

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia

Juliana do Couto Vieira Carvalho dos Santos

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DAS ISOFORMAS DE SUBUNIDADE C
DA V-ATPase NO CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE ESÔFAGO**

Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Rocha Façanha

CAMPOS DOS GOYTACAZES

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia

Juliana do Couto Vieira Carvalho dos Santos

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DAS ISOFORMAS DE SUBUNIDADE C
DA V-ATPase NO CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE ESÔFAGO**

Tese apresentada ao Programa de Biociências e Biotecnologia como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Rocha Façanha

CAMPOS DOS GOYTACAZES

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do Centro de Biociências e Biotecnologia
da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

712 / 2018

Santos, Juliana do Couto Vieira Carvalho dos
Expressão diferencial das isoformas de subunidade C da V-ATPase no
carcinoma epidermóide de esôfago / Juliana do Couto Vieira Carvalho dos
Santos. -- Campos dos Goytacazes, 2018.
88 [1] f. : il.

Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) – Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Biociências e
Biotecnologia. Laboratório de Biologia Celular e Tecidual.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador: Façanha, Arnaldo Rocha

Bibliografia: f. 80-87

1. *ATP6V1C1* 2. *ATP6V1C2* 3. Biomarcador tumoral 4. Câncer de esôfago
5. V-ATPase I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro II. Título

571.6

S237as

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia

Autor: Juliana do Couto Vieira Carvalho dos Santos

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DAS ISOFORMAS DE
SUBUNIDADE C DA V-ATPASE NO CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE
ESÔFAGO**

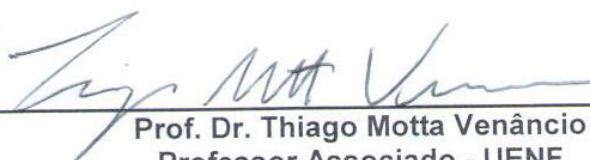
Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Rocha Façanha

Aprovada em: 27/03/2018

EXAMINADORES:



Prof. Dr.ª Elena Lassounskaia
Professor Associado - UENF



Prof. Dr. Thiago Motta Venâncio
Professor Associado - UENF



Dr.ª. Nathália de Oliveira Meireles da Costa
Pesquisador Visitante - INCA

**CAMPOS DOS GOYTACAZES
2018**

DEDICATÓRIA

A todos pacientes envolvidos neste estudo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, o professor Arnoldo, por ter me acolhido em seu grupo e por ter sido fundamental em minha formação acadêmica e principalmente, por ser exemplo de pessoa, líder e profissional, em que muito me espelho.

A todo o grupo do Programa de Carcinogênese Molecular do INCA, em especial ao Dr. Luis Felipe por sua colaboração fundamental, disponibilizando toda a estrutura e apoio intelectual científico para a execução desta Tese. Em especial também à Dr^a Tatiana Almeida pelas discussões científicas e ajuda com as informações dos pacientes.

Ao Dr. Pedro Nicolau por todo suporte com os bancos de dados de microarranjo e TCGA.

Ao Dr. Evenilton Costa pelo auxílio com as análises estrutural de proteínas.

Ao Dr. Vagner Bernardo pela avaliação das lâminas de imunohistoquímica.

A todo o grupo ARF pelo conviveu diário, pelo muito que me ensinaram, em especial sobre a V-ATPase, e pelos momentos de descontração que tornaram esses quatro anos mais leves. Um agradecimento especial à Heloysa Bouzada, que em muitos momentos foi meu braço direito.

Ao Diego Sá, por todo companheirismo e apoio emocional e intelectual desde o início dessa jornada.

Ao Frederico Firme, pelo companheirismo estando presente e disposto a me ajudar, principalmente na fase final desta Tese.

A minha família por sempre me apoiarem e torcerem por mim em minhas escolhas e por muitas vezes entenderem minha ausência.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estimativa da taxa de incidência de câncer de esôfago por 100,000 indivíduos de ambos os sexos (ajustada por idade).....	1
Figura 2: Taxas de incidência e mortalidade mundiais dos tipos de neoplasias mais incidentes em ambos os sexos..	2
Figura 3: Imagem representativa de como se determina o estadiamento no CE e correlação entre o estadiamento e sobrevida dos pacientes.	5
Figura 4: Esquema da V-ATPase apresentando as múltiplas subunidades que constituem os domínios V0 e V1	9
Figura 5: Mecanismo de ação proposto para a V-ATPase.....	10
Figura 6: Perfil de expressão dos genes da V-ATPase em 15 amostras pareadas de CEE (CEE e tecido normal adjacente ao tumor).....	17
Figura 7: Expressão dos genes que codificam o domínio catalítico da V-ATPase....	19
Figura 8: Genes de subunidades/isoformas da V-ATPase diferencialmente expressos comparando CEE tumores, tecido circundante normal e mucosa esofágica saudável.....	20
Figura 9: Expressão dos genes das isoformas de subunidade a da V-ATPase no CEE.....	22
Figura 10: Expressão dos genes das isoformas de subunidade C da V-ATPase no CEE.....	23
Figura 11: Um modelo proposto para associação e dissociação dos complexos da V-ATPase.....	28
Figura 12: Regulação da atividade da V-ATPase através da reversível dissociação dos seus domínios V1 e Vo, o que resulta na inativação do complexo..	29
Figura 13: Expressão de ATP6V1C1 por RT-qPCR.	41
Figura 14: Expressão de ATP6V1C2-v1 por RT-qPCR.	43
Figura 15: Expressão de ATP6V1C2-v1 por RT-qPCR.	44
Figura 16: Correlação entre as expressões dos genes das isoformas C	45
Figura 17: Curvas Kaplan–Meier de sobrevida global apresentada pelos pacientes com CEE de acordo com a expressão.....	46
Figura 18: Associação entre o estadiamento patológico e a expressão.....	46
Figura 19: Análise do poder discriminatório entre amostras de CEE e tecido normal adjacente por Curva ROC (Receiver Operating Characteristic..	48

Figura 20: Expressão de mRNA de isoformas C em diferentes subtipos histológicos de câncer de esôfago.....	50
Figura 21: Expressão das isoforma C1 no CEE.....	54
Figura 22: Expressão das isoformas C2a,b. no CEE.	55
Figura 23: Associação entre o estadiamento patológico e a expressão.....	56
Figura 24: Curvas Kaplan–Meier de sobrevida global apresentada pelos pacientes com CEE de acordo com a expressão.....	57
Figura 25: Predição da estrutura 3D das isoformas de subunidade C.....	59
Figura 26: Docking de proteínas entre proposto modelo da isoforma hC2a e estruturas já resolvidas	59
Figura 27: Alinhamento de sequências comparando o domínio “profilin-like” descrito para a subunit B (caixa vermelha) e sequência similar presente nas isoformas de subinidade C.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Fatores de Risco para o câncer esofágico.....	3
Tabela 2: Os genes em humanos e leveduras que codificam as diferentes subunidades da V-ATPase.. ..	11
Tabela 3: Informações sócio-clínico-patológicas dos pacientes com CEE.....	16
Tabela 4: Variação da expressão (fold-change) dos genes da V-ATPase entre CEE e tecido normal adjacente.	18
Tabela 5: Condições das reações de PCR: sequências dos oligonucleotídeos específicos e tamanho em pares de bases dos fragmentos amplificados.....	34
Tabela 6: Informações clinicopatológicas dos pacientes incluídos nas análises por qPCR.. ..	39
Tabela 7: Informações clinico-patológicas dos pacientes incluídos nas análises por imunohistoquímica. N.D. Dados indisponíveis no prontuário.....	52
Tabela 8: Avaliação da expressão das isoforma C em tecidos de CCE.....	53
Tabela 9: Análises do impacto da expressão da isoforma C1 na sobrevida global dos pacientes com CEE.....	57
Tabela 10: Similaridades entre isoformas C.....	58
Tabela 11: <i>Motifs</i> alvo de serina/treonina quinase/fosfatase presentes na região de peptídeos adicionais na isoforma hC2a	60
Tabela 12: <i>Motifs</i> que reconhece serina/treonina fosforiladas presentes na região de peptídeos adicionais na isoforma hC2a.....	61

LISTA DE ABREVIATURA

µm	Micrômetro
Aa	Aminoácido
As	Antissenso
ADE	Adenocarcinoma de esôfago
CCE	Carcinoma de epidermóide de esôfago
CEP-INCA	Comitê de ética em pesquisa do INCA
DAB	Diaminobenzidina 3,3'
DIPAT	Divisão de Patologia do INCA
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
Fold change	Medida de Variação de expressão
INCA	Instituto Nacional de Câncer
mL	Mililitro
mM	Milimolar
N	Número
N.D.	Dado não disponível no prontuário
Ng	Nanograma
ng/µL	Nanograma por microlitro
Nm	Nanômetro
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real
pH	Potencial hidrogeniônico
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro
Rpm	Rotação por minuto
S	Senso
TBS	Tampão Tris Salino
TNM	T – tamanho; N - acometimento de linfonodo; M - metástase à distância
U/mL	Unidades por mililitro

Sumário

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1. Câncer de esôfago.....	1
1.1.1. Fatores etiológicos.....	2
1.1.2. Estadiamento, Diagnóstico e Tratamento do CE.....	4
1.1.3. Alterações moleculares no CEE.....	6
1.1.4. As V-ATPases como alvo molecular promissor em câncer.....	6
2. CAPITULO I: Padrões de Expressão de Genes da V-ATPase no Carcinoma Epidermóide de Esôfago.....	8
2.1. INTRODUÇÃO.....	8
2.1.1. As V-ATPases.....	8
Figura 5: Mecanismo de ação proposto para a V-ATPase. Próton em vermelho, subunidades estacionárias em laranja e subunidades rotativas em azul. Adaptado de (Cipriano, Wang et al. 2008).	10
2.1.2. Múltiplas isoformas de subunidades da V-ATPase.....	10
2.2. OBJETIVO.....	13
2.2.1. Objetivos Específicos:.....	13
2.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
2.3.1. Dados de Expressão dos genes V-ATPase.....	14
2.3.2. Análises estatísticas.....	14
2.4. RESULTADOS.....	15
2.4.1. Expressão dos genes da V-ATPase por análise em larga escala.....	15
2.5. DISCUSSÃO.....	24
3. CAPITULO II: Expressão Diferencial de ATP6V1C1 e ATP6V1C2 no Carcinoma Epidermóide de Esôfago.....	27
3.1. INTRODUÇÃO.....	27
3.1.1. A subunidade C da V-ATPase.....	27
3.2. OBJETIVO.....	30
3.2.1. Objetivos Específicos:.....	30
3.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.3.1. Pacientes e amostras.....	31
3.3.2. Extração de RNA.....	31
3.3.3. Quantificação e determinação da pureza das amostras de RNA.....	32
3.3.4. Reação de Transcrição Reversa (RT).....	32

3.3.5.	PCR (Polymerase Chain Reaction) em tempo real (qPCR).....	32
3.3.6.	Desenhos dos pares de oligonucleotídeos	33
3.3.7.	Imunohistoquímica.....	34
3.3.8.	Expressão de <i>ATP6V1C1</i> e <i>ATP6V1C2</i> despositada no banco de dados The Cancer Genome Atlas (TCGA)	35
3.3.9.	Análise de domínios conservados, sítios de interação proteína-proteína, construção dos modelos 3D proteicos e os ensaios de docking proteína-proteína	36
3.3.10.	Análise estatística	37
3.4.	RESULTADOS.....	38
3.4.1.	EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS TRANSCRITOS DOS GENES <i>ATP6V1C1</i> E <i>ATP6V1C2</i> NO CCE	38
3.4.2.	EXPRESSÃO PROTEICA DAS ISOFORMAS C1 E C2a,b NO CEE	51
3.4.3.	ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DAS ISOFORMAS DE SUBUNIDADE C DA V-ATPASE.....	57
3.5.	DISCUSSÃO	62
3.6.	CONCLUSÕES.....	66
4.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

RESUMO

Palavras chave: *ATP6V1C1*, *ATP6V1C2*, biomacador em câncer, câncer de esôfago, V-ATPase

O carcinoma de epidermóide de esôfago (CEE) tem diagnóstico tardio, comportamento agressivo e baixa sobrevida, exigindo novos alvos para detecção precoce, estratificação de risco, evolução da doença e terapia. As V-ATPases são bombas de prótons constituídas por diferentes subunidades e isoformas que têm papéis centrais na homeostase e sinalização do pH. Alterações de expressão, atividade e localização dessas bombas complexas foram associadas a distúrbios nos processos celulares característicos de várias patologias, incluindo tumores. A fim de proporcionar uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na carcinogênese esofágica, avaliamos o padrão de expressão de genes da V-ATPase no CEE. A expressão dos genes da V-ATPase foi obtida por dados de microarranjo previamente realizado, revelando um padrão de expressão diferencial na composição de isoformas da holoenzima no CEE em comparação com tecido adjacente normal e à mucosa esofágica de indivíduos saudáveis. Os genes que codificam as isoformas da subunidade C, *ATP6V1C1* e *ATP6V1C2*, exibiram marcante diferença de expressão no CEE e tiveram sua expressão validada por RT-qPCR em amostras de CEE e respectivos tecidos normais adjacentes ao tumor. O gene *ATP6V1C1*, que codifica a isoforma *C1*, mostrou-se superexpresso, enquanto o que o gene *ATP6V1C2*, que por *splincing* alternativo codifica as isoformas *C2a* e *C2b*, teve sua expressão reduzida em amostras de CEE em comparação com a respectiva mucosa normal. Os níveis de expressão de *ATP6V1C1* e *ATP6V1C2* foram capazes de discriminar com precisão os grupos de CEE dos tecidos normais ao redor do tumor. Em adição, usando um banco de dados de sequenciamento de RNA, mostramos que o padrão diferencial de expressão de isoformas C ocorre no câncer esofágico independentemente do tipo histológico, sendo observado não só no CEE, mas também no adenocarcinoma de esôfago. Análise da expressão das isoformas C por imunohistoquímica, revelou que uma maior expressão da isoforma *C1* é correlacionada com uma melhor sobrevida global dos pacientes. Finalmente, propomos a estrutura tridimensional de isoformas C mostrando uma sequência peptídica adicional na isoforma *C2a* que é alvo para diferentes quinases e fosfatases. Este estudo revelou uma assinatura molecular clara para a composição de subunidades/isoformas da V-ATPase expressas no câncer esofágico e destaca as isoformas de subunidade C como alvos potenciais para o desenvolvimento de novos biomarcadores e possivelmente novas terapias.

ABSTRACT

Keywords: *ATP6V1C1*, *ATP6V1C2*, biomarker cancer, esophageal cancer, V-ATPase

Esophageal Squamous Cell Carcinoma (ESCC) has late diagnosis, aggressive behavior and poor survival, requiring new targets for early detection, risk stratification, disease evolution and therapy. V-ATPases are proton pumps composed of different subunits and isoforms that have central roles in pH homeostasis and signaling. Changes in such a complex enzyme have been associated with disturbances in cellular processes characteristic of several pathogenesis, including cancers. In order to provide a better understanding of the molecular mechanisms involved in esophageal carcinogenesis, we evaluated the V-ATPase expression pattern in the ESCC. V-ATPase genes expression was obtained by a microarray expression previously performed, revealing a differential expression pattern for the isoforms composition of the holoenzymes in the ESCC compared to histologically normal tumor surrounding tissue and esophageal mucosa from healthy individuals. Among the differentially expressed isoforms in tumors, *ATP6V1C1* and *ATP6V1C2*, encoding the three V-ATPase C isoforms, exhibited striking changes and their expression was validated by qRT-PCR in paired ESCC samples of tumors and respective histologically normal surrounding tissues. The *ATP6V1C1* gene was upregulated, while *ATP6V1C2* was downregulated in ESCC samples compared to the respective normal mucosa, and a distinctive balance was described for the *ATP6V1C1* and *ATP6V1C2* expression levels which prove to accurately discriminate ESCC groups from tumor surrounding tissues. In addition, using an RNA sequencing database, we show that balance of isoform C occurs in esophageal cancer regardless of histological type, being observed not only in CEE, but also in esophageal adenocarcinoma. Analysis of C isoforms expression by immunohistochemistry, revealed that a higher expression of C1 isoform is correlated with a better overall survival of the patients. Finally, we propose the three-dimensional structure of C isoforms showing an additional peptide sequence in the C2a isoform that is target for different kinases and phosphatases. This study revealed a clear molecular signature to the V-ATPase subunit/isoforms assembled composition expressed in esophageal cancers and highlights the V-ATPase C subunits isoforms as potential targets to development of new biomarkers and therapies.

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Câncer de esôfago

O câncer de esôfago (CE) é um dos tipos de câncer mais frequentes e mais agressivos no mundo. Dentre todas as neoplasias, que podem atingir homens e mulheres, o CE é a oitava mais incidente, com 456.000 novos casos estimados em 2012. O CE acomete 2,4 vezes mais homens do que mulheres. Esse tumor é o sétimo tipo de câncer mais incidente entre os homens e o décimo terceiro mais incidente entre as mulheres (sem considerar os tumores da pele não melanoma). O centro-leste da Ásia e leste da África são as regiões do mundo que apresentam as mais elevadas taxas de incidência do CE. Além disso, cerca de 80% dos casos em todo o mundo ocorrem em regiões menos desenvolvidas (Figura 1) (Ferlay, Soerjomataram et al. 2015).

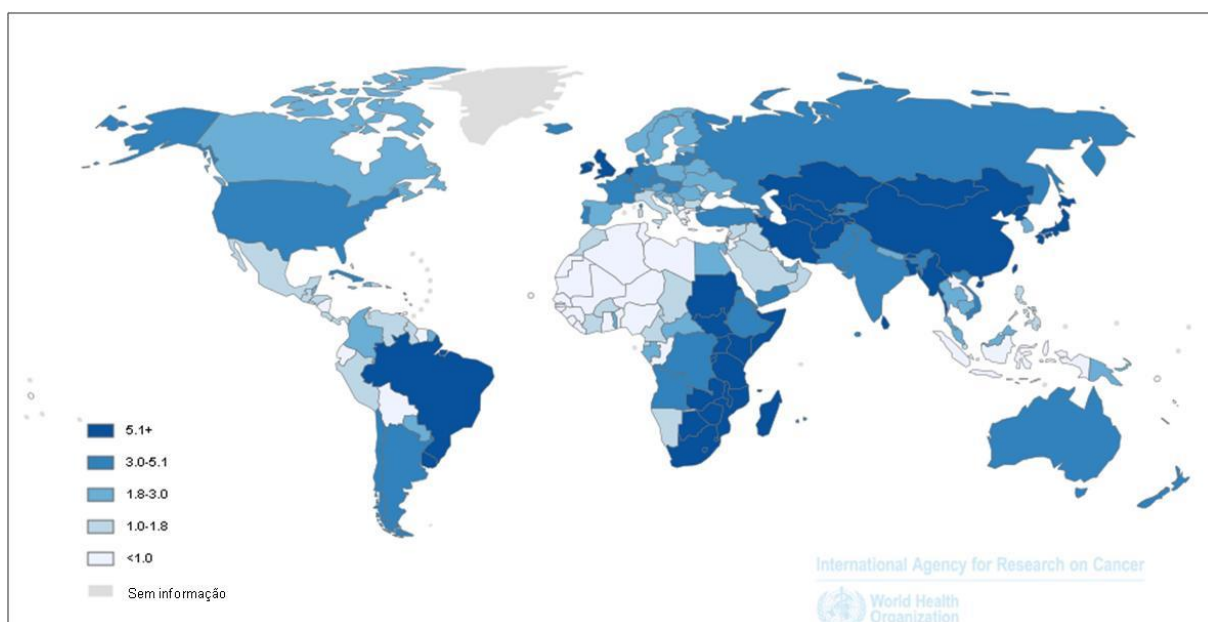


Figura 1: Estimativa da taxa de incidência de câncer de esôfago por 100,000 indivíduos de ambos os sexos (ajustada por idade). Destaque para as principais regiões afetadas por este tumor nos tons mais escuros de azul (IARC/WHO 2014).

O Brasil está entre as regiões do mundo que apresentam as mais elevadas taxas de incidência do CE (Fig. 2). Estima-se para cada ano do biênio 2018-2019, 8.240 novos casos de CE entre homens e 2.550 entre mulheres. As taxas de incidência de CE variam de acordo com a região do país, sendo mais elevadas na região Sul (17,10 casos por 100 mil), seguida pela região Sudeste (8,04 casos por 100 mil) (INCA 2018).

O CE é a sexta causa mais comum de morte por câncer no mundo, considerando todos os tumores que podem atingir homens e mulheres. Essa doença apresenta prognóstico muito ruim, sendo a relação entre mortalidade e incidência de 0,88 (Ferlay, Soerjomataram et al. 2015). Como pode ser observado na figura 2, as taxas de incidência desse tumor (456.000 novos casos estimados em 2012) são muito próximas as taxas de mortalidade (400,000 mortes estimadas em 2012), demonstrando a alta letalidade desse tipo de câncer.

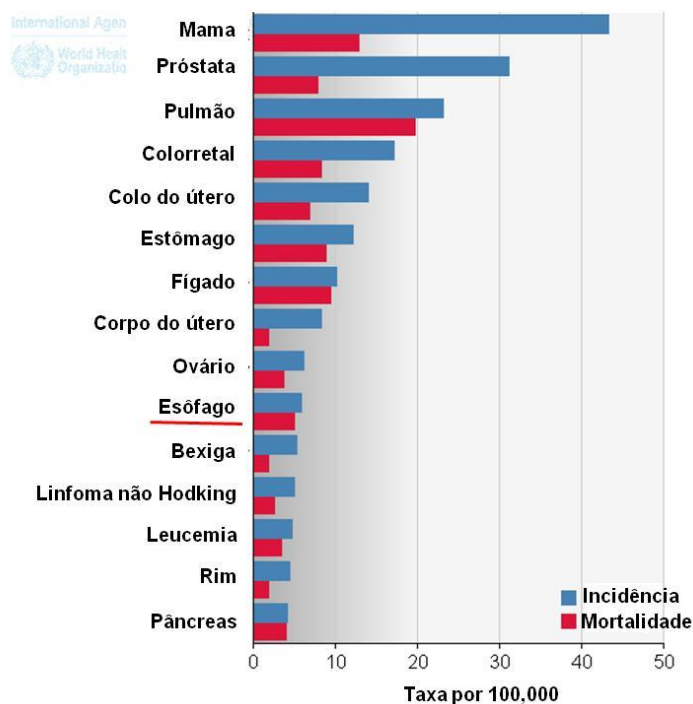


Figura 2: Taxas de incidência e mortalidade mundiais dos tipos de neoplasias mais incidentes em ambos os sexos. Em destaque o câncer de esôfago que foi sublinhado com uma linha vermelha. Adaptado de:(IARC/WHO 2014).

Os tipos de câncer de esôfago mais prevalentes são classificados histologicamente como carcinoma epidermóide e adenocarcinoma (Rustgi and El-Serag 2014, Arnold, Soerjomataram et al. 2015). O carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) é o subtipo histológico mais frequente, responsável por quase 90% dos casos de CE no mundo. O CEE apresenta sua maior incidência em países em desenvolvimento, incluindo o Brasil, onde este também é o subtipo de CE mais (Parkin, Bray et al. 2005, Rustgi and El-Serag 2014, Arnold, Soerjomataram et al. 2015).

1.1.1. Fatores etiológicos

Diferentes fatores etiológicos foram associados com as elevadas taxas de incidência do CE observadas em algumas regiões. O adenocarcinoma de esôfago (ADE)

é principalmente associado à metaplasia de Barrett, ao refluxo gastroesfágico e à obesidade. O tabagismo é um fator associado à ambos tipos histológicos, ADE e CEE (Bird-Lieberman and Fitzgerald 2009, Schweigert, Dubecz et al. 2013, Rustgi and El-Serag 2014).

Nos países ocidentais, o consumo de tabaco e álcool são os fatores de risco mais relevantes para o CEE, havendo um efeito multiplicativo desses dois fatores (Castellsague, Munoz et al. 1999). No sul da América do Sul, incluindo o sul do Brasil, que é a região do país que apresenta as mais altas taxas de incidência do CE, o consumo da erva-mate (popularmente conhecida como chimarrão) em altas temperaturas e em grandes quantidades tem sido apontado como um importante agente etiológico para o CEE (Vassallo, Correa et al. 1985, Victora, Munoz et al. 1987, Rolon, Castellsague et al. 1995, Castellsague, Munoz et al. 2000, Sewram, De Stefani et al. 2003). A tabela 1 apresenta diferentes fatores de riscos associados ao ADE e CEE.

Tabela 1: Fatores de Risco para o câncer esofágico.

