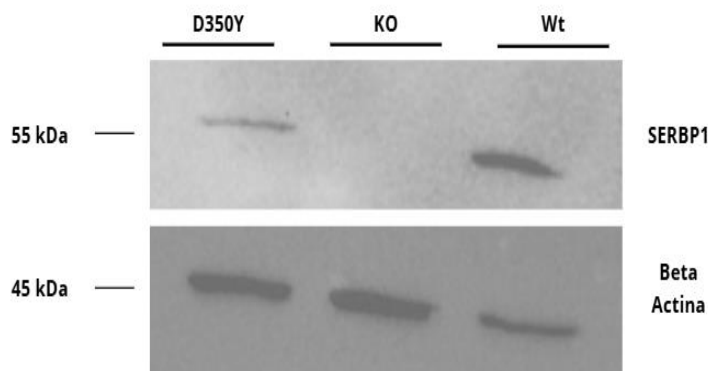


Figura 3 - Quimioluminescência referente ao western blott de células HCT116. As bandas na imagem são referentes a ligação dos anticorpos SERBP1 e Beta Actina, separadas em cada imagem pelo peso molecular calculado em relação ao padrão. As imagens foram alinhadas de modo a cada coluna representar uma linhagem celular: células transfectadas com o plasmídeo contendo a mutação de interesse (D350Y), knockout para o gene SERBP1(KO), selvagem (Wt).

CCK-8

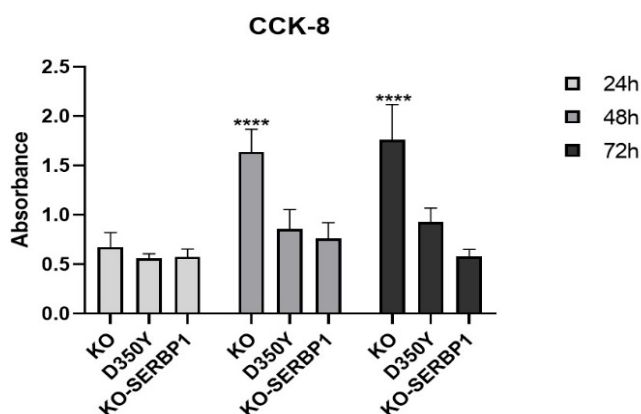


Figura 4 – Ensaio de proliferação celular CCK-8. O gráfico mostra a comparação na concentração celular entre as amostras da linhagem knockout (KO), mutante (D350Y) e selvagem (KO-SERBP1) nos tempos de transfecção de 24, 48 e 72h. Amostras que apresentaram $p < 0.0001$ em relação à respectiva amostra de células selvagem (****).

A análise gráfica foi obtida através do cálculo da ANOVA, utilizando as amostras de célula selvagem como referência. As amostras knockout de 48 e 72h foram as únicas que apresentaram variância significativa no teste em relação à selvagem.

CONCLUSÕES:

A célula HCT116 transfectada com o plasmídeo contendo a mutação D350Y expressou a proteína mutante de forma satisfatória. A partir do sequenciamento do plasmídeo, foi possível confirmar o sucesso da mutagênese sítio-dirigida, além disso, foi possível confirmar a expressão da proteína modificada no tempo de 72h nas células selvagem e mutante, mas não na linhagem knockout, conforme esperado. O knockout do gene alvo pode ser confirmado pela comparação da expressão da proteína endógena beta actina, que apresentou expressão constante em todas as linhagens.

O ensaio de proliferação celular não indicou diferença significativa na proliferação celular entre as linhagens que expressam a proteína em sua forma selvagem e com a mutação alvo deste estudo. Observou-se que, quando comparadas às células KO-SERBP1, as células KO apresentaram uma diferença significativa na proliferação celular.

Para melhor estudo da influência da mutação alvo, a proposta de condução deste estudo envolve o uso da luciferase como gene-repórter para avaliar se a mutação interfere na capacidade da proteína de se ligar ao RNAm.

BIBLIOGRAFIA:

- [1] ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Câncer. Genebra: WHO, 2022. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
- [2] DEKKER, Evelien et al. Colorectal cancer. *The Lancet*, v. 394, n. 10207, p. 1467-1480, 2019. ISSN 0140-6736.
- [3] COLLETTI C, Melo-Hanchuk TD, da Silva FRM, Saito, Kobarg J. Complex interactomes and post-translational modifications of the regulatory proteins HBP4 and SERBP1 suggest pleiotropic cellular functions. *World J Biol Chem*. 2019 Nov 21;10(3):44-64.
- [4] PASSOS DO, Bressan GC, Nery FC, Kobarg J. Ki-1/57 interacts with PRMT1 and is a substrate for arginine methylation. *FEBS J* 2006; 273: 3946-3961
- [5] LEMOS TA, Kobarg J. CGI-55 interacts with nuclear proteins and co-localizes to p80-coilin positive-coiled bodies in the nucleus. *Cell Biochem Biophys* 2006; 44: 463-474
- [6] THANDAPANI, Palaniraja et al. Defining the RGG/RG motif. *Molecular cell*, v. 50, n. 5, p. 613-623, 20.
- [7] BRESSAN GC, Silva JC, Borges JC, Dos Passos DO, Ramos CH, Torriani IL, Kobarg J. Human regulatory protein Ki-1/57 has characteristics of an intrinsically unstructured protein. *J Proteome Res* 2008; 7: 4465- 4474.
- [8] CHANG HR, Munkhjargal A, Kim MJ, Park SY, Jung E, Ryu JH, Yang Y, Lim JS, Kim Y. The functional roles of PML nuclear bodies in genome maintenance. *Mutat Res* 2018; 809: 99-107
- [9] INTLEKLOFER KA, Petersen SL. Distribution of mRNAs encoding classical progesterin receptor, progesterone membrane components 1 and 2, serpine mRNA binding protein 1, and progesterin and ADIPOQ receptor family members 7 and 8 in rat forebrain. *Neuroscience* 2011; 172: 55-65
- [10] CHONG, Andrew P. et al. RGG/RG Motif Regions in RNA Binding and Phase Separation. *Journal of molecular biology*, nov. 2018, v.430, p.4650-4665.