Fator de Risco	CEE	ADE
Consumo de tabaco	+++	++
Consumo de álcool	+++	-
Esôfago de Barrett	-	++++
Refluxo crônico	-	+++
Obesidade	-	++
Baixo poder econômico	++	-
Acalásia	+++	-
Injúria cáustica no esôfago	++++	-
Síndrome de Plummer–Vinson	++++	-
Tilose	++++	-
Histórico de câncer de cabeça e pescoço	++++	-
Histórico de câncer de mama tratado com radioterapia	+++	+++
Consumo frequente de bebidas em altas temperaturas	+	-

CEE – Carcinoma epidermóide de esôfago; ADE – Adenocarcinoma de esôfago. Os sinais de positivo indicam um aumento no risco em um fator de: + - menos que 2; ++ - 2 a 4; +++ - 4 a 8 ; ++++ - mais que 8. Adaptado de (Enzinger and Mayer 2003).

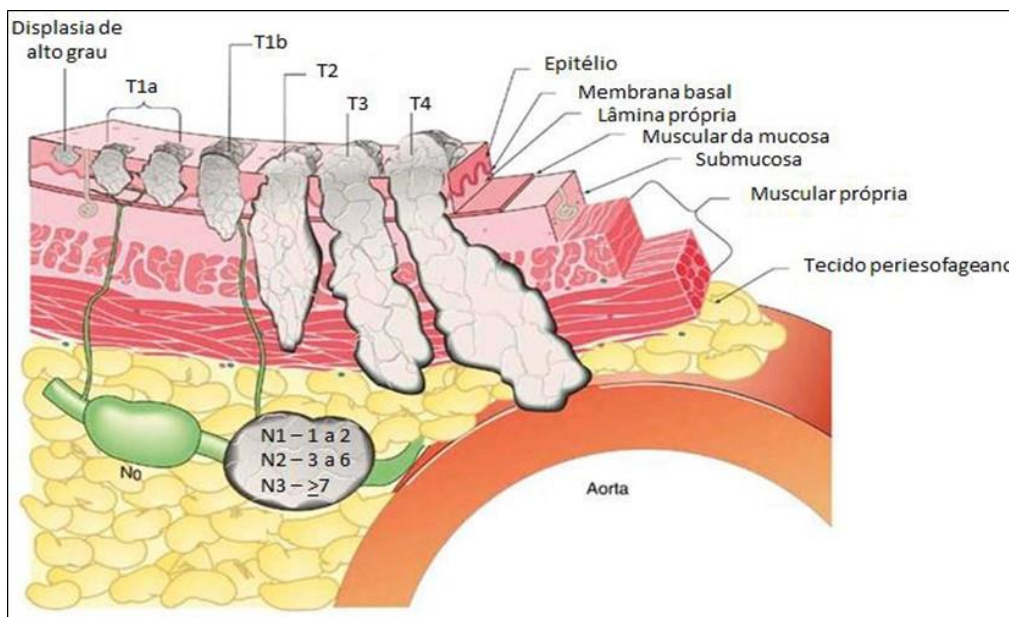
1.1.2. Estadiamento, Diagnóstico e Tratamento do CE

Os estadiamentos de 0 a IV são utilizadas para classificar o CE caracterizado por grau de invasão tumoral, comprometimento linfonodal e metástase. Tumores em estágio 0 são tumores limitados a mucosa e que não invadem a lâmina própria. Os tumores do estágio I invadem a lâmina própria sem acometimento de linfonodos ou metástase à distância. Os tumores do estágio II se estendem para a camada muscular sem (IIA) ou com envolvimento de linfonodos (IIB). Tumores de estágio III invadem através da camada muscular e acometem os linfonodos ou outras estruturas. Tumores do estágio IV se espalham para linfonodos ou órgãos distantes (Fig. 3) (Rustgi and El-Serag 2014).

O diagnóstico do CE é principalmente realizado através de endoscopia ou esofagografia. A tomografia computadorizada e PET com 18-Fluorodeoxiglicose (FDG-PET) são atualmente os procedimentos de escolha para avaliar a ressecabilidade potencial do tumor primário com sua drenagem linfática locorregional, bem como a presença de metástases à distância (Schweigert, Dubecz et al. 2013). No entanto, devido sua natureza expansiva do esôfago, o esse tumor é assintomático até o fechamento parcial ou total da luz do esôfago, quando começa a ocorrer disfagia e a invasão de estruturas adjacentes é necessária para desencadear a dor. Assim, o diagnóstico é em sua maioria em estádios avançados da doença (Rustgi and El-Serag 2014).

Alta letalidade observada no CE é consequência, principalmente, do diagnóstico tardio e o tratamento é dependente do estadiamento do tumor. A ressecção endoscópica pode ser realizada como alternativa à esofagectomia em tumores precoces limitados à mucosa. A esofagectomia é considerada o procedimento padrão para todas as neoplasias malignas sem metástases linfonodais. Nos casos de acometimento de linfonodos, a quimioterapia ou quimiorradioterapia neoadjuvante seguida de esofagectomia é a abordagem mais comum. Se os pacientes com tumores potencialmente operável não estiverem aptos para uma cirurgia de grande porte devido ao comprometimento do estado funcional, a quimiorradioterapia definitiva é o procedimento de escolha. E em casos de doença avançada ou metástases à distância, medidas paliativas são indicadas. Porém, uma vez que os sintomas só começam a aparecer em estádios bem avançados da doença, sendo tumores invasivos que podem ter metástases, o prognóstico é pouco

favorável na maioria dos casos (Enzinger and Mayer 2003, Gamliel and Krasna 2005, Schweigert, Dubecz et al. 2013, Rustgi and El-Serag 2014). Devido a esse panorama devastador, o CE representa um problema de saúde pública de grande relevância. Compreender os mecanismos moleculares envolvidos na carcinogênese esofágica pode auxiliar na identificação de potenciais biomarcadores que possam auxiliar na detecção precoce, estratificação de risco e prognóstico, auxiliando a conduta clínica, bem como na identificação de novos alvos terapêuticos.



Estadiamento	Sobrevida em 5 anos (%)
0	>95
I	50 - 80
II	40 - 10
III	10 - 15
IV	<5

Figura 3: Imagem representativa de como se determina o estadiamento no CE e correlação entre o estadiamento e sobrevida dos pacientes. T = Tamanho do tumor; N = acometimento de linfonodos. Adaptado de (Rice, Blackstone et al. 2010)

Uma vez que o CEE é o tipo histológico notavelmente predominante, a problemática dos tumores esofágicos é principalmente atribuída a esse tipo de tumor e devido a isso será o foco principal deste estudo.

1.1.3. Alterações moleculares no CEE

As mutações no gene supressor de tumor *TP53* são as alterações mais frequentes no CEE, estando presente em aproximadamente 45% dos tumores e é uma alteração precoce, uma vez que pode ser detectada também no tecido esofágico normal circundante ao tumor (Olivier, Eeles et al. 2002, Petitjean, Mathe et al. 2007, Rossini, de Almeida Simao et al. 2010). Além disso, outras alterações moleculares foram descritas em populações brasileiras, como hipometilação do promotor de *BCL3*, um proto-oncogene; hipermetilação do promotor de *TFF1*, um proteína que pode proteger a mucosa de insultos; hipometilação de retrotransposons como *LINE1* e elementos Alu; perda de expressão de *SPRR3*, um marcador de diferenciação epitelial; e maior expressão de *IL-6*, uma citocina envolvida em inflamação (Lima, Hernandez-Vargas et al. 2011, Simão, Souza-Santos et al. 2011, da Costa, Soares Lima et al. 2013).

1.1.4. As V-ATPases como alvo molecular promissor em câncer

As V-ATPases, superexpressas na membrana plasmática de células tumorais, tem ganhado destaque na área oncológica por induzirem uma desregulação do pH intra e extracelular. A desregulação do pH é uma característica adaptativa da maioria dos tipos de câncer, independentemente da sua origem genética ou tecidual. Um pH intracelular neutro/levemente alcalino é permissivo à proliferação celular e evasão da apoptose. A diminuição do pH extracelular favorece a evasão da resposta imune contra o tumor, promove o remodelamento da matriz extracelular e estimula proteases ativadas por ácido, facilitando a invasão e disseminação das células tumorais (Webb, Chimenti et al. 2011). De fato, tais bombas de prótons tem sido associadas à diferentes processos característicos de células tumorais, como invasão e metástase, resistência à drogas, indução de angiogênese, modulação do sistema imune, reprogramação do metabolismo energético e aumento de proliferação (Stransky, Cotter et al. 2016, Pamarthy, Kulshrestha et al. 2018).

Além disso, as V-ATPases participam em diferentes vias de sinalização, como vias de Notch e Wnt/ β -catenina (Stransky, Cotter et al. 2016, Pamarthy, Kulshrestha et al. 2018) que são envolvidas no processo de metástase. A inibição da V-ATPase aumenta a ligação da subunidade *c* ao domínio N-terminal de HIF1- α . Desta forma, a subunidade *c* compete com pVHL (que se liga a HIF conduzindo-o a degradação) pela ligação com HIF1- α , resultando no acúmulo deste fator de transcrição (Lim,

Park et al. 2007) que é envolvido na desregulação metabólica observada em células tumorais (Denko 2008). Além disso, em lisossomos, a V-ATPase participa de forma fundamental da ativação de mTOR induzida por aminoácido, sendo a V-ATPase um sensor da disponibilidade de aminoácidos no lisossomo (Zoncu, Bar-Peled et al. 2011). A proteína mTOR é frequentemente encontrada ativada de forma aberrante em células tumorais, favorecendo processos de proliferação e sobrevivência celular (Menon and Manning 2008).

Uma vez que a V-ATPase está associada a diferentes processos celulares frequentemente alterados em cânceres, entender as bases estruturais e funcionais moleculares dessas bombas iônicas em tumores deverá fornecer uma melhor compreensão de sua participação na tumorigênese e na metástase, o que poderá levar a melhores estratégias de tratamento, manejo clínico e detecção.

2. CAPÍTULO I: Padrões de Expressão de Genes da V-ATPase no Carcinoma Epidermóide de Esôfago

2.1. INTRODUÇÃO

2.1.1. As V-ATPases

As V-ATPases transportam H^+ com gasto de ATP e desempenham importante papel na acidificação de organelas como lisossomos, complexo de Golgi, endossomos e vesículas secretoras, através da extrusão de prótons do citoplasma para o lúmen dessas organelas. As V-ATPases participam diferentes processos celulares, como por exemplo, endocitose mediada por receptores, o tráfego de proteínas e fusão de membranas. Também são expressas na membrana plasmática de células especializadas, como osteoclastos, células renais, epidídimo e macrófagos, onde essas enzimas transportam o próton do citosol para o meio extracelular. Além disso, células tumorais também expressam V-ATPase na membrana plasmática (Nishi and Forgac 2002, Forgac 2007, Cipriano, Wang et al. 2008).

As V-ATPases são compostas por 14 diferentes subunidades, que são organizadas em um domínio transmembranar de hidrólise de ATP (V_o) e um domínio citoplasmático de translocação de prótons (V_1), (Casey, Grinstein et al. 2010). A estrutura das V-ATPases são notavelmente conservadas ao longo da evolução (Gogarten, Starke et al. 1992) (Figura 4). O domínio V_1 é constituído pelas isoformas A-H. Já o domínio V_o em humanos, é formado pelas subunidades c, c', a, d e 'e'. A subunidade c' presente em leveduras não está presente em humanos, porém esses últimos expressam duas subunidades acessórias, Ac45 e M8-9, que são ausentes em leveduras (Marshansky, Rubinstein et al. 2014).

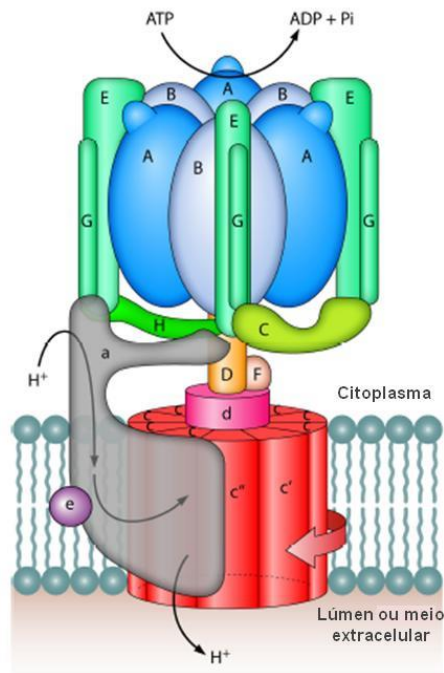


Figura 4: Esquema da V-ATPase apresentando as múltiplas subunidades que constituem os domínios V0 e V1. Adaptado de:(Parra, Chan et al. 2014)

As subunidades A e B formam o sítio de ligação e hidrólise de ATP. As hastes central e periféricas conectam os domínios V₁ e V₀. Essas hastes tem funções distintas no mecanismo rotativo através do qual a V-ATPase acopla a hidrólise de ATP para o transporte de prótons. A haste central (d, F e D) serve como um rotor que acopla a energia que é liberada a partir da hidrólise de ATP para a rotação do anel de subunidades proteolípídicas (c₄₋₅ e c''). O anel de subunidades proteolípídicas gira em relação a subunidade a, que é mantida fixa em relação a A₃B₃ pelas hastes periféricas. As três hastes periféricas (E e G), em conjunto com as subunidades C, H, e domínio N-terminal de a, impedem a rotação de A₃B₃ durante a hidrólise de ATP e, portanto, têm função de estator. Os prótons entram a partir do lado citoplasmático da membrana através do hemi-canal na subunidade a e se ligam a resíduos de ácido glutâmico na subunidade c, que está alinhada com o hemi-canal. Como o anel proteolítico gira, a forma protonada do ácido glutâmico viaja através da bicamada lipídica, retorna para a subunidade a e alinha com o segundo hemi-canal (o do lúmen). O resíduo Arg-735 na subunidade a promove a desprotonação do glutamato e o próton é liberado do hemi-canal para o lúmen ou meio extracelular (Forgac 2007, Cipriano, Wang et al. 2008, Parra, Chan et al. 2014). A figura 5 demonstra o mecanismo de ação proposto para a V-ATPase.

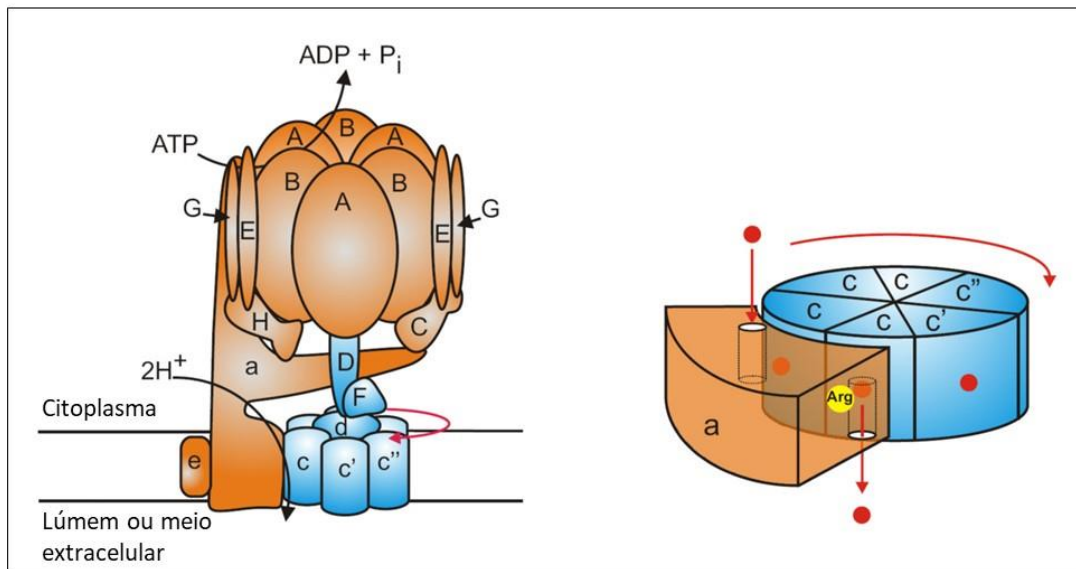


Figura 5: Mecanismo de ação proposto para a V-ATPase. Próton em vermelho, subunidades estacionárias em laranja e subunidades rotativas em azul. Adaptado de (Cipriano, Wang et al. 2008).

2.1.2. Múltiplas isoformas de subunidades da V-ATPase

Em levedura apenas a subunidade *a* é codificada por mais do que um gene, dando origem a duas isoformas. No entanto, em mamíferos há a expressão de uma variedade de isoformas de subunidades da V-ATPase. Os mamíferos expressam quatro isoformas de subunidade *a* (*a1-a4*), três isoformas de subunidade *C* (*C1, C2a* e *C2b*), duas isoformas de subunidade *B* (*B1* e *B2*), entre outras subunidades que apresentam isoformas diferentes. A tabela 2 apresenta os genes que codificam as diferentes subunidades da V-ATPase em humanos e também apresenta os genes em levedura, que é um modelo em que a bomba prótons foi mais estudada.

Tabela 2: Os genes em humanos e leveduras que codificam as diferentes subunidades da V-ATPase. Adaptado de: (Forgac 2007, Marshansky, Rubinstein et al. 2014)

Subunidade	Gene humano	Cromossomo	kDa	Gene Levedura
A	ATP6V1A1	3q13.31	70	VMA1
B	ATP6V1B1	2p13.1	56/58	VMA2
	ATP6V1B2	8p21.3		
C	ATP6V1C1	8q22.3	42	VMA5
	ATP6V1C2	2		
D	ATP6V1D	14q23-q24.2	34	VMA8
E	ATP6V1E1	22q11.1	31	VMA4
	ATP6V1E2	2p21		
F	ATP6V1F	7q32	14	VMA7
G	ATP6V1G1	9q32	13	VMA10
	ATP6V1G2	6p21.3		
	ATP6V1G3	1q31.3		
H	ATP6V1H	8q11.2	50/57	VMA13
a	ATP6V0A1	17q21	100/116	VPH1 (vacúolo); STV1 (golgi)
	ATP6V0A2	12q24.31		
	TCIRG1	11q13.2		
	ATP6V0A4	7q34		
c	ATP6V0C	16p13.3	16	VMA3
c'	não tem em mamífero	não tem em mamífero	17	VMA11
c''	ATP6V0B	1p32.3	21	VMA16
d	ATP6V0D1	16q22.1	38	VMA6
	ATP6V0D2	8		
e	ATP6V0E1	5q35.1	9	VMA9
	ATP6V0E2	7q36.1		
Ac45	ATP6AP1	Xq28	45	não tem em levedura
M8-P	ATP6AP2	Xp11.4		

Porém, para a maioria das subunidades, as especificidades funcionais das diferentes isoformas não são conhecidas, sendo a existência dessas múltiplas isoformas principalmente associada às necessidades específicas de tecidos especializados, observando-se a prevalência de expressão de uma ou outra isoforma dependendo do tecido (Forgac 2007). Por exemplo, células renais expressam predominantemente as isoformas *a4*, *B1*, *C2b*, *d2* e *G3*. No entanto, as isoformas *C1*, *G1* e *d1* são expressas de maneira ubíqua e a isoforma *G2*

predominantemente expressa em cérebro (Smith, Borthwick et al. 2002, Sun-Wada, Murata et al. 2003, Sun-Wada, Yoshimizu et al. 2003, Wagner, Finberg et al. 2004). As especificidades funcionais de diferentes isoformas de uma mesma subunidade são conhecidas apenas para as isoformas *a*, descritas como responsáveis pelo direcionamento da V-ATPase para diferentes membranas celulares (Kawasaki-Nishi, Bowers et al. 2001), com *a1* e *a2* direcionando para membranas intracelulares, enquanto *a3* e *a4* direcionando a bomba para a membrana plasmática (Morel, Dedieu et al. 2003, Toyomura, Murata et al. 2003, Wagner, Finberg et al. 2004, Toei, Saum et al. 2010, Capecchi and Forgac 2013). Além disso, também foi demonstrado que as V-ATPases de leveduras contendo isoformas *a* distintas diferem na eficiência de acoplamento e na regulação enzimática por associação-dissociação dos domínios V_1 - V_o (Kawasaki-Nishi, Nishi et al. 2001).

Uma vez que a V-ATPase desempenha papéis fundamentais em vários processos celulares, a existência de múltiplas isoformas de uma mesma subunidade pode sugerir diferentes conformações dessa enzima associadas a tipos específicos de células, incluindo células tumorais. Ou seja, é possível que células tumorais apresentem V-ATPases constituídas de um determinado padrão de isoformas que direcionem a bomba para processos celulares que favoreçam a evolução tumoral. Assim, identificar conformações específicas das V-ATPases tumorais e determinar as especificidades funcionais moduladas pelas diferentes isoformas, pode vir a alicerçar o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos e testes diagnóstico/prognósticos tendo como marcadores moleculares tais isoformas específicas.

2.2. OBJETIVO

Identificar padrões de expressão de isoformas de subunidades da V-ATPase no carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) propondo singularidades estruturais de tais bombas relacionadas à transformação celular e à evolução do tumor.

2.2.1. Objetivos Específicos:

- 1- Identificar padrões de expressão diferencial de genes da V-ATPase no CEE;
- 2- Identificar potenciais alvos para o uso como biomarcadores de prognóstico e de diagnóstico precoce do CEE;

2.3. MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1. Reanálise de dados de Expressão dos genes V-ATPase

A expressão de cada um dos 25 genes V-ATPase foi extraída a partir dos dados de expressão em larga escala por microarranjo realizado por Nicolau-Neto e colaboradores (2018) e depositados no GEO Accession Browser (número de acesso: GSE75241 e GSE75243). Tal microarranjo utilizou o Chip Human Exon 1.0 ST, da plataforma Affymetrix, e comparou 5 amostras de tecido esofágico saudável de paciente sem câncer e 15 amostras pareadas de CEE e mucosa normal adjacente ao tumor. Genes foram considerados diferencialmente expressos quando valores $p < 0,005$.

2.3.2. Análises estatísticas

Para a comparação de três ou mais grupos, *one-way ANOVA* or *Kruskal-Wallis test* e pós teste de *Dunn's* foi usado. As análises foram realizadas utilizando o GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software, USA) e as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

2.4. RESULTADOS

2.4.1. Expressão dos genes da V-ATPase

A expressão dos 25 genes da V-ATPase foi obtida por uma reanálise utilizando um banco de dados de microarrajo (Nicolau-Neto, 2018). As informações dos pacientes com CEE que participaram da análise por microarrajo são apresentadas de forma resumida na tabela 3. Uma análise de agrupamento hierárquico não supervisionado mostrou que o CEE apresenta uma expressão de genes da V-ATPase diferente do tecido esofágico normal adjacente ao tumor, segregando claramente esses dois grupos de tecidos e sugerindo um padrão de expressão da V-ATPase específica no tumor (Fig. 6). A tabela 4 apresenta a variação de expressão de cada gene da V-ATPase comparando CEE e tecido normal adjacente.

Tabela 3: Informações sócio-clínico-patológicas dos pacientes com CEE.

Informações Sócio-clínico-patológicas	n	(%)
Gênero		
Masculino	10	66,66
Feminino	5	33,33
Idade (anos)		
	Mediana	Amplitude
Homens	58	(46-73)
Mulheres	61	(53-79)
Total	61	(46-79)
Consumo de Álcool		
		(%)
Não	1	7,14
Sim	13	92,86
N.D. ¹	1	
Consumo de Tabaco		
		(%)
Não	2	14,29
Sim	12	85,71
N.D.	1	
Sítio de localização		
Terço Inferior	2	13,33
Terço Médio	11	73,33
Terço Superior	2	13,33
Estádio Patológico		
I	1	8,33
II	3	25,00
III	6	50,00
IV	2	16,67
N.D. ¹	3	
Grau de diferenciação		
Bem	1	6,66
Moderadamente	8	53,33
Pouco	6	40
Tamanho do tumor		
I	2	18,18
II	0	0
III	8	72,73
IV	1	9,09
N.D.	4	
Metástase em linfonodo		
Sim	8	53,33
Não	3	20
N.D.	4	26,66
Metástase a distância		
Sim	2	16,67
Não	10	83,33
N.D.	3	
Status de sobrevida		
Vivo	3	20
Morto	12	80
Total	15	100%

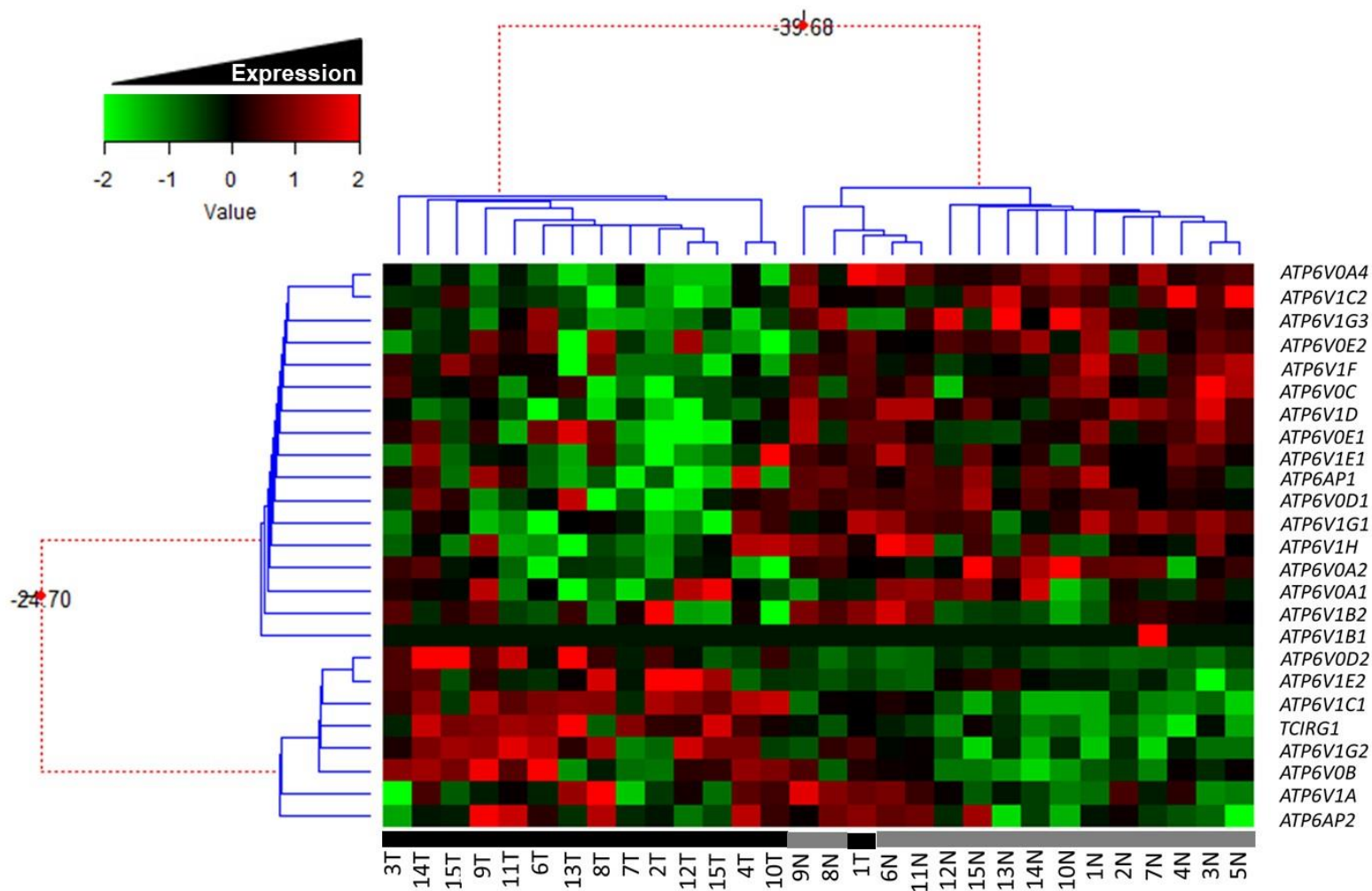


Figura 6: Perfil de expressão dos genes da V-ATPase em 15 amostras pareadas de CEE (CEE e tecido normal adjacente ao tumor). Análise de agrupamento hierárquico claramente segrega amostras de tumor e mucosa normal adjacente. Cada coluna representa uma amostra individual e cada linha um gene da V-ATPase. Verde indica os genes com expressão reduzida e em vermelho os genes com aumento de expressão. N e barra cinza = amostra de tecido normal adjacente ao tumor; T e barra preta = amostras de tumor.

Tabela 4: Variação da expressão (fold-change) dos genes da V-ATPase entre CEE e tecido normal adjacente.

Gene	Fold Change	Valor de P	cluster ID
<i>ATP6V1A1</i>	-1	0.78	2636589
<i>ATP6V1B1</i>	-1	0.79	2487918
<i>ATP6V1B2</i>	-1,08	0.45	3088544
<i>ATP6V1C1</i>	2,79	0.000001	3110171
<i>ATP6V1C2</i>	-1,28	0.000004	2469575
<i>ATP6V1D</i>	1,27	0.01	3569200
<i>ATP6V1E1</i>	-1,28	0.06	3951887
<i>ATP6V1E2</i>	1,07	0.009	2551651
<i>ATP6V1F</i>	-1,07	0.078	3023211
<i>ATP6V1G1</i>	-1,18	0.0010	3186191
<i>ATP6V1G2</i>	1,21	0.0003	2949038
<i>ATP6V1G3</i>	-1,19	0.001232	2449922
<i>ATP6V1H</i>	-1,22	0.0479	3135452
<i>ATP6V0A1</i>	-1,09	0.55	3721718
<i>ATP6V0A2</i>	-1,14	0.003	3436021
<i>ATP6V0A3 ou TCIRG1</i>	1,53	0.000037	3337390
<i>ATP6V0A4</i>	-2,76	0.00015	3075381
<i>ATP6V0C</i>	-1,1	0.01	3644887
<i>ATP6V0B</i>	1.43	0.0031	2333658
<i>ATP6V0D1</i>	-1,17	0.00269	3695699
<i>ATP6V0D2</i>	1,30	0.0009	3105749
<i>ATP6V0E1</i>	-1,04	0.02	2841284
<i>ATP6V0E2</i>	-1,07	0.1485	3031181
<i>ATP6AP1</i>	-1,20	0.019	3996381
<i>ATP6AP2</i>	1,12	0.254	3974556

*Genes foram considerados diferencialmente expressos quando $p < 0,005$.

As subunidades *A* e *B*, que constituem o domínio catalítico da V-ATPase, não apresentaram alterações de expressão significativas (*ATP6V1A*: 1 fold change; *ATP6V1B1*: 1 fold change; *ATP6V1B2*: -1.08 fold change) (Tab. 2 e Fig. 7). Entre as subunidades diferencialmente expressas, a subunidade *c* (*ATP6V0B*), que compõe as subunidades do anel de proteolípidos, exibiu uma maior expressão em amostras de CEE do que nos tecidos normais. Ainda mais interessantes foram as mudanças encontradas entre a expressão das isoformas de uma mesma subunidade, observadas nas subunidades *d* e *G*, onde as isoformas *d2* (*ATP6V0D2*) e *G2* (*ATP6V1G2*) foram mais expressas no tumor e as isoformas *d1*, *G1* e *G3* (*ATP6V0D1*, *ATP6V1G1* e *ATP6V1G3*, respectivamente) foram menos expressas no tumor em comparação com a mucosa normal adjacente (Fig. 8).

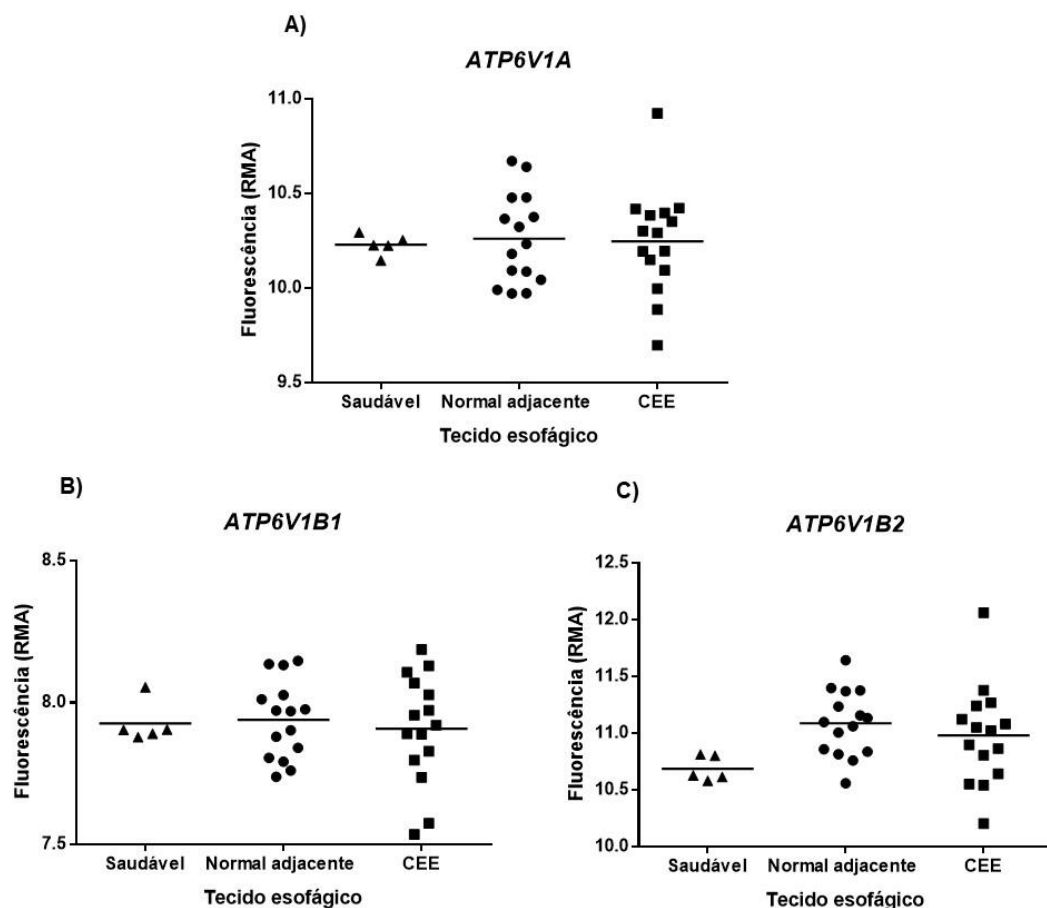


Figura 7: Dados de expressão por microarranjo dos genes que codificam o domínio catalítico da V-ATPase. A) *ATP6V1A*, B) *ATP6V1B1* e C) *ATP6V1B2* no CEE, na mucosa normal adjacente e na mucosa saudável. Nenhuma diferença estatística foi encontrada nos três tecidos para os genes que codificam as subunidades do domínio catalítico.

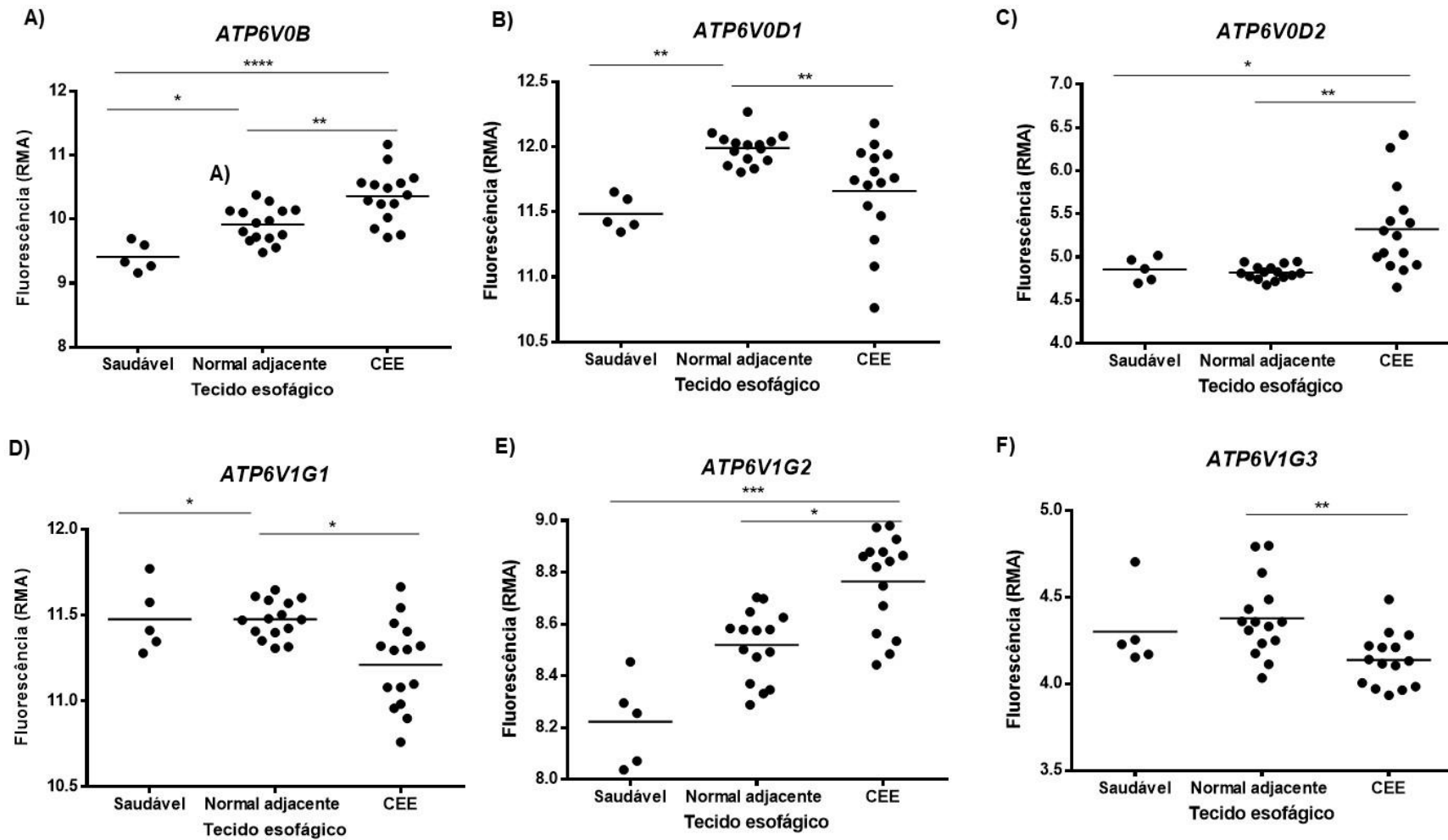


Figura 8: Genes de subunidades/isoformas da V-ATPase diferencialmente expressos comparando CEE, tecido circundante normal e mucosa esofágica saudável. Genes: A) *ATP6V0B*, B) *ATP6V0D1*, C) *ATP6V0D2*, D) *ATP6V1G1*, E) *ATP6V1G2* e F) *ATP6V1G3*.

No entanto, entre os genes da V-ATPase diferencialmente expressos, as subunidades *a* e *C* foram destacadas, pois apresentaram uma maior diferença nos níveis de expressão entre suas isoformas. A isoforma *a2* (*ATP6V02*) teve sua expressão reduzida no tumor comparado ao tecido adjacente ao tumor (-1,14 fold change). Ainda mais intrigante foi a relação entre a expressão das isoformas *a3* e *a4*, que direcionam a V-ATPase para membrana plasmática, onde essas bombas desempenham importante papel como promotor tumoral. A isoforma *a3* (*TCIRG1*) foi superexpressa no tumor (1,53 fold change) enquanto a isoforma *a4* (*ATP6V04*) teve sua expressão reduzida no tumor (-2,76 fold change) comparado à mucosa normal adjacente. As isoformas *a3* e *a4* também foram diferencialmente expressas entre tecido saudável e de CEE (Fig. 9).

O gene *TCIRG1* dá origem a duas proteínas distintas, a proteína *a3* (também conhecida como OC116) que é uma das isoformas de subunidades *a* da V-ATPase e a proteína TCIR7 que é envolvida em ativação de células T. O gene *ATP6V0A4* codifica a isoforma *a4* da V-ATPase. Embora esse gene dê origem a três variantes de transcritos, a mudança ocorre em região 5' UTR, gerando proteínas idênticas (NCBI).

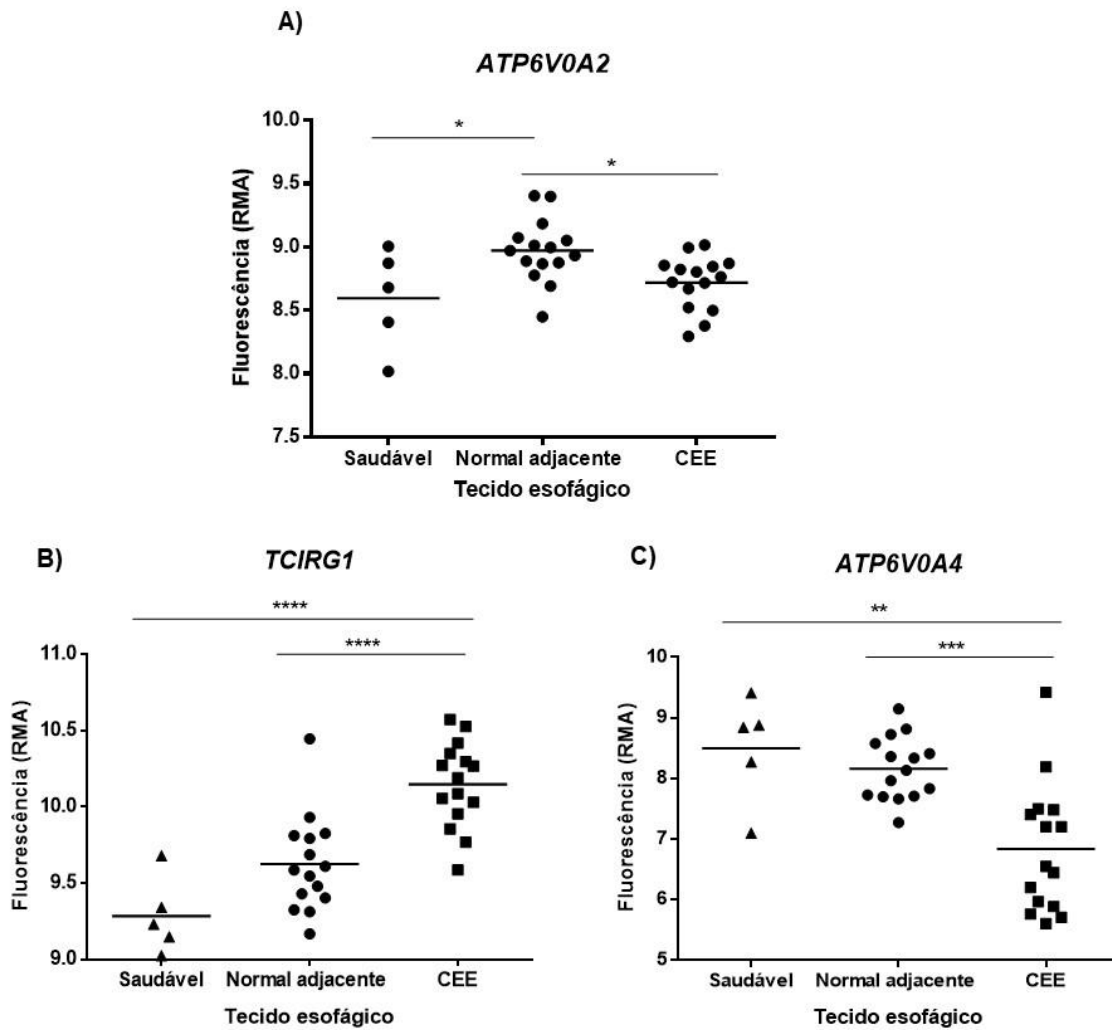


Figura 9: Expressão dos genes das isoformas de subunidade a da V-ATPase no CEE. Níveis de expressão de *TCIRG1* e *ATP6V0A4* no CEE, mucosa normal adjacente e mucosa saudável. $P < 0.0001$.

Com relação à subunidade C, o gene *ATP6V1C1*, que codifica a isoforma C1 foi encontrado mais expresso no tumor (2,79 fold change) enquanto o gene *ATP6V1C2*, que por um *splicing* alternativo codifica as isoformas C2a e C2b, teve sua expressão reduzida no tumor (-1,28 fold change) em comparação à mucosa normal adjacente. Variações de expressão significativa desses genes também foram observadas entre tecido saudável e de CEE (Fig. 10).

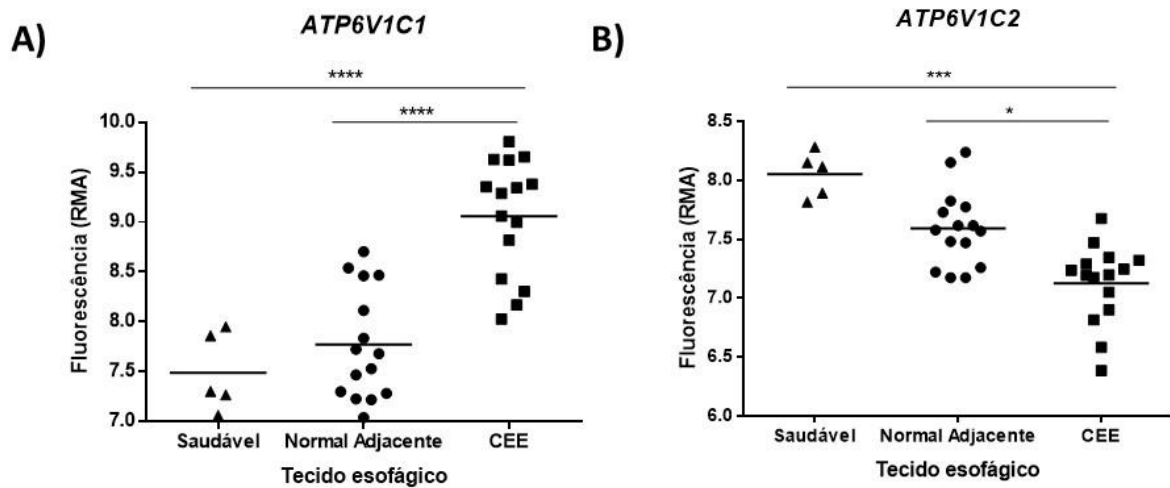


Figura 10: Expressão dos genes das isoformas de subunidade C da V-ATPase no CEE. Níveis de expressão de *ATP6V1C1* e *ATP6V1C2* no CEE, mucosa normal adjacente e mucosa saudável. $P < 0.0001$.

4.1. DISCUSSÃO

A V-ATPase tem sido associada a diferentes processos característicos de células tumorais, *cancer hallmarks* (Hanahan and Weinberg 2011), como resistência à morte celular, aumento da proliferação celular, invasão e metástase, indução de angiogênese, modulação do sistema imune e reprogramação do metabolismo energético (Webb, Chimenti et al. 2011, Stransky, Cotter et al. 2016, Pamarthy, Kulshrestha et al. 2018). Nos últimos anos observou-se um aumento notável no número de publicações que estudam V-ATPase em câncer, no entanto, existem apenas três estudos que avaliaram esta bomba de prótons no câncer de esôfago. Huang et. al. usando um anticorpo anti-V-ATPase observou um pior prognóstico de pacientes com maior expressão desta enzima (Huang, Lu et al. 2012). Son et. al. (2016) mostrou que níveis mais elevados da isoforma de *E1* estão associados com um pior prognóstico dos pacientes com CEE e que essa isoforma afeta a migração, a invasão e a glicólise aeróbica em células tumorais de esôfago (Son, Kim et al. 2016). Finalmente, o terceiro artigo encontrou que a difilina, um composto natural da medicina tradicional chinesa, inibe a atividade da V-ATPase em linhas celulares de câncer esofágico (Chen, Liu et al. 2018).

No presente estudo, demonstramos através de dados depositados de microarranjo, que os tecidos de CEE exibem um padrão específico e holístico de expressão para todas as subunidades e isoformas que compõem a V-ATPase, diferente do padrão detectado nos tecidos esofágicos normais. A identificação de padrões conformacionais específicos de V-ATPases tumorais sugere fortemente especificidades funcionais inerentes aos distintos papéis que esta enzima exerce no desenvolvimento do câncer, compreendendo desde a proliferação, migração e invasão até a imortalização, e evasão da apoptose e de drogas terapêuticas. Do ponto de vista biotecnológico tal descoberta pode vir a alicerçar o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e testes diagnósticos/prognósticos tendo como alvos ou marcadores moleculares tais isoformas específicas. Diferentes estudos mostraram a superexpressão de subunidades ou isoformas específicas de V-ATPase em tumores, como uma maior expressão de isoforma *C1* no câncer oral (Otero-Rey, Somoza-Martin et al. 2008), isoforma *G1* no glioblastoma (Di Cristofori, Ferrero et al. 2015), subunidade *c* no carcinoma hepatocelular (Xu, Xie et al. 2012).

Revelamos um padrão inédito de expressão diferencial abrangendo todas as subunidades e isoformas de V-ATPase no CEE. Todavia, as subunidades que constituem os domínios catalíticos da enzima, as subunidades *A* (*ATP6V1A*) e *B* (*ATP6V1B1* e *ATP6V1B2*) não apresentaram expressão diferencial nos tecidos de CEE em relação aos tecidos esofágicos normais, sugerindo uma expressão conservada das principais subunidades envolvidas na função catalítica da ATPase. De fato, os domínios catalíticos da V-ATPase são conservados não apenas na evolução molecular entre as espécies, mas também em relação ao domínio catalítico de outras classes de fosfohidrolases como a F-ATPase sintase (Cross and Muller 2004). Entre as subunidades e isoformas diferencialmente expressas, observamos a subunidade *c*" (*ATP6V0B*) e as isoformas de subunidades *d* (*ATP6V0D1* e *ATP6V0D2*) e *G* (*ATP6V1G1*, *ATP6V1G2* e *ATP6V1G3*). No entanto, as alterações mais notórias foram observadas nas subunidades *a* e *C*, uma vez que essas subunidades apresentaram maior diferença de expressão entre suas isoformas.

As isoformas *a3* (*TCIRG1*) e *a4* (*ATP6V0A4*) foram respectivamente, superexpressa e suprimida no CEE em comparação com os tecidos normal adjacente e os tecidos esofágicos saudáveis. No câncer de ovário, a isoforma *a3* também está superexpressa em relação às amostras normais (Kulshrestha, Katara et al. 2015). Além disso, a superexpressão da isoforma *a3* induz o direcionamento das V-ATPases para a membrana plasmática de células de câncer de mama e confere um potencial altamente invasivo a essas células tumorais de mama e também em linhagens de melanoma (Nishisho, Hata et al. 2011, Capecchi and Forgac 2013). Similarmente, a isoforma *a4* é superexpressa em amostras de glioma humano e é requerida para a migração e invasão dessas células. No entanto, o silenciamento de *a4* não afeta o potencial invasivo em células de câncer de mama, mas surpreendentemente resulta em um aumento de 2 vezes nos níveis de RNAm de *a3* (Capecchi and Forgac 2013), propondo a existência de uma fina regulação nos níveis de expressão das isoformas de uma mesma subunidade.

Em contraste com a subunidade *a* que tem especificidades funcionais propostas para as suas diferentes isoformas, sendo estas o direcionamento da V-ATPase para membranas celulares distintas e a possível modulação da eficiência da bomba, especificidades funcionais das isoformas de outras subunidades, como a *C*, não foram ainda definidas. A isoforma *C1* (*ATP6V1C1*) tem sido mais estudada, com

trabalhos que mostram sua superexpressão em tumores orais (Otero-Rey, Somoza-Martin et al. 2008) e de pulmão (Bidkhorji, Narimani et al. 2013). Além disso, a alta expressão da isoforma C1 regular o rearranjo dos filamentos de actina em células de câncer de mama (Cai, Liu et al. 2014) e seu silenciamento previne o crescimento do tumor e metástase óssea em modelo murino (Feng, Zhu et al. 2013). *ATP6V1C1* parece estar envolvido no crescimento celular em câncer de mama ativando a via mTORC1 (McConnell, Feng et al. 2017). Em contrapartida, existem poucos estudos com a isoforma C2 (*ATP6V1C2*), talvez devido ao fato de que essa isoforma foi inicialmente proposta ser tecido-específico, identificadas basicamente em rim, pulmão e epidídimo (Smith, Borthwick et al. 2002, Sun-Wada, Yoshimizu et al. 2003).

Este é o primeiro relato das assinaturas de expressão/conformacional específicas das V-ATPases expressas em um tumor, destacando a existência de diferentes isoformas de suas subunidades na composição, estequiometria e na dinâmica de montagem e conformações relacionadas à carcinogênese. Também, destacamos uma expressão diferencial das isoformas de subunidades *a* e *C*, sugerindo a expressão de tais isoformas como potenciais alvos com poder discriminatório entre tecidos esofágico normais e CEE.

5. CAPÍTULO II: Expressão Diferencial dos genes *ATP6V1C1* e *ATP6V1C2* no Carcinoma Epidermóide de Esôfago

5.1. INTRODUÇÃO

5.1.1. A subunidade C da V-ATPase

A subunidade C é a única subunidade que é liberada para o citosol durante a desmontagem da enzima, não ficando ligada nem ao domínio V_1 nem ao domínio V_o (Kane 1995). Os principais papéis atribuídos a essa subunidade tem sido conferir estabilidade ao complexo durante a rotação acionada pela hidrólise de ATP (Puopolo, Sczekan et al. 1992, Curtis, Francis et al. 2002, Smardon and Kane 2007) e regular da dissociação reversível de V_1/V_o (Armbruster, Svergun et al. 2004, Iwata, Imamura et al. 2004, Zhang, Inoue et al. 2006).

A subunidade C contém dois domínios globulares que são ligados por uma região flexível (dois segmentos helicoidais entrelaçado) (Drory, Frolow et al. 2004). Um domínio globular interage com as hastes periféricas EG_3 com elevada afinidade, enquanto que o outro domínio interage com a haste periférica EG_2 e com a região N-terminal da subunidade *a*. Desta forma, a subunidade C conecta subunidades do domínio V_1 e V_o e impede a rotação de A_3B_3 durante a hidrólise de ATP funcionando, portanto, com um estator e, possivelmente, facilitando o acoplamento da hidrólise de ATP (localizada em V_1) com o transporte de prótons (localizado em V_o) (Fig.11)

Evidências sugerem que para a dissociação V_1/V_o ocorrer essas interações entre a subunidade C e as subunidades *E*, *G* e *a* precisam ser quebradas e a subunidade C liberada. Por conseguinte, essas interações são reconstituídas quando ocorre a reassociação da V-ATPase (Inoue and Forgac 2005, Zhang, Inoue et al. 2006, Oot and Wilkens 2010, Parra, Chan et al. 2014). Possíveis mecanismos que podem determinar mudanças conformacionais que modulem a interação entre essas subunidades pode envolver fosforilação reversível da subunidade C pela proteína quinase A e a ligação dessa subunidade a ADP/ATP (Armbruster, Hohn et al. 2005, Gruber 2005, Voss, Vitavska et al. 2007) (Fig.12). No acoplamento, a reintrodução da subunidade C no complexo V_1/V_o , requer o auxílio do complexo RAVE, que age como chaperona. O complexo RAVE alinha a subunidade C às

hastes periféricas EG₂ e EG₃ (Sardon and Kane 2007). Tanto o acoplamento quanto a dissociação dos domínios V₁/V₀ dependem de uma rede intacta de microtúbulos (Xu and Forgacs 2001, Serra-Peinado, Sicart et al. 2016). A montagem das subunidades da V-ATPase bem como a dissociação reversível dos domínios V₁ e V₀ são dependentes do citoesqueleto de actina. A subunidade C se liga com alta afinidade tanto à G-actina monomérica quanto à F-actina. É interessante notar que a subunidade C de maneira dose dependente estabiliza os filamentos de actina e induz uma maior reticulação desses filamentos (Voss, Vitavska et al. 2007).

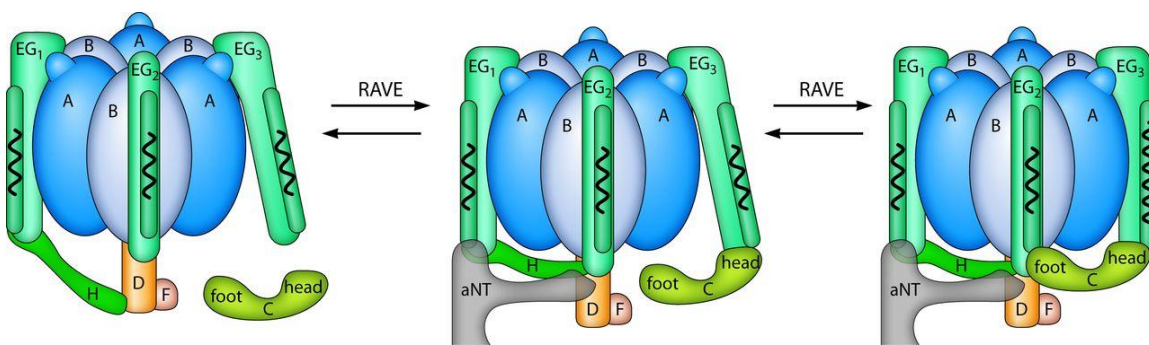


Figura 11: Um modelo proposto para associação e dissociação dos complexos da V-ATPase. O domínio V₁ e a subunidade C se desprendem do V₀ na membrana e são liberados no citosol durante a dissociação. A remontagem requer a reassociação da subunidade C com as hastas periféricas (Parra, Chan et al. 2014).

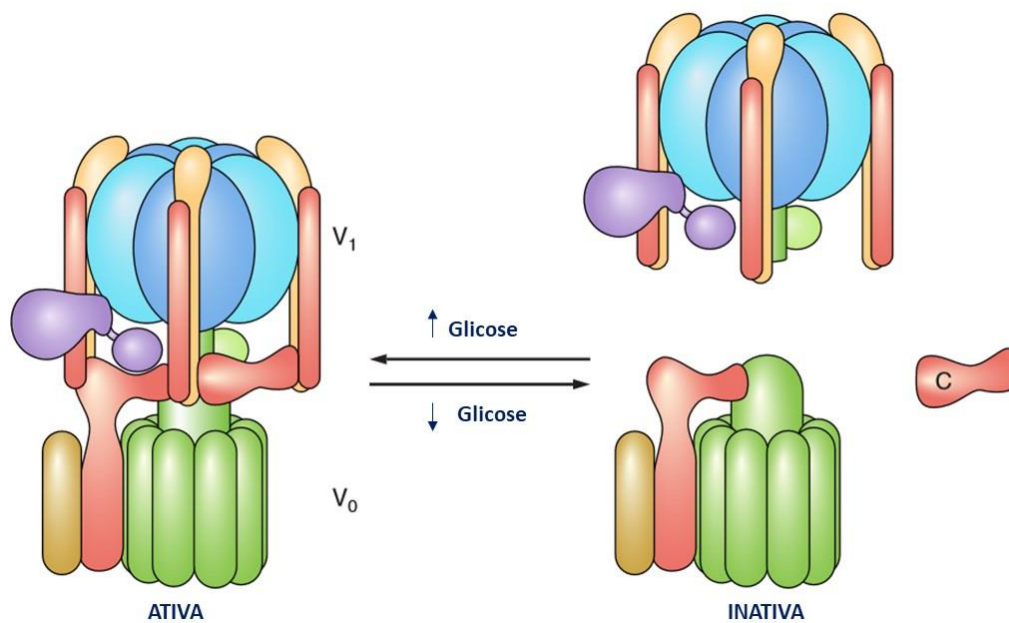


Figura 12: Regulação da atividade da V-ATPase através da reversível dissociação dos seus domínios V_1 e V_0 , o que resulta na inativação do complexo. A subunidade C é a única subunidade que no estado inativo da bomba não fica ligado nem a V_1 nem a V_0 . Adaptado de (Stransky, Cotter et al. 2016).

Desta forma, devido ao importante papel da subunidade C na regulação da atividade estrutural e funcional da bomba, sugere-se que pequenas mudanças nessa subunidade, como as encontradas entre as diferentes isoformas, possam influenciar diretamente a atividade a bomba e na sua interação com citoequeleto de actina. Além disso é possível que um padrão diferencial de expressão da isoformas C, como observado no capítulo I através da expressão por microarranjo, possa promover uma regulação diferencial da bomba favorecendo processos carcinogênicos. Porém, a especificidade funcional das diferentes isoformas C não é conhecida. O que se sabe, é que a isoforma C1 é expressa de forma ubíqua, enquanto que a isoforma C2a é predominantemente expressa em pulmão e a C2b em rim (Smith, Borthwick et al. 2002, Sun-Wada, Murata et al. 2003).

5.2. OBJETIVO

Validar o padrão de expressão diferencial das isoformas de subunidade C da V-ATPase a fim de correlacionar tal expressão com o desfecho clínico dos pacientes com CEE bem como avaliar seu potencial como biomarcador de diagnóstico e prognóstico nesse tumor.

5.2.1. Objetivos Específicos:

- 1- Quantificar a expressão dos transcritos dos genes *ATP6V1C1* e *ATP6V1C2* comparando tecido de CEE e respectiva mucosa histologicamente normal adjacente ao tumor;
- 2- Avaliar a expressão proteica das isoformas C1 e C2a,b em tecidos de CEE;
- 3- Correlacionar a expressão de *ATP6V1C1* e *ATP6V1C2* com a evolução da doença;
- 4- Predizer *in silico* as diferenças estruturais das isoformas C1, C2a e C2b.

5.3. MATERIAL E MÉTODOS

5.3.1. Pacientes e amostras

Pacientes matriculados de 2008 a 2015 no Instituto Nacional do Câncer (INCA) com confirmado diagnóstico de ESCC e que não foram submetidos a quimioterapia e/ou radioterapia foram recrutados. Trinta e oito biópsias pareadas (tumor e tecidos envoltentes histologicamente normais, coletados pelo menos 5 cm longe da borda do tumor) foram incluídas na análise de PCR em tempo real. Os dados epidemiológicos e clinicopatológicos foram obtidos através de entrevistas usando um questionário padronizado e prontuários do paciente, incluindo, sempre que possível, sexo, idade no diagnóstico, tabagismo, ingestão de álcool, estágio tumoral e diferenciação, localização esofágica e tempo de sobrevivência global após o diagnóstico. Os indivíduos foram classificados quanto ao tabagismo como fumantes (para sempre ou ex-fumantes) ou nunca fumantes e em relação à ingestão de álcool como consumidor (para sempre ou ex-consumidor) ou nunca consumidor. O uso das amostras humanas foi aprovado pelo Comitê de Ética da instituição (INCA - 116/11 – Anexo I). Todos os pacientes, que concordaram em participar do estudo, assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido antes da matrícula no estudo.

5.3.2. Extração de RNA

A extração de RNA a partir das biópsias de material fresco foi realizada utilizando o reagente TRIzol® (Invitrogen) seguindo o protocolo do fabricante. Cada amostra foi homogeneizada em 1 mL de TRIzol e incubada por cinco minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 200 µL de clorofórmio com subsequente homogeneização em vortex e incubação de 15 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas à velocidade de 12.000 rpm por 15 minutos e então a fase aquosa foi transferida para um novo tubo, com descarte do material restante. Ao novo tubo foram adicionados 500 µL de isopropanol com posterior agitação e incubação por 10 minutos à temperatura ambiente, seguida de centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante será descartado e ao pellet será adicionado 1 mL de etanol 75%. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos, com posterior descarte do etanol. Para eluir o RNA, foram adicionados 20 µL de água livre de RNase.

5.3.3. Quantificação e determinação da pureza das amostras de RNA

A quantificação e determinação da pureza das amostras de RNA foram feitas com o auxílio do equipamento picodrop (GE Healthcare), um espectrofotômetro simples, capaz de mensurar a concentração de ácidos nucleicos e proteínas em solução. Para a realização da quantificação, é necessário configurar os parâmetros do equipamento para mensurar ácidos nucleicos, determinados pela absorbância em comprimento de onda de 260 nm. Em seguida, aplica-se 5 µL de RNA total extraído no leitor óptico do aparelho. O resultado mostra automaticamente a concentração do RNA em ng/µL e verifica o grau de pureza da amostra a partir da razão entre a absorbância em 260 nm e a absorbância em 280 nm (comprimento de onda necessário para medir a concentração de proteínas contaminantes na solução). As amostras foram consideradas puras quando o resultado desta razão foi igual ou superior ao valor de 1,7.

5.3.4. Reação de Transcrição Reversa (RT)

Para a análise da expressão gênica pela reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) foi necessário primeiramente transcrever o mRNA recém extraído em um DNA complementar (cDNA). A síntese de cDNA foi feita através da reação de transcrição reversa (*Reverse Transcription* – RT) utilizando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied). Cada reação conteve 2 µL de 10X RT buffer, 0,8 µL de 25X DNTTP Mix (100 mM), 2 µL de 10X RT Random Primers, 1 µL de MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 1 µL de RNase Inhibitor e 3,2 µL de água nuclease free. Em seguida, foi adicionado 10 µL de RNA total extraído a 500 ng, completando então, um volume de 20 µL de reação. A reação foi imediatamente levada ao termociclador (Veriti – Applied) onde passou pelo seguinte ciclo: 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C, 5 minutos a 85°C. Após a síntese do cDNA, cada tubo foi armazenado a -20°C até sua utilização.

5.3.5. PCR (Polymerase Chain Reaction) em tempo real (qPCR)

Para a qPCR ou PCR em tempo real foi utilizado o sistema *SteOne Plus* (Applied) e o reagente Power SYBR Master Mix PCR (Applied). O método utilizado foi o $\Delta\Delta C_T$ usando o gene *GAPDH* como normalizador e respectiva mucosa normal adjacente ao tumor como amostra referência (fórmula $2^{-\Delta\Delta C_T}$).

As reações de qPCR foram realizadas em duplicatas. A qPCR foi realizada em uma placa de 96 poços e em cada reação foram adicionados 6 µL de SYBR Green (Applied), 2,16 µL de cada par de oligonucleotídeos específicos da reação (mix dos primers senso e anti-senso) à 5 µM, 1 µL de cDNA diluídos 1:8 e água deionizada autoclavada para completar o volume final de 12 µL. A reação de amplificação foi realizada através das seguintes condições: 10 minutos a 95°C; 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C, com posterior captura de fluorescência; Curva de dissociação (curva de melt): 60°C - 99°C.

Previamente, para o estabelecimento do limiar de detecção, foi feita uma curva padrão de expressão para cada gene alvo e do gene-referência, utilizando uma diluição seriada de cDNA de linhagem celular TE-13 que expressa todos os genes alvo.

5.3.6. Desenhos dos pares de oligonucleotídeos

Os pares de oligonucleotídeos específicos para cada gene alvo foram desenhados e testados *in silico* usando as ferramentas Primer Premier, Primer-Blast (NCBI), IDT OligoAnalyzer 3.1 e UCSC In-Silico PCR. As informações sobre os transcritos de cada gene foram obtidas pelo GenBank e pelo Genome Browser.

As sequências de oligonucleotídeos são mostradas na tabela 5. A variante 2 de splicing alternativo do gene *ATP6V1C2* (primer: F: AAGCAACAGTATGGCCCC; R: AGCACGGACTCCACAAACAC) não pôde ser avaliada sozinha devido ao limite de quantificação do equipamento de PCR em tempo real que não é capaz de determinar quantitativamente com precisão aceitável concentrações muito baixas de RNA (Cycle Threshold - CT > 32). Então, foram avaliados os transcritos das variantes *ATP6V1C1*, *ATP6V1C2* variante 1 (v1) e *ATP6V1C2* variantes 1 e 2 em conjunto (v1,2).

Tabela 5: Condições das reações de PCR: sequências dos oligonucleotídeos específicos e tamanho em pares de bases dos fragmentos amplificados.

Genes	Sequência de Oligonucleotídeos (5'-3')	Tamanho do produto (pb) ^d
GAPDH Var^a. 1-4	S: CAACAGCCTCAAGATCATCAGCAA	124
	As: AGTGATGGCATGGACTGTGGTCAT	
ATP6V1C1	S: ACCTGTCAGCAAACATGGGA	110
	As: ACATCCAACGTGCCAACCTTT	
ATP6V1C2 Var. 1	S: ACAGTATCAAACCTTCCTGTGTTGC	91
	As: ATCAGGGTTACCTAGCGGGG	
ATP6V1C2 Var. 1-2	S: CCTGACTTCAAGGTGGGGAC	120
	As: CATGACTTCCACCACGCTCT	

^a Var.: Variante de Splicing ; ^b S: primer senso; ^c As: primer antissenso; ^d pb: pares de base.

5.3.7. Imunohistoquímica

A imunohistoquímica (IHQ) foi desenvolvida através de secções seguidas de 3µm de cada bloco de CEE de pacientes matriculados no INCA. O Kit Novolink Polymer Detection Systems, Leica Biosystems[®] foi utilizado juntamente com os anticorpos específicos contra as isoformas: C1 (Sigma - HPA023943) e C2a e C2b (AB176771).

Após as secções serem feitas, os cortes foram fixados nas lâminas através de uma incubação a 60°C overnight, em estufa. A desparafinização do material foi realizada através da imersão das lâminas em 6 banhos de xilol a 5 minutos cada, seguido de 6 banhos de etanol absoluto de 3 minutos cada. A recuperação antigênica foi realizada por incubação das lâminas em banho-maria a 98 °C, sendo para as reações de C1 utilizado tampão citrato (ácido cítrico 10 mM) pH 6,0 por 30 minutos e para as reações de C2 tampão EDTA (ácido etilenodiaminotetracético 1 mM) pH 8,0 por 40 minutos. Em seguida, os casos foram incubados por 10 minutos em temperatura ambiente e foram lavados em água corrente por 5 minutos. As secções foram demarcadas com caneta Dako Pen (Dako[®]) e incubadas em 3 banhos de 5 minutos de tampão de lavagem (TBS 1X + 0,1% de Tween 20). Logo após, os cortes foram incubados em solução inibidora de peroxidase endógena por 20 minutos. As lâminas foram, então, lavadas com água destilada e incubadas em 3 banhos de 5 minutos de tampão de lavagem. Os cortes foram secados e incubados em solução inibidora de ligações inespecíficas por 30 minutos. Em seguida, foi adicionado o anticorpo específico diluído em solução diluidora comercial (Antibody diluent - Dako[®]), anti-C1 na diluição de 1:350 e anti-C2 na diluição de 1:1800. O

controle negativo receberá apenas a solução diluidora. Após esta etapa, as lâminas ficarão incubadas overnight a 4°C.

No dia seguinte, as lâminas receberam 3 banhos por 5 minutos de tampão de lavagem e, em seguida, foram incubadas à solução pós primário por 30 minutos. As secções, foram, então, lavadas com água destilada e incubadas por mais 3 vezes de 5 minutos em tampão de lavagem. Em seguida a solução de polímero ser adicionada e incubada por 30 minutos. Logo após, as lâminas foram lavadas com água destilada e incubadas em 2 banhos de 5 minutos em tampão de lavagem. O processo de revelação foi feito através da coloração por DAB. Para tal revelação, foi utilizado 50 µL de DAB para cada 1 mL de solução tampão substrato proveniente no kit. Por fim, as lâminas foram contracoradas com Hematoxilina (EasyPath).

A avaliação da imunomarcação foi realizada por patologista e a análise da imunomarcação foi realizada pelo sistema de score que levou em consideração o percentual de células tumorais marcadas e a intensidade de marcação. O percentual de células marcadas foi estratificado de 10 em 10%, a cada 10% de células tumorais marcadas 1 ponto era adicionado, podendo chegar, portanto, em um score de porcentagem de até 10 (100% de células marcadas). A intensidade de marcação foi considerada fraca = 1, moderada = 2 ou forte = 3. Ao final, o score da porcentagem foi multiplicado pelo score da intensidade podendo chegar a valores de 1 a 30.

5.3.8. Expressão de *ATP6V1C1* e *ATP6V1C2* despositada no banco de dados The Cancer Genome Atlas (TCGA)

Os dados de expressão gênica de amostras de CE (n=182), sendo adenocarcinoma (n=87) e carcinoma epidermóide (n=95) foram extraídos do banco de dados público *cBioPortal for Cancer Genomics* (Cerami, Gao et al. 2012, Gao, Aksoy et al. 2013), que providencia visualização, análises e download de conjuntos de dados em larga escala despositados no *The Cancer Genome Atlas* (TCGA).

5.3.9. Análise de domínios conservados, sítios de interação proteína-proteína, construção dos modelos 3D proteicos e os ensaios de docking proteína-proteína

A busca por sequências conservadas utilizando o banco de dados do NCBI foram realizadas com o programa BLASTP 2.8.0 (Boratyn, Schaffer et al. 2012), e a análise pelos domínios conservados foi realizada com o programa CDD/SPARCLE (Marchler-Bauer, Bo et al. 2017). As análises realizadas para a identificação por sítios de fosforilação/desfosforilação e por sítios de interação proteína-proteína foram realizadas utilizando o bando de dados *Human Protein Reference Database* (Amanchy, Periaswamy et al. 2007). A predição dos modelos 3D para a hC1 (P21283) e a hC2a (NP_001034451.1) foram realizados por modelagem por homologia e *ab initio* pelos programas: Modeller 9.19 (Sali and Blundell 1993), Swiss-Model (Biasini, Bienert et al. 2014), RaptorX (Kallberg, Wang et al. 2012) e I-Tasser (Yang, Yan et al. 2015). As análises sobre a qualidade estereoquímica global e local para todos os modelos preditos foram realizados pelos programas: Rampage (Lovell, Davis et al. 2003), Verify3D (Eisenberg, Luthy et al. 1997), ProSA (Wiederstein and Sippl 2007), VoroMQA (Olechnovic and Venclovas 2017), ProQ3D (Uziela, Menendez Hurtado et al. 2017), Qprob (Cao and Cheng 2016), DeepQA (Cao, Bhattacharya et al. 2016) e SVMQA (Manavalan and Lee 2017). Em seguida, os melhores modelos foram refinados usando o programa ModRefiner (Xu and Zhang 2011). Os ensaios de docking proteína-proteína foram realizados usando os programas: ClusProV2 (Comeau, Gatchell et al. 2004) e HADDOCK (van Zundert, Rodrigues et al. 2016). Para selecionar os complexos de interação mais promissores e a eliminação dos falso-positivos foram realizadas extensivas análises com os programas: DockScore (Malhotra, Mathew et al. 2015), PPCheck (Sukhwai and Sowdhamini 2015) e CCharPPI (Moal, Jimenez-Garcia et al. 2015). Após a seleção dos complexos proteicos com características de interação nativa, a predição da energia livre de ligação (ΔG - kcal/mol) e a constante de dissociação (K_d - em Molar) do complexo proteína-proteína, foram realizadas usando os programas: PRODIGY (Vangone and Bonvin 2015, Xue, Rodrigues et al. 2016). As imagens dos complexos nativos e suas interações foram produzidas pelo programa UCSF Chimera 1.11.2 (Pettersen, Goddard et al. 2004). O alinhamento de sequências foi realizado usando ClustalW tools (<http://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>).

5.3.10. Análise estatística

As análises foram realizadas utilizando o GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software, USA) e as diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$. Teste *t* não pareado ou *Mann-Whitney test* foram aplicados para comparação de dois grupos. Para medir a relação entre a expressão dos genes alvo e o estadiamento do tumor foi usado *Fisher's exact test*. Para avaliar o impacto da expressão dos genes alvo na sobrevida global dos pacientes uma curva de sobrevida de Kaplan-Meier e o teste de log-rank foram aplicados. Os valores de corte foram definidos pela mediana de expressão; pacientes com expressão acima da mediana foram considerados como “alta expressão no tumor” e pacientes com expressão menor ou igual à mediana foram considerados como “baixa expressão no tumor”. A fim de avaliar o uso da expressão das isoformas C como marcador para distinguir CEE de mucosa normal adjacente ao tumor uma curva ROC foi realizada (receiver operating characteristic). Correlação entre as expressões dos genes das isoformas C foi realizada por correlação por coeficiente de *Spearman*.

5.4. RESULTADOS

5.4.1. EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS TRANSCRITOS DOS GENES *ATP6V1C1* E *ATP6V1C2* NO CCE

5.4.1.1. Informação sócio-demográfica e clínico-patológica dos pacientes incluídos nas análises por PCR em tempo real

Para avaliar se o perfil dos pacientes que participaram deste estudo está de acordo com aquele encontrado na população, foram coletadas informações sócio-demográficas e clínico-patológicas do banco de dados gerado a partir dos prontuários dos pacientes (Tabela 6). Por se tratar de um estudo retrospectivo, algumas informações foram perdidas por não constarem nos prontuários.

A idade média dos pacientes foi de 57 anos, variando de 48 a 79 anos, os pacientes do sexo masculino representaram 84,2% dos casos e cerca de 90% de todos os pacientes eram fumantes e consumidores de álcool. Os tumores foram mais frequentemente localizados no terço médio do esôfago (47,4%), com alta prevalência de estádios avançados da doença (III ou IV) (48%) e pouco ou moderadamente diferenciados (97,4%). A taxa de mortalidade foi alta (81,6%) com média de sobrevida global de 7,73 meses. O estádio foi calculado com base no TNM (T – tamanho; N - acometimento de linfonodo; M - metástase à distância).

Tabela 6: Informações clinicopatológicas dos pacientes incluídos nas análises por qPCR.
N.D. Dados indisponíveis no prontuário.

Características Clínico-patológicas	n	(%)
Gênero		
Homem	32	84,2%
Mulher	6	10,5%
Idade (anos)		
	Mediana	Amplitude
Homem	57	(48-75)
Mulher	57	(49-79)
Total	57	(48-79)
Consumo de Álcool		
	n	(%)
Nunca	2	11,8%
Consumidor/Ex consumidor	15	88,2%
N.D.	21	
Consumo de Tabaco		
Nunca	1	5,9%
Fumante/Ex fumante	16	94,1%
N.D.	21	
Sítio do tumor		
Terço superior	6	15,8%
Terço Médio	18	47,4%
Terço Inferior	5	13,2%
Terços Superior e Médio	5	13,2%
Terços Inferior e Médio	3	7,9%
Terços Superior, Médio e Inferior	1	2,6%
Estádio do Tumor		
I	0	0,0%
II	14	51,9%
III	6	22,2%
IV	7	25,9%
N/A	11	
Diferenciação do Tumor		
Bem	1	2,6%
Moderadamente	30	78,9%
Pouco	7	18,4%
Metástase		
Sim	4	22,2%
Não	14	77,8%
N.D.	20	
Óbito		
Sim	31	81,6%
Não	7	18,4%
Total	38	100%

5.4.1.2. Expressão dos transcritos de *ATP6V1C1* e *ATP6V1C2*

Para validar os resultados mais expressivos das análises obtidas do banco de dados de microarranjo, os níveis de RNAm de *ATP6V1C1* e *ATP6V1C2* foram avaliados por RT-qPCR em amostras pareadas com CEE (tumores e tecidos circundantes histologicamente normais). Em algumas amostras não houve quantidade de cDNA disponível para todas as reações, tendo sido avaliadas 38 amostras pareadas para o gene *ATP6V1C1*, 37 para *ATP6V1C2-v1* e 36 para *ATP6V1C2-v1,2*.

Os valores obtidos para as expressões de *ATP6V1C1* no CEE variou de 0.43 a 7.37-fold change em relação ao respetivo tecido normal, sendo a mediana de 2.23-fold change. Considerando qualquer aumento no valor de expressão, 87% das amostras tumorais apresentaram expressão de *ATP6V1C1* maior do que o respectivo tecido normal. Assumindo um valor de corte de 2, 54% das amostras de CEE se apresentaram superexpressas no tumor comparado a respectiva mucosa normal adjacente (Fig 13A). Comparando a distribuição dos níveis de RNAm entre o grupo de CEE (mediana de 0,008196) e o grupo de tecido normal adjacente (mediana de 0,003301) nota-se que o grupo de tumor expressa 2,48 vezes mais *ATP6V1C1* do que o grupo dos tecidos normais adjacente (Fig 13B).

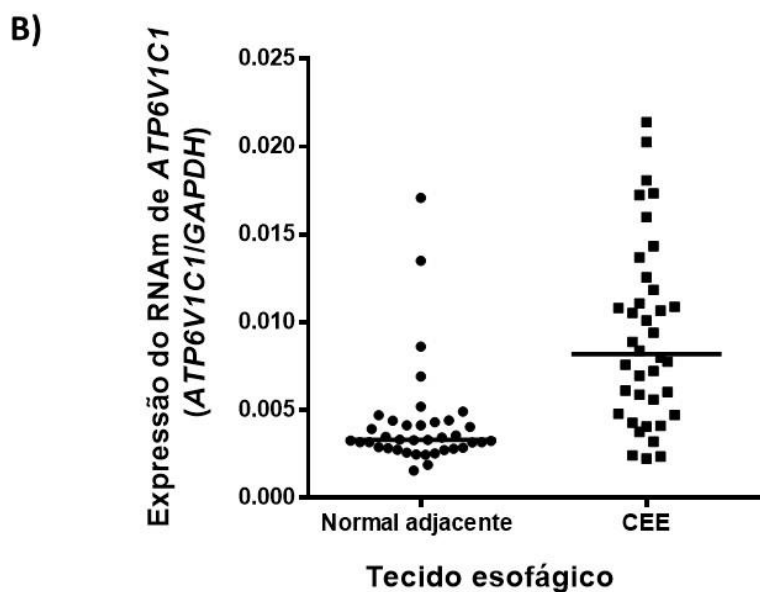
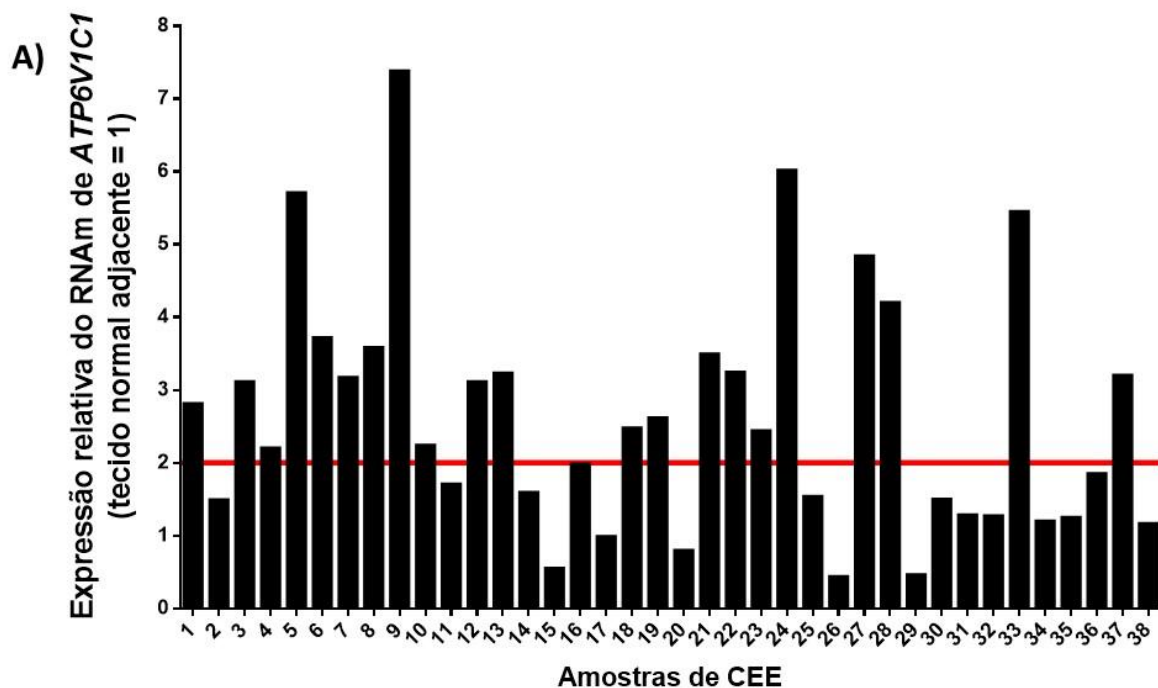


Figura 13: Expressão de *ATP6V1C1* por RT-qPCR. **A)** Expressão relativa de *ATP6V1C1* em 38 amostras pareadas de CEE e respectiva mucosa normal adjacente. Amostras de CEE apresentando aumento de mais de 2 vezes em relação ao respectivo tecido normal foram consideradas *upregulated* (linha vermelha). **B)** Distribuição dos níveis de expressão dos grupos de amostras de CEE e de tecido normal adjacente. Níveis de RNAm foram normalizados por *GAPDH*, usado com gene referência ($P < 0.0001$).

Em ambos, *ATP6V1C2-v1* e *ATP6V1C2-v1,2*, 92% das amostras de CEE apresentaram alguma redução de expressão comparado à respectiva amostra normal adjacente. A expressão no CEE foi pelo menos duas vezes menor do que no respectivo tecido normal adjacente em 67,6% dos casos para *ATP6V1C2-v1* e em 72,2% dos casos para *ATP6V1C2-v1,2*. A variação de expressão (em fold change) foi de -0.46 a -48.9 com mediana de -3.96 para variante 1 e de -0.51 a -52.9 com mediana de -6.53 para as variantes 1 e 2 (Fig 14 A e 15A). Os níveis de RNAm de *ATP6V1C2-v1* e *ATP6V1C2-v1,2* foram menores no grupo de amostra de CEE do que no grupo de tecidos normais, sendo a mediana de -4.3 e -9.6 vezes, respectivamente (*v1*: mediana de 0.000489 no CEE e 0.00241074 no normal adjacente; *v1,2*: mediana de 0.000629 no CEE e 0.006044 no normal adjacente) (Fig 14B e 15B).

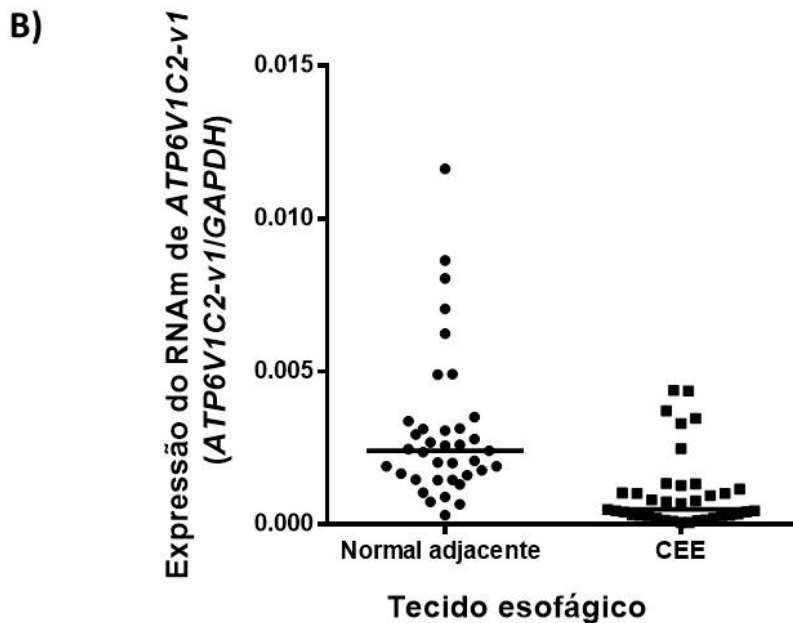
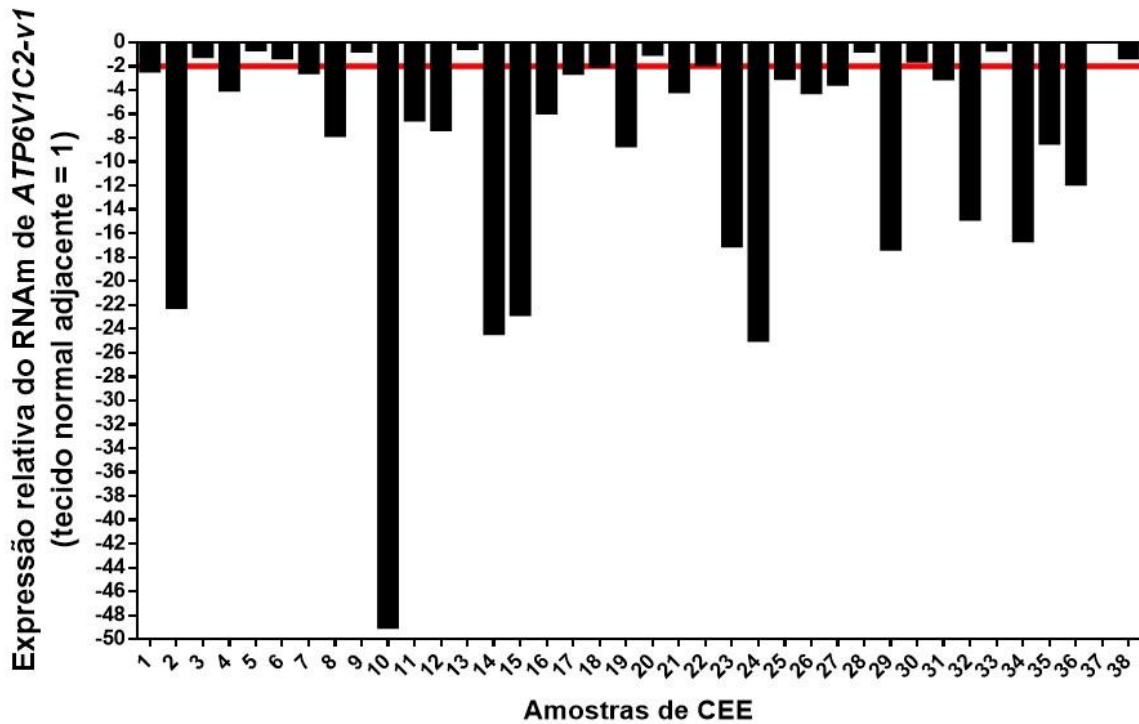


Figura 14: Expressão de *ATP6V1C2-v1* por RT-qPCR. **A)** Expressão relativa de *ATP6V1C2-v1* em 37 amostras pareadas de CEE e respectiva mucosa normal adjacente. Amostras de CEE apresentando um decréscimo de maior que 2 vezes em relação ao respectivo tecido normal foram consideradas *downregulated* (linha vermelha). **B)** Distribuição dos níveis de expressão dos grupos de amostras de CEE e de tecido normal adjacente. Níveis de RNAm foram normalizados por GAPDH, usado com gene referência ($P < 0.0001$). A amostra do número 37 não foi avaliada para *ATP6V1C2-v1* devido à escassez de cDNA dessa amostra

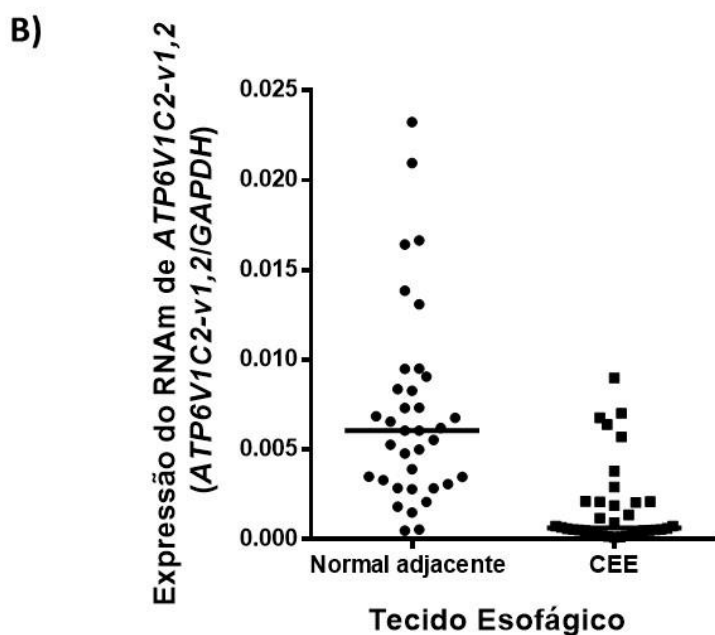
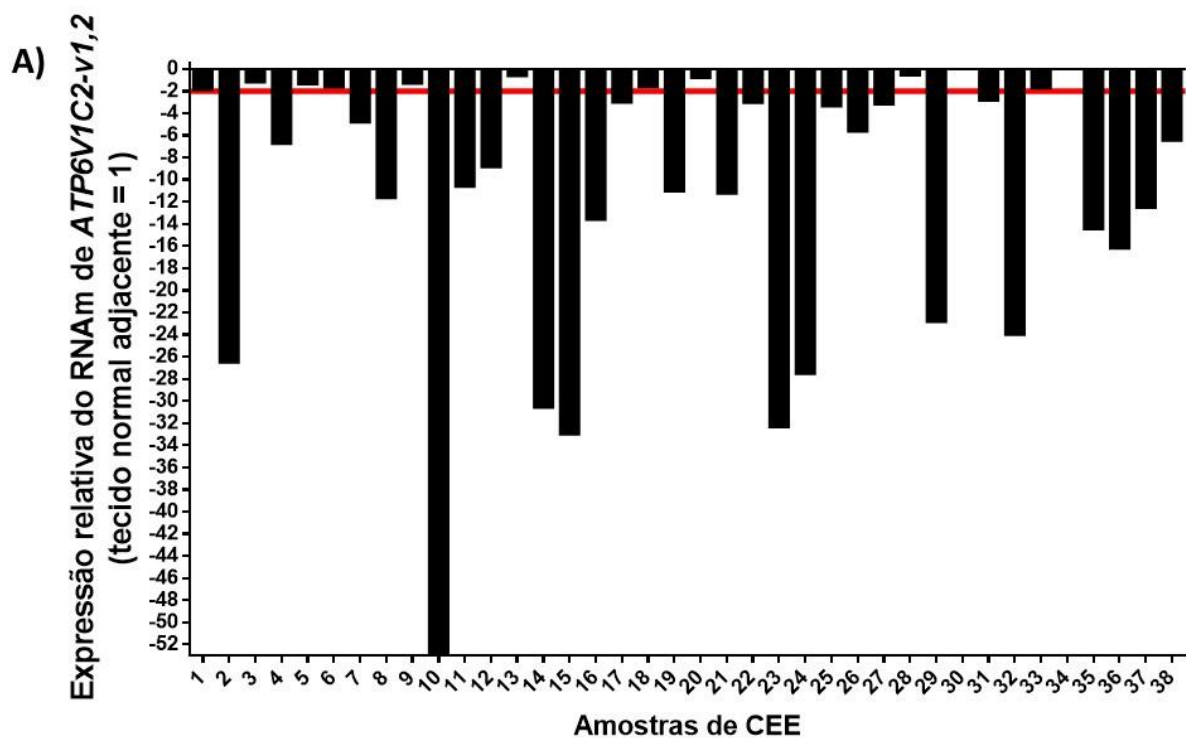


Figura 15: Expressão de *ATP6V1C2-v1* por RT-qPCR. **A)** Expressão relativa de *ATP6V1C2-v1* em 37 amostras pareadas de CEE e respectiva mucosa normal adjacente. Amostras de CEE apresentando um decréscimo de maior que 2 vezes em relação ao respectivo tecido normal foram consideradas *downregulated* (linha vermelha). **B)** Distribuição dos níveis de expressão dos grupos de amostras de CEE e de tecido normal adjacente. Níveis de RNAm foram normalizados por GAPDH, usado com gene referência ($P < 0.0001$). As amostras de números 30 e 34 não foram avaliadas para *ATP6V1C2-v1,2* devido à escassez de cDNA dessas amostras.

Uma positiva e marcante correlação foi observada entre as expressões das variantes 1 e variantes 1,2 de *ATP6V1C2* ($P < 0,0001$; $r = 0,9521$). As correlações observadas entre os genes das isoformas C é apresentado na figura 16.

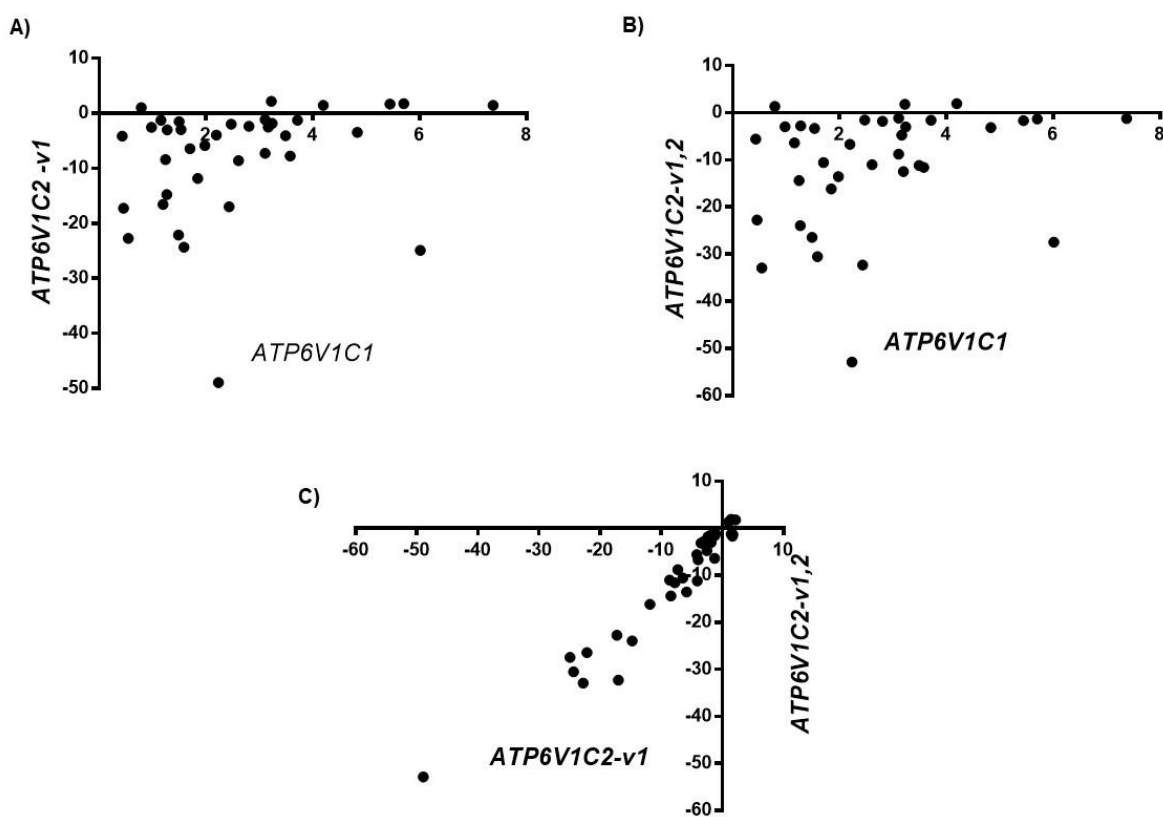


Figura 16: Correlação entre as expressões dos genes das isoformas C. Correlação entre: **A)** *ATP6V1C1* e *ATP6V1C2-v1* ($P = 0,02$; $r = 0,3810$); **B)** *ATP6V1C1* e *ATP6V1C2-v1,2* ($p = 0,003$; $r = 0,3583$); **C)** *ATP6V1C2-v1* e *ATP6V1C2-v1,2* ($P < 0,0001$; $r = 0,9521$).

Em seguida, foi avaliado o impacto da expressão dos genes *ATP6V1C1* e *ATP6V1C2* no prognóstico do CEE. A sobrevida global dos pacientes não sofreu influência dos níveis de expressão dos genes das isoformas C (Fig. 17). No entanto, expressões mais elevadas de *ATP6V1C1* foi associado à um estadiamento menos avançado da doença, ou seja, estádios I e II ($p=0,0461$) (Fig. 18).

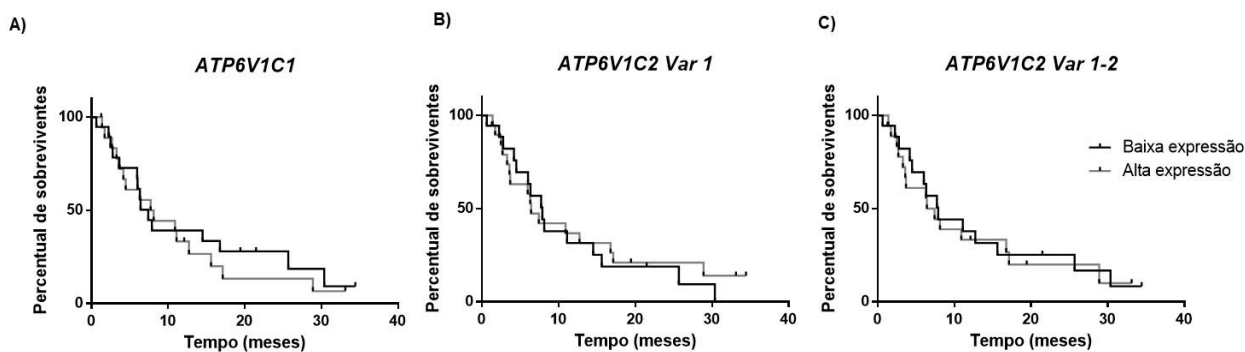


Figura 17: Curvas Kaplan–Meier de sobrevida global apresentada pelos pacientes com CEE de acordo com a expressão de: **A)** *ATP6V1C1*; **B)** *ATP6V1C1-v1* e **C)** *ATP6V1C2-v1,2*. Em preto - expressão menor do que a mediana e em cinza - expressão maior ou igual à mediana.

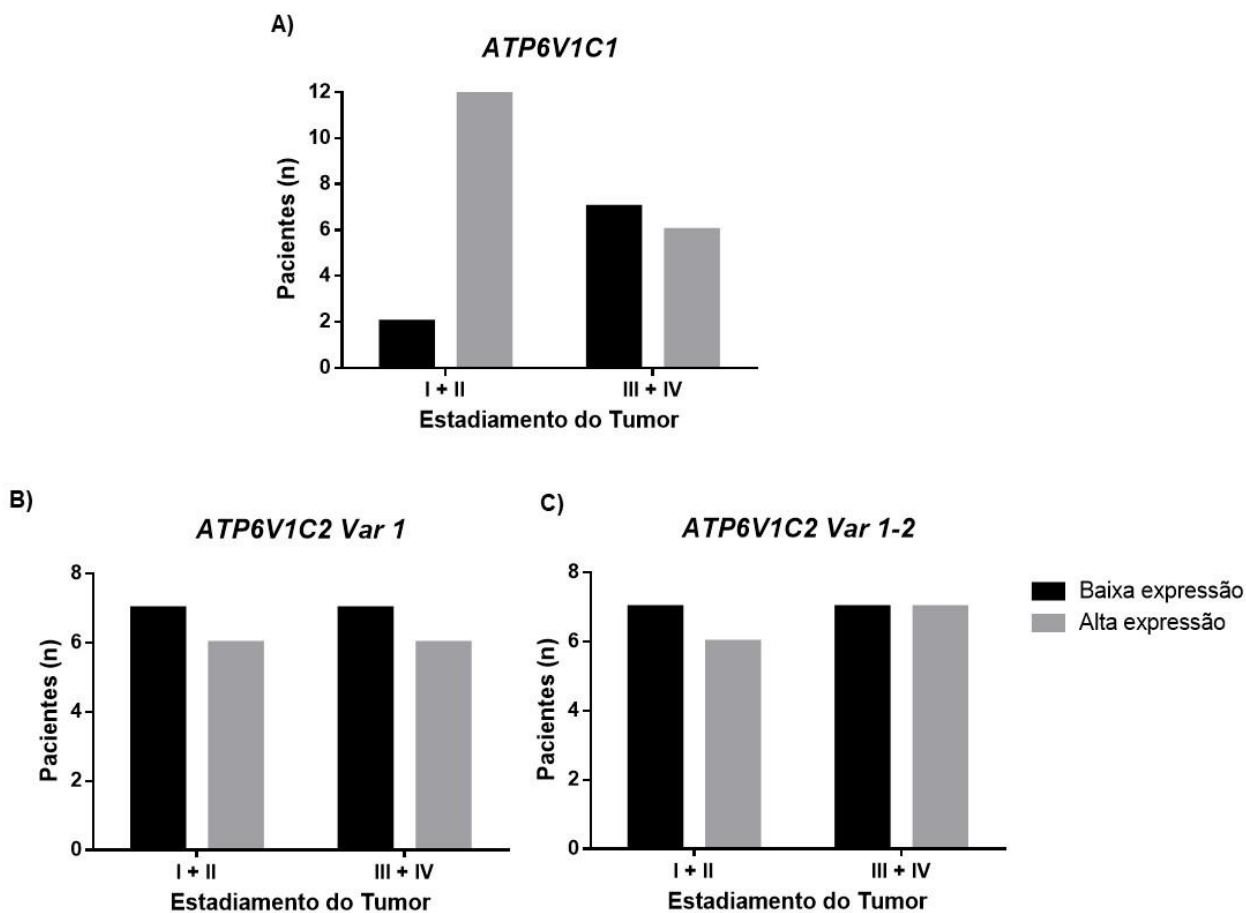


Figura 18: Associação entre o estadiamento patológico e a expressão de: **A)** *ATP6V1C1* ($p=0,0461$); **B)** *ATP6V1C1-v1* e **C)** *ATP6V1C2-v1,2*. Em preto - expressão menor do que a mediana e em cinza - expressão maior ou igual à mediana.

5.4.1.3. Análise de Poder discriminatório da Expressão dos transcritos de *ATP6V1C1* e *ATP6V1C2*

Para avaliar se a expressão de RNAm de *ATP6V1C1* e *ATP6V1C2* seria capaz de discriminar amostras de CEE de tecido esofágico não tumorais, nós produzimos uma curva ROC (Receiver Operating Characteristic) usando os valores de expressão gênica dos respectivos grupos. A expressão de *ATP6V1C1* e *ATP6V1C2* (*v1 and v1,2*) foi capaz de discriminar com precisão amostras de CEE de amostras normais adjacentes ($P < 0.0001$) (Fig. 19 A-C). A expressão de *ATP6V1C1* mostrou uma sensibilidade de 79,49% e uma especificidade de 84,62% em um ponto de corte 0,004721 (área sob a curva 0,8304). A expressão de *ATP6V1C2-v1* alcançou, em um ponto de corte de 0,001400, sensibilidade e especificidade de 83,78% (área sob a curva 0,8371). Com relação a expressão de *ATP6V1C2-v1,2* a curva ROC apontou uma sensibilidade de 80,56% e uma especificidade de 86,11% (área sob a curva 0,8346; ponto de corte 0,002456).

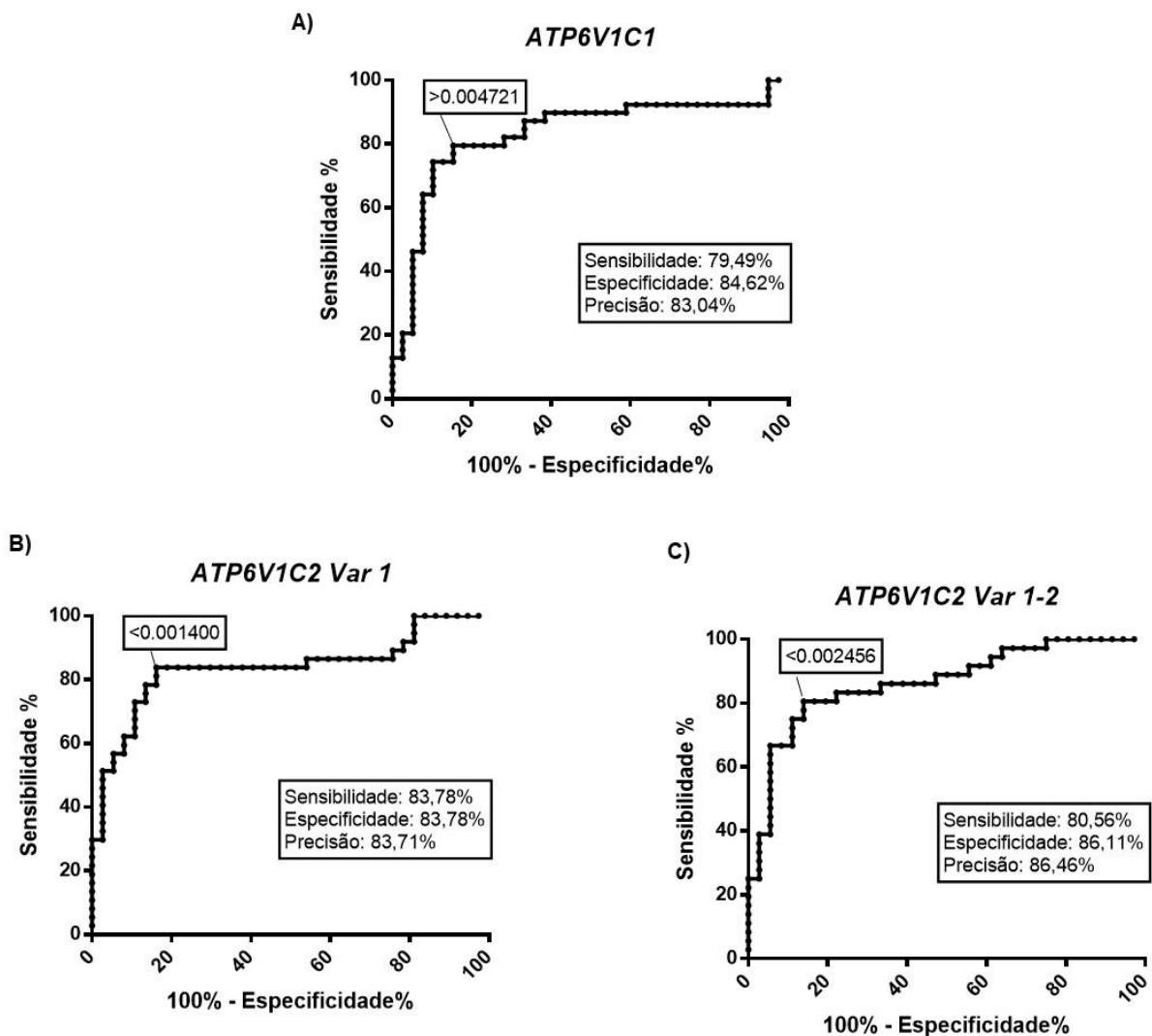


Figura 19: Análise do poder discriminatório de amostras de CEE e tecido normal adjacente por Curva ROC (Receiver Operating Characteristic) pela expressão de isoformas C. Curvas são relativas à expressão de RNAm de: A) *ATP6V1C1*; B) *ATP6V1C2-v1* e C) *ATP6V1C2-v1,2* ($P < 0.0001$).

5.4.1.4. Expressão dos transcritos de *ATP6V1C1* e *ATP6V1C2* nos mais comuns tipos histológicos de CE

Com base no padrão diferencial de expressão de isoformas C encontrada em CEE, buscamos identificar se tal padrão de expressão está envolvido na carcinogênese esofágica em geral, independentemente do subtipo histológico. Para este fim, utilizamos o banco de dados TCGA para avaliar a expressão de *ATP6V1C1* e *ATP6V1C2* em CEE e adenocarcinoma esofágico (ADE). Ambos os tipos histológicos apresentaram níveis de expressão mais elevados de *ATP6V1C1* do que de *ATP6V1C2*. A expressão de *ATP6V1C1* foi aumentada 6,6 vezes quando comparada à expressão de *ATP6V1C2* em tecidos de ADE. Nas amostras de CEE,

ATP6V1C1 foi 11,6 vezes mais expresso do que *ATP6V1C2*, corroborando com os dados obtidos no presente estudo por RT-qPCR, onde *ATP6V1C1* foi 12,72 vezes mais expresso neste tumor do que *ATP6V1C2* (Fig. 20A). Finalmente, os níveis de expressão *ATP6V1C1* foram semelhantes entre os dois subtipos histológicos (mediana de expressão de 1578 para CEE e 1479 para ADE), no entanto, a expressão de *ATP6V1C2* foi menor no CEE do que no ADE (mediana de expressão de 136 para CEE e 225 para ADE) (Fig. 20B).

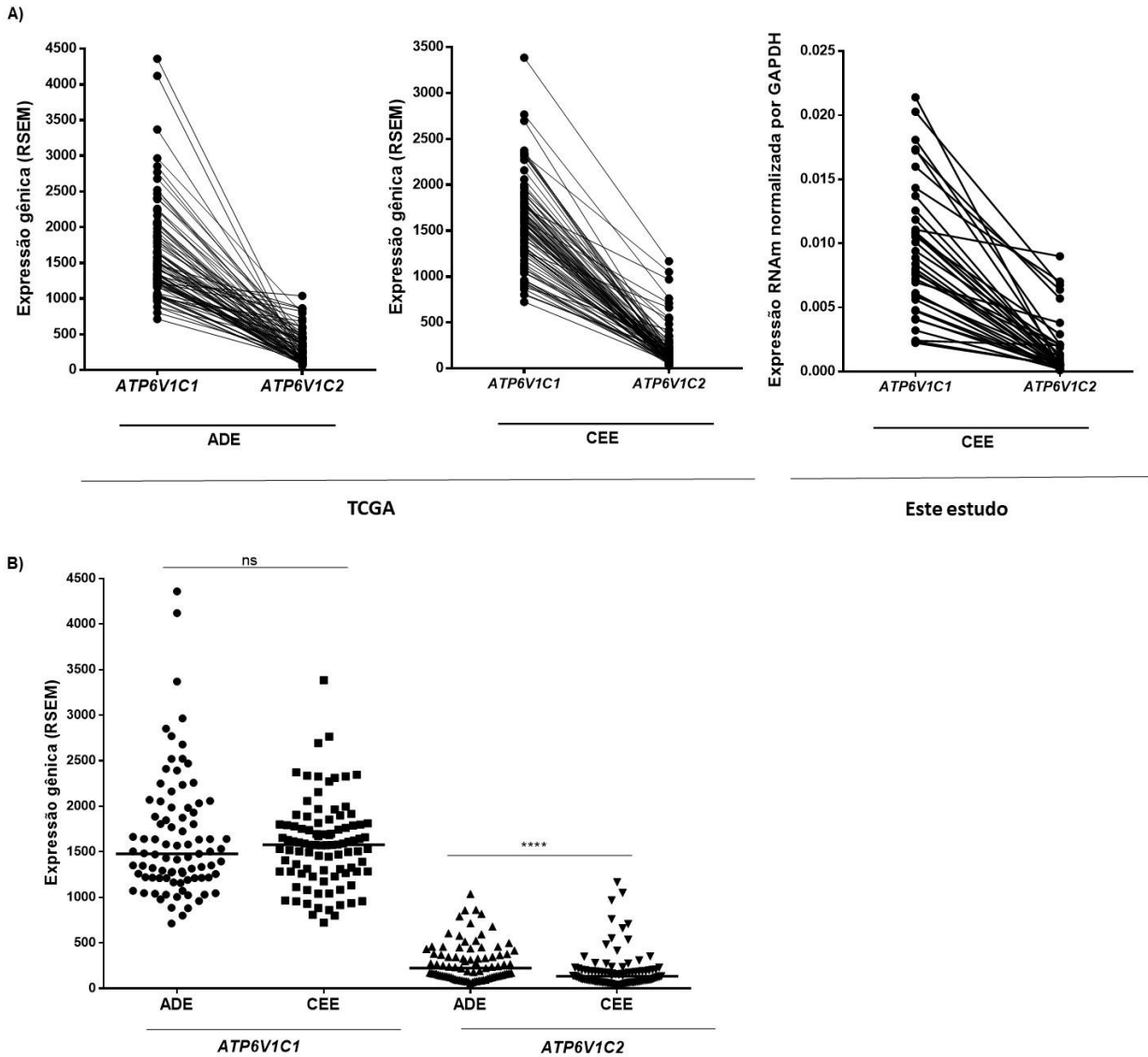


Figura 20: Expressão de mRNA de isoformas C em diferentes subtipos histológicos de câncer de esôfago. A) Expressão dos genes *ATP6V1C1* e *ATP6V1C2* em adenocarcinoma esofágico (ADE) e CEE avaliados por RNA-seq no consórcio TCGA e em CEE por RT-qPCR no presente estudo. B) Mediana de expressão de *ATP6V1C1* e *ATP6V1C2* obtida no TCGA comparando tecidos de ADE e CEE. $P < 0,0001$.

5.4.2. EXPRESSÃO PROTEICA DAS ISOFORMAS C1 E C2a,b NO CEE

A expressão proteica das isoformas C, foram analisadas por imunohistoquímica em 50 tecidos de CEE, sendo 25 destes os mesmos em que foi realizada a análise por qPCR. A maior parte dos pacientes incluídos no estudo eram do sexo masculino (76%), com idade mediana de 59 anos, tabagistas (89%) e etilistas (83%). O terço do esôfago mais acometido foi médio (46%), com tumores em estágio avançado (III ou IV) da doença (54%) e pouco ou moderadamente diferenciado (100%). A taxa de mortalidade foi de 67% com média de sobrevida global de 17 meses e 16% dos pacientes apresentaram metástase a distância (tabela 7).

Tabela 7: Informações clínico-patológicas dos pacientes incluídos nas análises por imunohistoquímica. N.D. Dados indisponíveis no prontuário.

Características clínico-patológicas	n	(%)
Amostras		
Peças cirúrgicas	25	50,0%
Biópsias	25	50,0%
Total	50	
Gênero		
Homens	38	76,0%
Mulheres	12	24,0%
Idade (anos)		
	Mediana	Amplitude
Homens	59	(45-75)
Mulheres	59	(47-84)
Total	59	(45-84)
Consumo de Álcool		
Nunca	4	17,4%
Consumidor/Ex consumidor	19	82,6%
N.D.	27	
Tobacco Consumption		
		(%)
Nunca	3	11,5%
Fumante/Ex fumante	23	88,5%
N.D.	24	
Tumor Site		
Terço superior	4	8,0%
Terço Médio	23	46,0%
Terço Inferior	15	30,0%
Terços Superior e Médio	4	8,0%
Terços Inferior e Médio	3	6,0%
Terços Superior, Médio e Inferior	1	2,0%
Estadiamento do Tumor		
I	5	11,6%
II	15	34,9%
III	15	34,9%
IV	8	18,6%
N.D.	7	
Diferenciação do Tumor		
Bem	0	0,0%
Moderadamente	39	78,0%
Pouco	11	22,0%
Metástase		
Sim	7	16,3%
Não	36	83,7%
N.D.	7	
Morte		
Sim	31	67,4%
Não	15	32,6%
N.D.	4	
Total	50	100%

De forma geral, tumores apresentaram expressão heterogênea predominantemente citoplasmática para ambas as reações, de *C1* e de *C2a,b* (Fig. 21 e 22). A classificação baseou-se no percentual de células tumorais imunorreativas e na intensidade da marcação relativa à marcação encontrada nos respectivos controles positivos, sendo tecido de adenocarcinoma gástrico para *C1* e tecido de rim normal para *C2*, sendo gerado um *score* de 1 a 30.

A maior parte dos tumores apresentaram *score* de 1-9 para *C1* (54%) e de 20-30 para *C2a,b* (62%); a tabela 8 apresenta a estratificação por *score* da expressão de *C1* e *C2a,b*. A expressão de *C1* no epitélio normal adjacente ao tumor foi mais evidente nas camadas inferiores do epitélio, próximos à basal (Fig. 21C). Uma observação notória foi a predominante marcação de *C1* em células inflamatórias ao redor de nichos tumorais que apresentaram pouca ou nenhuma marcação (Fig. 21B). Com relação à expressão das isoformas *C2a,b*, a marcação no epitélio normal adjacente ao tumor foi predominante na camada basal e nas camadas inferiores do epitélio, perdendo intensidade conforme se aproxima das camadas mais superficiais (Fig. 22C).

Tabela 8: Avaliação da expressão das isoforma C em tecidos de CCE

Score	C1		C2a,b	
	n	%	n	%
1-9	27	54	6	12
10-19	19	38	13	26
20-30	3	6	31	62
Negativo	1	2	0	0
Total	50	100%	50	100%

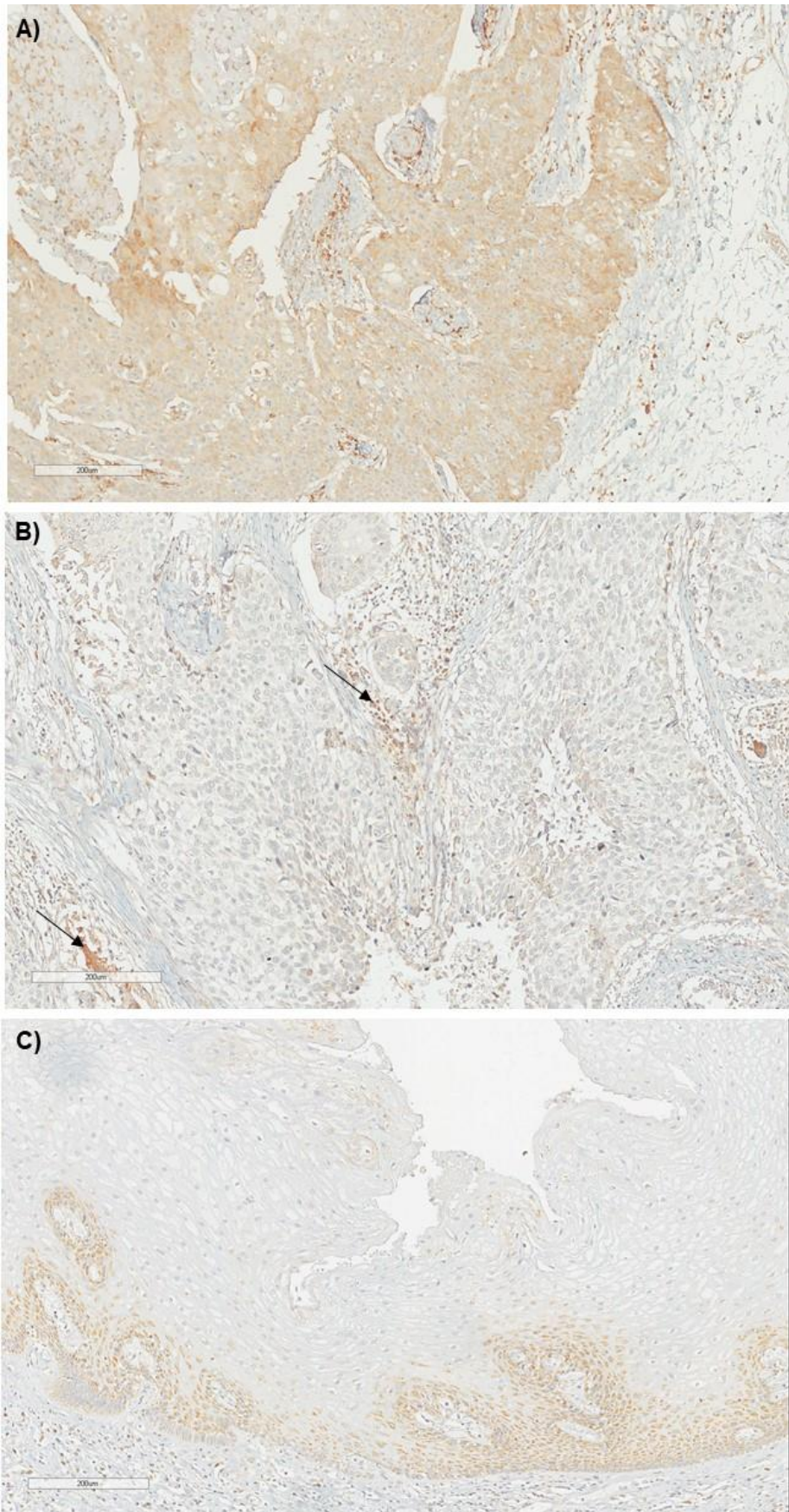


Figura 21: Expressão das isoforma C1 no CEE. A) Marcação forte na área tumoral; B) Setas indicam marcação evidente de células inflamatórias próxima a áreas tumorais com marcação fraca ou ausente; C) Marcação presente nas camadas inferiores do epitélio normal adjacente ao tumor. Barra de escala em 200 µm.

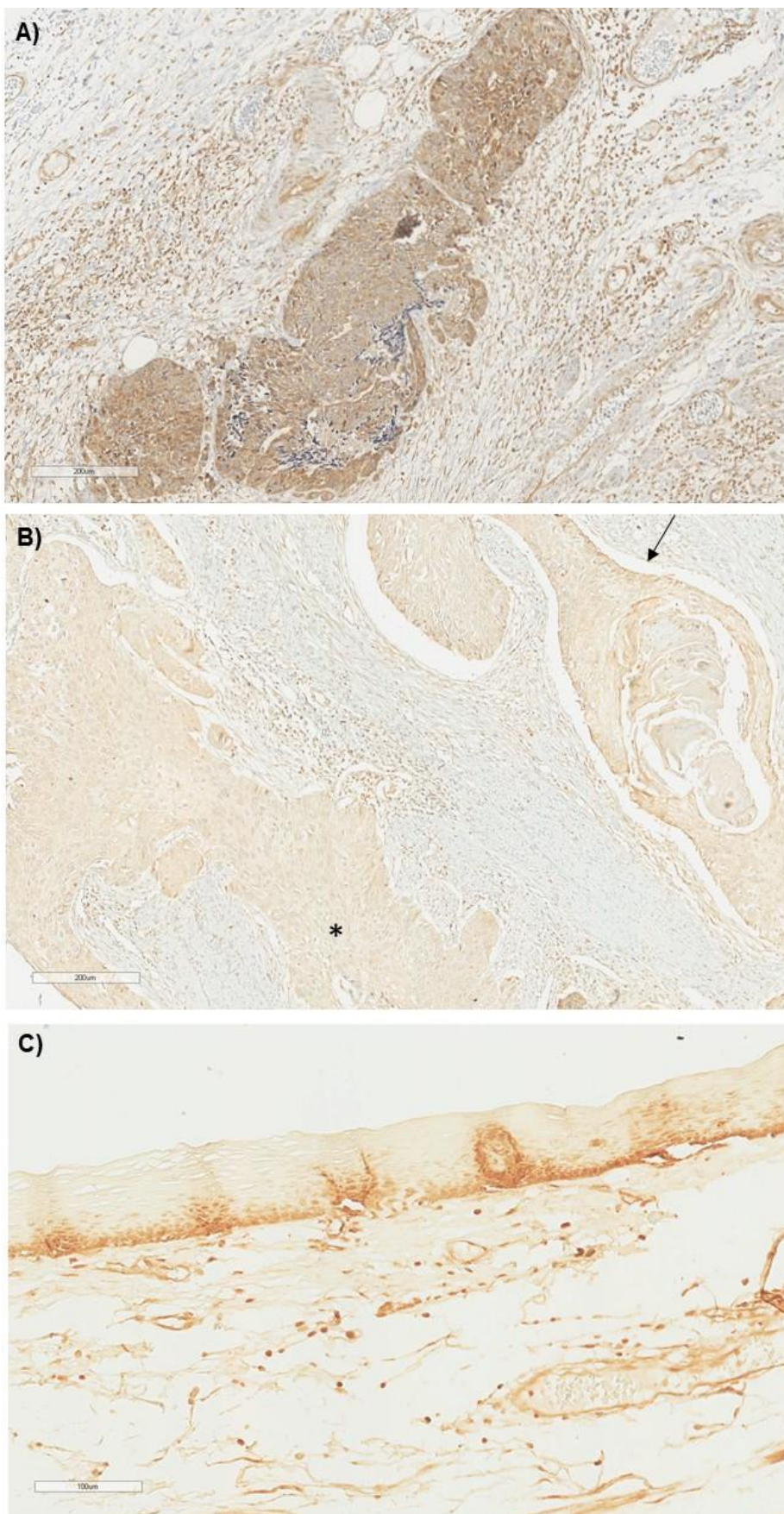


Figura 22: Expressão das isoformas C2a,b no CEE. A) Marcação forte em toda área tumoral; B) Seta indica marcação moderada e asterisco marcação fraca na área do tumor e C) Marcação no epitélio normal adjacente ao tumor. Barra de escala em 200 µm.

5.4.2.1. Associação entre a expressão de *ATP6V1C1* e *ATP6V1C2* e o prognóstico da doença

A mediana do *score* de *C1* e *C2a,b* foi utilizado para classificar como “alta” ou “baixa” expressão nas análises de associação com o estadiamento do tumor e correlação com a sobrevida dos pacientes, a mediana de *score* para *C1* foi de 9 e para *C2a,b* foi de 20. Não foi observada associação entre a expressão das isoformas *C* e o estadiamento do tumor (Fig. 23). No entanto, pacientes com menor expressão de *C1* apresentaram uma sobrevida melhor, com mediana de 31,67 meses, do que pacientes com maior expressão de *C1* que tiveram mediana de sobrevida de 12,73 meses ($p=0,0048$) (Fig. 24 e Tab. 9).

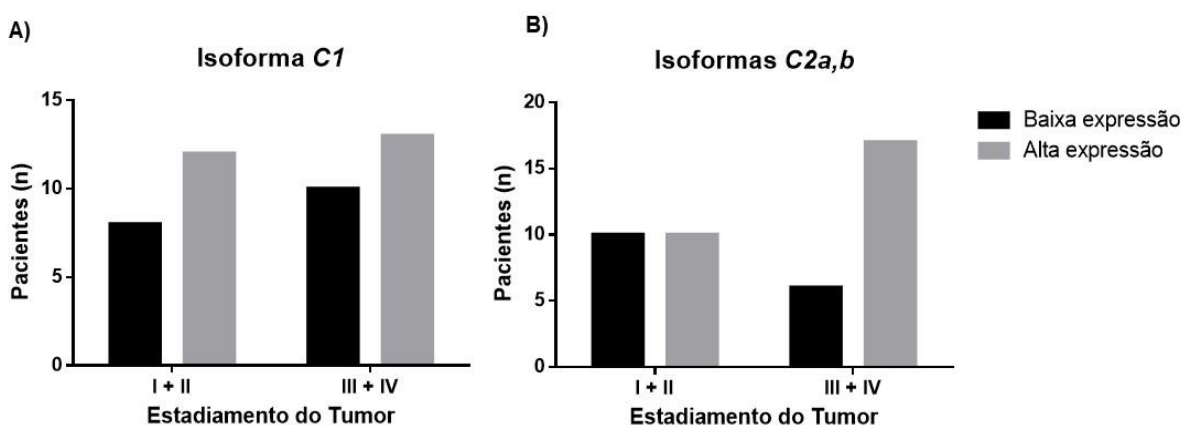


Figura 23: Associação entre o estadiamento patológico e a expressão de: A) isoforma *C1* ($p=1,0000$) e B) isoformas *C2a,b* ($p=0,1267$). Em preto - expressão menor do que a mediana de *score* e em cinza - expressão maior ou igual à mediana de *score*.

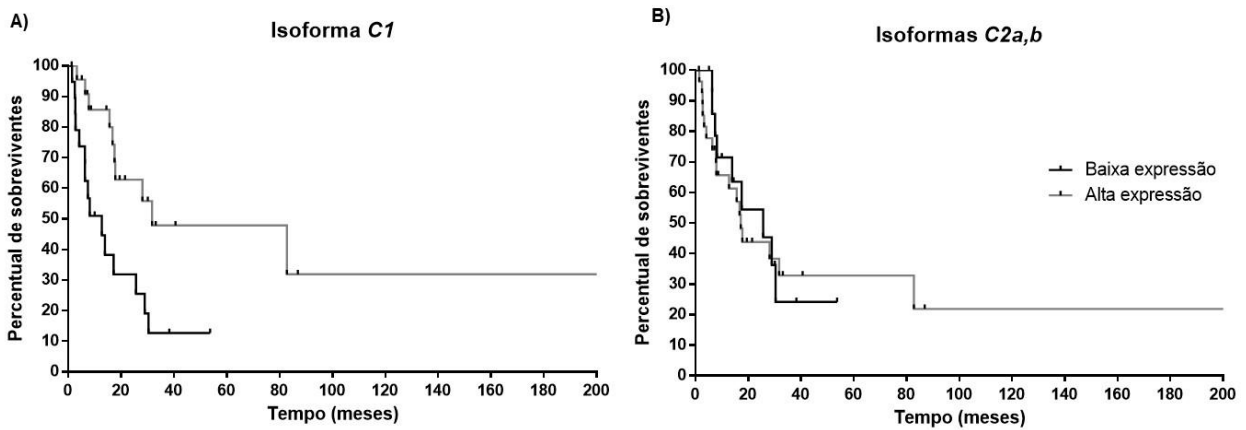


Figura 24: Curvas Kaplan–Meier de sobrevida global apresentada pelos pacientes com CEE de acordo com a expressão de: A) Isoforma C1 ($p=0,0048$); B) Isoforma C2 ($p=0,8829$). Em preto - expressão menor do que a mediana de score e em cinza - expressão maior ou igual à mediana de score.

Tabela 9: Análises do impacto da expressão da isoforma C1 na sobrevida global dos pacientes com CEE.

	Expressão no tumor	Tempo de sobrevida		Valor de P
		Mediana (Meses)	Intervalo de confiança 95%	
Isoforma C1	<mediana	12,73	0,1806 a 0,8947	0,0048
	≥mediana	31,67	1,118 a 5,538	

5.4.3. ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DAS ISOFORMAS DE SUBUNIDADE C DA V-ATPASE

As análises dos domínios conservados entre as isoforma C V-ATPase humana C1 (P21283) (hC1), C2a (NP_001034451.1) (hC2a) e C2b (NP_653184.2) (hC2b) foram realizadas utilizando o programa BLASTP 2.8.0 (Boratyn et al., 2012) no taxon de mamífero do banco de dados NCBI *Protein Reference Sequences*. As sequências de aminoácidos (aa) das três isoformas C são altamente conservadas, sendo que hC1 (382 aa), hC2a (427 aa) e hC2b (381 aa) compartilham pelo menos ~55,3%% de identidade e ~74,2% de similaridade (Tab. 10).

Tabela 10: Similaridades entre isoformas C.

	ID/Sim (%)			R.M.S.D.		
	C1	C2a	C2b	C1	C2a	C2b
C1	---	55.3/74.2	61.9/83.1	---	1.920	1.493
C2a	55.3/74.2	---	89.2/89.2	1.920	---	2.462
C2b	61.9/83.1	89.2/89.2	---	1.493	2.462	---

ID – identidade; Sim – similaridade; R.M.S.D. - Root Mean Square deviation

Apesar do alto grau de identidade e similaridade, a isoforma hC2a possui um éxon adicional que codifica para 45 aminoácidos (aa), posicionado entre os aa 276-321. A análise BlastP sugeriu que a isoforma hC2a está presente em todos os mamíferos, mas ausente em leveduras, nemátodos, moluscos, artrópodes, aves, répteis, anfíbios e plantas superiores, que possuem apenas uma isoforma da subunidade C. A predição das estruturas tridimensionais de hC1, hC2a e hC2b foram realizadas pelas abordagens de modelagem por homologia e *ab initio*. Os cálculos de R.M.S.D. indicam que hC1 e hC2b são mais similares, do ponto de vista estrutural, do que quando comparadas com hC2a (Tab 10), principalmente pelo fato de hC2a apresentar uma região estrutural adicional.

A estrutura tridimensional proposta para isoformas hC1 e hC2b foram propostas por homologia usando como molde a estrutura resolvida da V-ATPase de levedura (3J9V.pdb) e suas estruturas podem ser observadas na figura 25A-B, já a modelagem de C2a foi obtida por *Ab initio*. Inicialmente, análises da qualidade estereoquímica global e local, indicaram como modelo estrutural mais promissor, indicados pelos programas de validação, um modelo que apresentava a região com o peptídeo adicional da hC2a em uma mescla de alfa-hélice e regiões não estruturadas (Fig 25C). No entanto, após uma série de *dockings* proteína-proteína entre os modelos propostos para a hC2a com estruturas já resolvidas da PKA e PKC (Fig. 26 A-B), o modelo conformacional que melhor estabeleceu complexos de interação com essas enzimas foi o modelo possuindo, na região com o peptídeo adicional, uma mescla de folhas beta e regiões não estruturadas (Fig 25D).

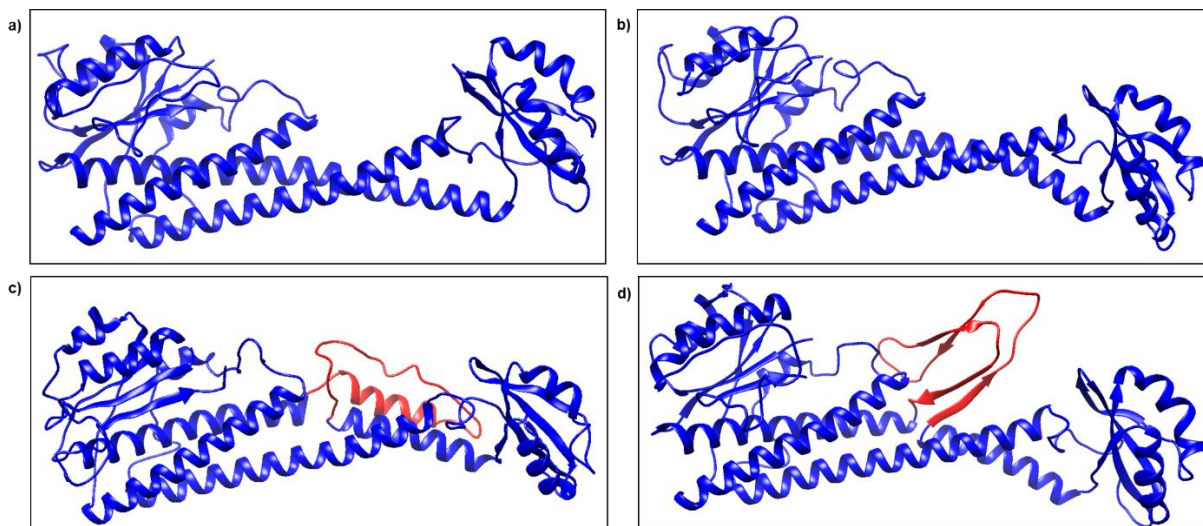


Figura 25: Predição da estrutura 3D das isoformas de subunidade C. A) isoforma hC1, B) isoforma hC2b, C) isoforma hC2a modelo inicialmente proposto e D) isoforma hC2a modelo validado por *Docking de proteínas*. C1 e C2b foram modelados por homologia usando como molde a estrutura resolvida da V-ATPase de levedura (3J9V.pdb) e C2a foi obtida por *Ab initio*. Em vermelho está a região adicional presente na isoforma hC2a humana.

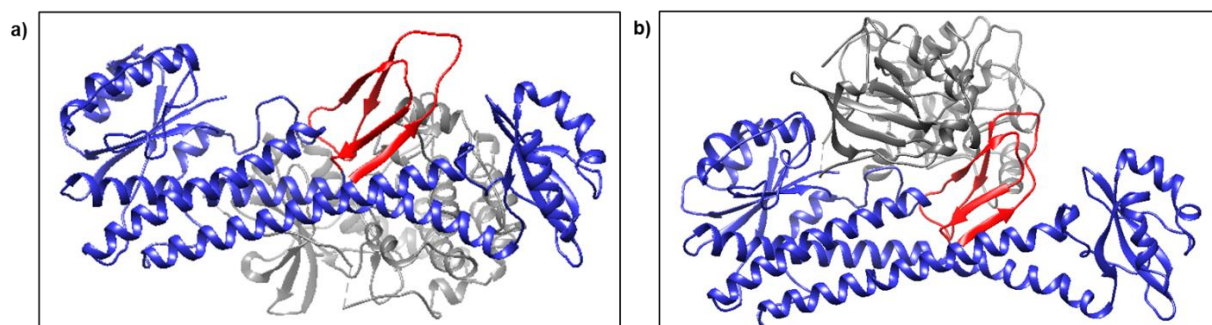


Figura 26: *Docking* de proteínas entre proposto modelo da isoforma hC2a e estruturas já resolvidas de: A) PKA e B) PKC.

Após definir a estrutura mais promissora para a isoforma C2a, foram realizadas análises a fim de identificar possíveis regulações pós-transdacionais específicas na região de 45 aa adicional. Para isso, foi realizada uma busca por sítios de fosforilação e desfosforilação, sendo identificados nessa região 36 *motifs* alvo de serina/treonina quinases e fosfatases, como ERK1 e 2, Caseino Quinase II, PKA, PKC (Tab. 11). Além disso, foram encontrados três *motifs* de ligação para proteínas que reconhecem serinas fosforiladas, neste caso, proteínas que possuem os domínios de ligação WW, MDC1 BRCT e Plk1 PBD (Tab. 12). Não foram encontrados, nesta região adicional da isoforma C2a, sítios de ligação para tirosina quinases/fosfatases.

Tabela 11: *Motifs* alvo de serina/treonina quinase/fosfatase presentes na região de peptídeos adicionais na isoforma hC2a

	Posição no éxon adicional	Sequencia	Motif correspondente descrito na literature (Resíduos fosforilados em vermelho)	Características do motif
1	1 - 6	QTSCVA	X[pS/pT]XXX[A/P/S/T]	G protein-coupled receptor kinase 1 substrate
2	7 - 12	LKKGSS	[M/I/L/V]X[R/K]XX[pS/pT]	Chk1 kinase substrate motif
3	7 - 14	LKKGSSTF	[M/V/L/I/F]X[R/K]XX[pS/pT]XX	Calmodulin-dependent protein kinase II substrate motif
4	8 - 11	KKGS	KXX[pS/pT]	PKA kinase substrate motif
5	8 - 11	KKGS	[R/K]XX[pS/pT]	PKC kinase substrate motif
6	8 - 11	KKGS	[R/K][R/K]X[pS/pT]	PKA kinase substrate motif
7	8 - 12	KKGSS	KXXX[pS/pT]	PKA kinase substrate motif
8	9 - 11	KGS	[R/K]X[pS/pT]	PKA kinase substrate motif
9	9 - 11	KGS	[R/K]X[pS/pT]	PKC kinase substrate motif
10	10 - 15	GSSTFP	X[pS/pT]XXX[A/P/S/T]	G protein-coupled receptor kinase 1 substrate motif
11	11 - 13	SST	pS X[E/ pS*/pT*]	Casein Kinase II substrate motif
12	13 - 16	TFPD	[pS/pT]XX[E/D]	Casein Kinase II substrate motif
13	13 - 16	TFPD	[pS/pT]XX[E/D/ pS*/pY*]	Casein Kinase II substrate motif
14	13 - 16	TFPD	[pS/pT]XX[E/D]	Casein Kinase II substrate motif
15	18 - 22	KVKVT	KXXX[pS/pT]	PKA kinase substrate motif
16	20 - 22	KVT	[R/K]X[pS/pT]	PKA kinase substrate motif
17	20 - 22	KVT	[R/K]X[pS/pT]	PKC kinase substrate motif
18	21 - 23	VTP	X[pS/pT]P	GSK-3, ERK1, ERK2, CDK5 substrate motif
19	35 - 37	TDR	[pS/pT]X[R/K]	PKA kinase substrate motif
20	35 - 37	TDR	[pS/pT]X[R/K]	PKC kinase substrate motif
21	35 - 38	TDRE	[pS/pT]XX[E/D]	Casein Kinase II substrate motif
22	35 - 38	TDRE	[pS/pT]XX[E/D/ pS*/pY*]	Casein Kinase II substrate motif
23	35 - 38	TDRE	[pS/pT]XX[E/D]	Casein Kinase II substrate motif
24	38 - 41	ERES	[E/D]XX[pS/pT]	Casein Kinase I substrate motif
25	39 - 41	RES	RX pS	PKA kinase substrate motif
26	39 - 41	RES	[R/K]X[pS/pT]	PKA kinase substrate motif
27	39 - 41	RES	[R/K]X[pS/pT]	PKC kinase substrate motif
28	39 - 42	RESE	XX[pS/pT]E	G protein-coupled receptor kinase 1 substrate motif
29	40 - 44	ESEGE	[E/D] pS [E/D]X[E/D]	Casein Kinase II substrate motif
30	40 - 44	ESEGE	[E/D][pS/pT]XXX	b-Adrenergic Receptor kinase substrate motif
31	41 - 44	SEGE	pS XX[E/D]	Casein kinase II substrate motif
32	41 - 44	SEGE	pS XX[E/ pS*/pT*]	Casein Kinase II substrate motif
33	41 - 44	SEGE	[pS/pT]XX[E/D]	Casein Kinase II substrate motif
34	41 - 44	SEGE	[pS/pT]XX[E/D/ pS*/pY*]	Casein Kinase II substrate motif
35	41 - 44	SEGE	[pS/pT]XX[E/D]	Casein Kinase II substrate motif
36	41 - 46	SEGEGE	pS [E/D]X[E/D]X[E/D]	Casein Kinase II substrate motif

Tabela 12: *Motifs* que reconhece serina/treonina fosforiladas presentes na região de peptídeos adicionais na isoforma hC2a.

	Posição no éxon adicional	Sequencia	Motif correspondente descrito na literature (Resíduos fosforilados em vermelho)	Características do motif
1	11 - 13	SST	S[pS/pT]X	MDC1 BRCT domain binding motif
2	11 - 13	SST	S[pS/pT]X	Plk1 PBD domain binding motif
3	22 - 23	TP	[pS/pT]P	WW domain binding motif

Por fim, usando como base um domínio de ligação de actina descrito para a subunidade *B*, um domínio “*profilin-like*” (Holliday, Lu et al. 2000, Chen, Bubb et al. 2004, Zuo, Vergara et al. 2008), foram encontrados domínios semelhantes nas três isoformas da subunidade *C* (Fig. 27). É interessante notar que a suposta sequência de ligação à actina na isoforma de C2a foi localizada logo antes da sequência peptídica adicional encontrada nessa isoforma.

C2a	NP_001034451.1	<u>QYQTSCVALKKGSSSTFPDHKVKVTP LGNPDRPAAGQTDRESEGE GEGEGP LLRWLKVNF</u>
C2b	NP_653184.2	-----GPLLRWLKVNF
C1	NP_001686.1	-----GPLVRWLKVNF
B1	NP_001683.2	-----GPLVVLDRVKF
B2	NP_001684.2	-----GPLVILDHVKF
		***: :*:*

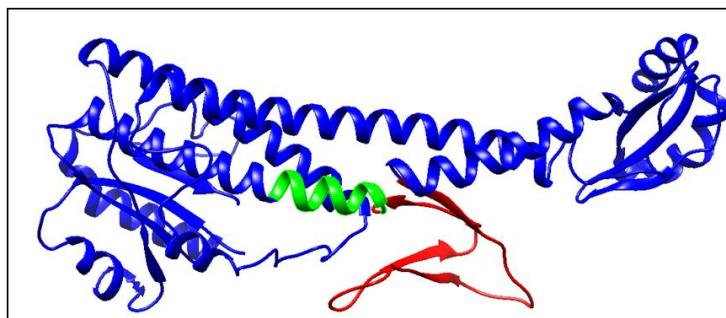


Figura 27: Alinhamento de sequências comparando o domínio “*profilin-like*” descrito para a subunit *B* (caixa vermelha) e sequência similar presente nas isoformas de subinidade *C*. Linha azul e região em vermelho na estrutura 3D de hC2a – 45 aa adicionais presentes na isoforma C2a. Região em verde na estrutura 3D de hC2a – possível região de ligação a actina.

5.5. DISCUSSÃO

A expressão das isoformas *C* obtida a partir do banco de dados de microarranjo foi validada por RT-qPCR e revelou que o grupo de CEE exibe um aumento de 2,5 vezes na expressão de mRNA de *ATP6V1C1* e uma diminuição de 10 vezes na expressão de *ATP6V1C2* em comparação com o grupo de tecidos normais adjacentes ao tumor. Evidências sugerem que a subunidade *C* regula a montagem estrutural e funcional da V-ATPase através da dissociação reversível dos domínios V_1 e V_o (Puopolo, Sczekan et al. 1992, Curtis, Francis et al. 2002, Smardon and Kane 2007). Além disso, a subunidade *C* é a única das 14 subunidades que é liberada no citosol durante a dissociação dos domínios V_1 e V_o da bomba de prótons (Kane and Parra 2000). Em modelos de insetos, que têm apenas uma isoforma *C*, observou-se que esta subunidade se liga a F-actina e à G-actina e, de uma maneira dependente da concentração, aumenta a taxa inicial de polimerização de actina que rege a espessura dos filamentos de actina (Vitavska, Merzendorfer et al. 2005). As interações da subunidade *C* e actina estão envolvidas na estabilização da bomba de prótons em seu estado acoplado, ou seja, ativo (Serra-Peinado, Sicart et al. 2016). O rearranjo do citoesqueleto tem sido implicado em vários processos que interligam a atividade de V-ATPase com o câncer, como o aumento da migração e invasão (Cai, Liu et al. 2014), a liberação de exossomos contendo DNA, mRNA, miRNA e proteínas tumorais (Liegeois, Benedetto et al. 2006), fusão de membranas (Strasser, Iwaszkiewicz et al. 2011), a reciclagem de receptores (Nishi and Forgac 2002) entre outros processos. Assim, em modelos onde existem múltiplas isoformas de subunidade *C*, é possível que as V-ATPases constituídas por diferentes isoformas *C* exibam uma eficiência enzimática distinta e processem de forma diferente as interações da bomba de com o citoesqueleto, interferindo nas mais diversas funções em que este está envolvido.

A superexpressão de subunidades da V-ATPase tem sido associada à um pior prognóstico em diferentes tumores (Otero-Rey, Somoza-Martin et al. 2008, Di Cristofori, Ferrero et al. 2015). Em contraste, nós detectamos um melhor prognóstico dos pacientes com maior expressão da isoforma *C1*, sendo expressões mais elevadas de *C1* correlacionada à uma maior sobrevida global (expressão por imunohistoquímica) e associada à um estadiamento tumoral menos avançado

(expressão por qPCR). Outras associações podem não ter sido observadas devido à limitação das nossas amostras. Para quase 30% dos casos não havia informação sobre o estágio do tumor. Além disso, nosso perfil de amostra, em especial as analisadas por qPCR, possui pouca representação de pacientes com melhor prognóstico (80% dos pacientes amostrados morreram). Um número maior de amostras pode vir a revelar uma estratificação quanto aos níveis de expressão. Ainda nesse sentido, devemos ressaltar que a associação observada entre a isoforma *C1* e um melhor prognóstico para ser considerada real, deve ser confirmada em um número maior de pacientes em que haja informações de estadiamento e sobrevida. No entanto, este trabalho destaca que os valores de expressão de mRNA das isoformas *C* foram capazes de discriminar claramente os tecidos de CEE de tecido normal adjacente, e por isso, devem ser consideradas como um marcador de diagnóstico potencial. Dados de expressão por microarranjo também apontaram uma variação de expressão das isoforma *C* entre tecido esofágico de pacientes saudáveis e de CEE.

Dados de RNA-seq depositados no TCGA revelaram que a relação entre a expressão de *ATP6V1C1* e *ATP6V1C2* é comum aos tumores esofágicos, independentemente do tipo histológico. Merece destaque o fato de ADE se assemelhar mais ao adenocarcinoma gástrico em relação às alterações moleculares, enquanto o CEE está mais próximo de carcinomas escamosos de cabeça e pescoço (Nancarrow, Clouston et al. 2011). De fato, a ADE e CEE diferem não só quanto ao tipo histológico, mas, áreas de incidência em no mundo, fatores de risco e alterações moleculares características. Portanto, o padrão de expressão de isoformas *C* similar encontrado em ambos os tumores sugere que esse evento possa ser encontrado em outros tumores além do esôfago.

O nível de RNAm de *ATP6V1C2-v2* (isoforma de *C2b*) foi muito baixo nas amostras avaliadas, impedindo sua quantificação relativa da expressão por qPCR. No entanto, observamos claramente uma correlação significativa entre os níveis de RNAm de *ATP6V1C2-v1* e *ATP6V1C2-v1,2* ($r = 0,9521$, $p < 0,00001$). Na verdade, é possível que a maior parte da expressão observada na análise *ATP6V1C2-v1,2* seja devida à expressão da variante 1, isto é, isoforma *C2a*. Considerando todos esses dados, a estrutura tridimensional de cada isoforma *C* foi proposta. Diferente das isoformas de *C1* e *C2b*, a isoforma *C2a* contém uma sequência peptídica adicional

dotada de locais de ligação para diferentes quinases e fosfatases, sugerindo regulações pós-transducionais diferenciais de bombas constituídas por diferentes isoformas *C* expressas na holoenzima. Holliday (Holliday 2014) em um artigo de revisão sugeriu por Swiss-Model um modelo estrutural para a isoforma C2a com a sequência peptídica adicional em uma dobra de folha beta flanqueada por regiões não estruturadas. No entanto, nossa análise de qualidade estereoquímica mostrou para essa região uma conformação em alfa-hélice flanqueada por regiões não estruturadas como o modelo mais estável. Para resolver essa questão, realizamos um *docking* entre os modelos previstos para C2a e enzimas que são conhecidas por se ligarem à subunidade *C*, PKA e PKC (Voss, Vitavska et al. 2007) e, o único modelo que permitiu a ligação de C2a à PKA e PKC, foi com a sequência adicional de peptídeos estruturada em uma folha beta flanqueada por regiões não estruturadas. É tentador especular que ambas as conformações possam ser encontradas fisiologicamente em diferentes situações, especialmente levando-se em conta que a subunidade *C* é liberada da bomba durante a dissociação dos domínios V_1 - V_0 .

Tal processo regulatório da bomba de dissociação reversível dos domínios V_1 - V_0 é dependente da interação da subunidade *C* com filamentos de actina (Vitavska, Merzendorfer et al. 2005, Serra-Peinado, Sicart et al. 2016) e baseado em um domínio de ligação de actina descrito para a subunidade *B* (Holliday, Lu et al. 2000, Chen, Bubb et al. 2004, Zuo, Vergara et al. 2008), encontramos domínios semelhantes nas três isoformas *C*. No entanto, é interessante destacar que a possível sequência de ligação a actina presente na isoforma de C2a foi localizada logo antes da sequência peptídica adicional encontrada nessa isoforma. Portanto, é provável que a região adicional presente na isoforma C2a possa interferir nas interações dessa isoforma com o citoesqueleto e integrar um susposto mecanismo regulatório para a ligação da actina à C2a.

Evidências foram fornecidas para um distintivo padrão de expressão das isoformas da subunidade *C* no CEE, revelando *ATP6V1C1* e *ATP6V1C2* como alvos promissores para o desenvolvimento de novos biomarcadores diagnóstico/prognóstico e alvos terapêuticos potenciais para o CEE. Tais descobertas abrem uma nova via para a compreensão do impacto funcional da expressão diferencial das isoformas *C* no desenvolvimento e evolução da

carcinogênese esofágica e conduzem a avanços futuros na exploração do papel da V-ATPase na carcinogênese.

5.6. CONCLUSÕES

- A V-ATPase exibe um padrão de expressão específico de suas subunidades/isoformas no CEE;
- As isoformas de subunidade C da V-ATPase apresentam uma expressão diferencial no CEE em relação ao tecido normal adjacente ao tumor;
- *ATP6V1C1* e *ATP6V1C2* são alvos promissores para o desenvolvimento de novos biomarcadores de diagnóstico para o CEE;
- A principal diferença entre as isoformas de subunidade C da V-ATPase consiste de uma região adicional de 45 aminoácidos presentes na isoforma C2a, a qual é alvo de diferentes quinases tendo sido validado um modelo de interação envolvendo uma conformação em folha beta flaqueada por regiões desestruturadas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amanchy, R., B. Periaswamy, S. Mathivanan, R. Reddy, S. G. Tattikota and A. Pandey (2007). "A curated compendium of phosphorylation motifs." Nat Biotechnol **25**(3): 285-286.
- Armbruster, A., C. Hohn, A. Hermesdorf, K. Schumacher, M. Borsch and G. Gruber (2005). "Evidence for major structural changes in subunit C of the vacuolar ATPase due to nucleotide binding." FEBS Lett **579**(9): 1961-1967.
- Armbruster, A., D. I. Svergun, U. Coskun, S. Juliano, S. M. Bailer and G. Gruber (2004). "Structural analysis of the stalk subunit Vma5p of the yeast V-ATPase in solution." FEBS Lett **570**(1-3): 119-125.
- Arnold, M., I. Soerjomataram, J. Ferlay and D. Forman (2015). "Global incidence of oesophageal cancer by histological subtype in 2012." Gut **64**(3): 381-387.
- Biasini, M., S. Bienert, A. Waterhouse, K. Arnold, G. Studer, T. Schmidt, F. Kiefer, T. Gallo Cassarino, M. Bertoni, L. Bordoli and T. Schwede (2014). "SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information." Nucleic Acids Res **42**(Web Server issue): W252-258.
- Bidkhor, G., Z. Narimani, S. Hosseini Ashtiani, A. Moeini, A. Nowzari-Dalini and A. Masoudi-Nejad (2013). "Reconstruction of an integrated genome-scale co-expression network reveals key modules involved in lung adenocarcinoma." PLoS One **8**(7): e67552.
- Bird-Lieberman, E. L. and R. C. Fitzgerald (2009). "Early diagnosis of oesophageal cancer." Br J Cancer **101**(1): 1-6.
- Boratyn, G. M., A. A. Schaffer, R. Agarwala, S. F. Altschul, D. J. Lipman and T. L. Madden (2012). "Domain enhanced lookup time accelerated BLAST." Biol Direct **7**: 12.
- Cai, M., P. Liu, L. Wei, J. Wang, J. Qi, S. Feng and L. Deng (2014). "Atp6v1c1 may regulate filament actin arrangement in breast cancer cells." PLoS One **9**(1): e84833.
- Cao, R., D. Bhattacharya, J. Hou and J. Cheng (2016). "DeepQA: improving the estimation of single protein model quality with deep belief networks." BMC Bioinformatics **17**(1): 495.
- Cao, R. and J. Cheng (2016). "Protein single-model quality assessment by feature-based probability density functions." Sci Rep **6**: 23990.
- Capecci, J. and M. Forgac (2013). "The function of vacuolar ATPase (V-ATPase) a subunit isoforms in invasiveness of MCF10a and MCF10CA1a human breast cancer cells." J Biol Chem **288**(45): 32731-32741.
- Casey, J. R., S. Grinstein and J. Orłowski (2010). "Sensors and regulators of intracellular pH." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(1): 50-61.
- Castellsague, X., N. Munoz, E. De Stefani, C. Victora, R. Castelletto, P. Rolon and M. Quintana (1999). "Independent and joint effects of tobacco smoking and alcohol drinking on the risk of esophageal cancer in men and women." Int J Cancer **82**: 657-664.

- Castellsague, X., N. Munoz, E. De Stefani, C. G. Victora, R. Castelletto and P. A. Rolon (2000). "Influence of mate drinking, hot beverages and diet on esophageal cancer risk in South America." Int J Cancer **88**(4): 658-664.
- Cerami, E., J. Gao, U. Dogrusoz, B. E. Gross, S. O. Sumer, B. A. Aksoy, A. Jacobsen, C. J. Byrne, M. L. Heuer, E. Larsson, Y. Antipin, B. Reva, A. P. Goldberg, C. Sander and N. Schultz (2012). "The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data." Cancer Discov **2**(5): 401-404.
- Chen, H., P. Liu, T. Zhang, Y. Gao, Y. Zhang, X. Shen, X. Li and W. Shen (2018). "Effects of diphyllin as a novel V-ATPase inhibitor on TE-1 and ECA-109 cells." Oncol Rep **39**(3): 921-928.
- Chen, S. H., M. R. Bubb, E. G. Yarmola, J. Zuo, J. Jiang, B. S. Lee, M. Lu, S. L. Gluck, I. R. Hurst and L. S. Holliday (2004). "Vacuolar H⁺-ATPase binding to microfilaments: regulation in response to phosphatidylinositol 3-kinase activity and detailed characterization of the actin-binding site in subunit B." J Biol Chem **279**(9): 7988-7998.
- Cipriano, D. J., Y. Wang, S. Bond, A. Hinton, K. C. Jefferies, J. Qi and M. Forgac (2008). "Structure and regulation of the vacuolar ATPases." Biochim Biophys Acta **1777**(7-8): 599-604.
- Comeau, S. R., D. W. Gatchell, S. Vajda and C. J. Camacho (2004). "ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes." Bioinformatics **20**(1): 45-50.
- Cross, R. L. and V. Muller (2004). "The evolution of A-, F-, and V-type ATP synthases and ATPases: reversals in function and changes in the H⁺/ATP coupling ratio." FEBS Lett **576**(1-2): 1-4.
- Curtis, K. K., S. A. Francis, Y. Oluwatosin and P. M. Kane (2002). "Mutational analysis of the subunit C (Vma5p) of the yeast vacuolar H⁺-ATPase." J Biol Chem **277**(11): 8979-8988.
- da Costa, N. M., S. C. Soares Lima, T. de Almeida Simao and L. F. Ribeiro Pinto (2013). "The potential of molecular markers to improve interventions through the natural history of oesophageal squamous cell carcinoma." Biosci Rep **33**(4).
- Denko, N. C. (2008). "Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour." Nat Rev Cancer **8**(9): 705-713.
- Di Cristofori, A., S. Ferrero, I. Bertolini, G. Gaudioso, M. V. Russo, V. Berno, M. Vanini, M. Locatelli, M. Zavanone, P. Rampini, T. Vaccari, M. Caroli and V. Vaira (2015). "The vacuolar H⁺ ATPase is a novel therapeutic target for glioblastoma." Oncotarget **6**(19): 17514-17531.
- Drory, O., F. Frolov and N. Nelson (2004). "Crystal structure of yeast V-ATPase subunit C reveals its stator function." EMBO Rep **5**(12): 1148-1152.
- Eisenberg, D., R. Luthy and J. U. Bowie (1997). "VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles." Methods Enzymol **277**: 396-404.
- Enzinger, P. C. and R. J. Mayer (2003). "Esophageal cancer." N Engl J Med **349**(23): 2241-2252.

- Feng, S., G. Zhu, M. McConnell, L. Deng, Q. Zhao, M. Wu, Q. Zhou, J. Wang, J. Qi, Y. P. Li and W. Chen (2013). "Silencing of *atp6v1c1* prevents breast cancer growth and bone metastasis." Int J Biol Sci **9**(8): 853-862.
- Ferlay, J., I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D. M. Parkin, D. Forman and F. Bray (2015). "Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012." Int J Cancer **136**(5): E359-386.
- Forgac, M. (2007). "Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(11): 917-929.
- Gamliel, Z. and M. J. Krasna (2005). "Multimodality treatment of esophageal cancer." Surg Clin North Am **85**(3): 621-630.
- Gao, J., B. A. Aksoy, U. Dogrusoz, G. Dresdner, B. Gross, S. O. Sumer, Y. Sun, A. Jacobsen, R. Sinha, E. Larsson, E. Cerami, C. Sander and N. Schultz (2013). "Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal." Sci Signal **6**(269): p11.
- Gogarten, J. P., T. Starke, H. Kibak, J. Fishman and L. Taiz (1992). "Evolution and isoforms of V-ATPase subunits." J Exp Biol **172**: 137-147.
- Gruber, G. (2005). "Structural features and nucleotide-binding capability of the C subunit are integral to the regulation of the eukaryotic V1Vo ATPases." Biochem Soc Trans **33**(Pt 4): 883-885.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.
- Holliday, L. S. (2014). "Vacuolar H⁺-ATPase: An Essential Multitasking Enzyme in Physiology and Pathophysiology." N Engl J Med **2014**.
- Holliday, L. S., M. Lu, B. S. Lee, R. D. Nelson, S. Solivan, L. Zhang and S. L. Gluck (2000). "The amino-terminal domain of the B subunit of vacuolar H⁺-ATPase contains a filamentous actin binding site." J Biol Chem **275**(41): 32331-32337.
- Huang, L., Q. Lu, Y. Han, Z. Li, Z. Zhang and X. Li (2012). "ABCG2/V-ATPase was associated with the drug resistance and tumor metastasis of esophageal squamous cancer cells." Diagn Pathol **7**: 180.
- IARC/WHO (2014). Globocan 2012, International Agency for Research on Cancer e World Health Organization <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>.
- INCA (2018). "Estimativas INCA 2018 - Incidência de câncer no Brasil."
- Inoue, T. and M. Forgac (2005). "Cysteine-mediated cross-linking indicates that subunit C of the V-ATPase is in close proximity to subunits E and G of the V1 domain and subunit a of the V0 domain." J Biol Chem **280**(30): 27896-27903.
- Iwata, M., H. Imamura, E. Stambouli, C. Ikeda, M. Tamakoshi, K. Nagata, H. Makyio, B. Hankamer, J. Barber, M. Yoshida, K. Yokoyama and S. Iwata (2004). "Crystal structure of a central stalk subunit C and reversible association/dissociation of vacuole-type ATPase." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(1): 59-64.

Kallberg, M., H. Wang, S. Wang, J. Peng, Z. Wang, H. Lu and J. Xu (2012). "Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server." Nat Protoc **7**(8): 1511-1522.

Kane, P. M. (1995). "Disassembly and reassembly of the yeast vacuolar H(+)-ATPase in vivo." J Biol Chem **270**(28): 17025-17032.

Kane, P. M. and K. J. Parra (2000). "Assembly and regulation of the yeast vacuolar H(+)-ATPase." J Exp Biol **203**(Pt 1): 81-87.

Kawasaki-Nishi, S., K. Bowers, T. Nishi, M. Forgac and T. H. Stevens (2001). "The amino-terminal domain of the vacuolar proton-translocating ATPase a subunit controls targeting and in vivo dissociation, and the carboxyl-terminal domain affects coupling of proton transport and ATP hydrolysis." J Biol Chem **276**(50): 47411-47420.

Kawasaki-Nishi, S., T. Nishi and M. Forgac (2001). "Yeast V-ATPase complexes containing different isoforms of the 100-kDa a-subunit differ in coupling efficiency and in vivo dissociation." J Biol Chem **276**(21): 17941-17948.

Kulshrestha, A., G. K. Katara, S. Ibrahim, S. Pamarthy, M. K. Jaiswal, A. Gilman Sachs and K. D. Beaman (2015). "Vacuolar ATPase 'a2' isoform exhibits distinct cell surface accumulation and modulates matrix metalloproteinase activity in ovarian cancer." Oncotarget **6**(6): 3797-3810.

Liegeois, S., A. Benedetto, J. M. Garnier, Y. Schwab and M. Labouesse (2006). "The V0-ATPase mediates apical secretion of exosomes containing Hedgehog-related proteins in *Caenorhabditis elegans*." J Cell Biol **173**(6): 949-961.

Lim, J. H., J. W. Park, S. J. Kim, M. S. Kim, S. K. Park, R. S. Johnson and Y. S. Chun (2007). "ATP6V0C competes with von Hippel-Lindau protein in hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) binding and mediates HIF-1alpha expression by bafilomycin A1." Mol Pharmacol **71**(3): 942-948.

Lima, S. C., H. Hernandez-Vargas, T. Simao, G. Durand, C. D. Krueel, F. Le Calvez-Kelm, L. F. Ribeiro Pinto and Z. Herceg (2011). "Identification of a DNA methylome signature of esophageal squamous cell carcinoma and potential epigenetic biomarkers." Epigenetics **6**(10): 1217-1227.

Lovell, S. C., I. W. Davis, W. B. Arendall, 3rd, P. I. de Bakker, J. M. Word, M. G. Prisant, J. S. Richardson and D. C. Richardson (2003). "Structure validation by Calpha geometry: phi,psi and Cbeta deviation." Proteins **50**(3): 437-450.

Malhotra, S., O. K. Mathew and R. Sowdhamini (2015). "DOCKSCORE: a webserver for ranking protein-protein docked poses." BMC Bioinformatics **16**: 127.

Manavalan, B. and J. Lee (2017). "SVMQA: support-vector-machine-based protein single-model quality assessment." Bioinformatics **33**(16): 2496-2503.

Marchler-Bauer, A., Y. Bo, L. Han, J. He, C. J. Lanczycki, S. Lu, F. Chitsaz, M. K. Derbyshire, R. C. Geer, N. R. Gonzales, M. Gwadz, D. I. Hurwitz, F. Lu, G. H. Marchler, J. S. Song, N. Thanki, Z. Wang, R. A. Yamashita, D. Zhang, C. Zheng, L. Y. Geer and S. H. Bryant (2017). "CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures." Nucleic Acids Res **45**(D1): D200-D203.

- Marshansky, V., J. L. Rubinstein and G. Gruber (2014). "Eukaryotic V-ATPase: novel structural findings and functional insights." Biochim Biophys Acta **1837**(6): 857-879.
- McConnell, M., S. Feng, W. Chen, G. Zhu, D. Shen, S. Ponnazhagan, L. Deng and Y. P. Li (2017). "Osteoclast proton pump regulator Atp6v1c1 enhances breast cancer growth by activating the mTORC1 pathway and bone metastasis by increasing V-ATPase activity." Oncotarget **8**(29): 47675-47690.
- Menon, S. and B. D. Manning (2008). "Common corruption of the mTOR signaling network in human tumors." Oncogene **27 Suppl 2**: S43-51.
- Moal, I. H., B. Jimenez-Garcia and J. Fernandez-Recio (2015). "CCharPPI web server: computational characterization of protein-protein interactions from structure." Bioinformatics **31**(1): 123-125.
- Morel, N., J. C. Dedieu and J. M. Philippe (2003). "Specific sorting of the $\alpha 1$ isoform of the V-H+ATPase a subunit to nerve terminals where it associates with both synaptic vesicles and the presynaptic plasma membrane." J Cell Sci **116**(Pt 23): 4751-4762.
- Nancarrow, D. J., A. D. Clouston, B. M. Smithers, D. C. Gotley, P. A. Drew, D. I. Watson, S. Tyagi, N. K. Hayward, D. C. Whiteman, S. Australian Cancer and H. Study of Digestive (2011). "Whole genome expression array profiling highlights differences in mucosal defense genes in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma." PLoS One **6**(7): e22513.
- Nishi, T. and M. Forgac (2002). "The vacuolar (H⁺)-ATPases--nature's most versatile proton pumps." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(2): 94-103.
- Nishisho, T., K. Hata, M. Nakanishi, Y. Morita, G. H. Sun-Wada, Y. Wada, N. Yasui and T. Yoneda (2011). "The $\alpha 3$ isoform vacuolar type H⁽⁺⁾-ATPase promotes distant metastasis in the mouse B16 melanoma cells." Mol Cancer Res **9**(7): 845-855.
- Olechnovic, K. and C. Venclovas (2017). "VoroMQA: Assessment of protein structure quality using interatomic contact areas." Proteins **85**(6): 1131-1145.
- Olivier, M., R. Eeles, M. Hollstein, M. A. Khan, C. C. Harris and P. Hainaut (2002). "The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users." Hum Mutat **19**(6): 607-614.
- Oot, R. A. and S. Wilkens (2010). "Domain characterization and interaction of the yeast vacuolar ATPase subunit C with the peripheral stator stalk subunits E and G." J Biol Chem **285**(32): 24654-24664.
- Otero-Rey, E. M., M. Somoza-Martin, F. Barros-Angueira and A. Garcia-Garcia (2008). "Intracellular pH regulation in oral squamous cell carcinoma is mediated by increased V-ATPase activity via over-expression of the ATP6V1C1 gene." Oral Oncol **44**(2): 193-199.
- Pamarthy, S., A. Kulshrestha, G. K. Katara and K. D. Beaman (2018). "The curious case of vacuolar ATPase: regulation of signaling pathways." Mol Cancer **17**(1): 41.
- Parkin, D. M., F. Bray, J. Ferlay and P. Pisani (2005). "Global cancer statistics, 2002." CA Cancer J Clin **55**(2): 74-108.

- Parra, K. J., C. Y. Chan and J. Chen (2014). "Saccharomyces cerevisiae vacuolar H⁺-ATPase regulation by disassembly and reassembly: one structure and multiple signals." Eukaryot Cell **13**(6): 706-714.
- Petitjean, A., E. Mathe, S. Kato, C. Ishioka, S. V. Tavtigian, P. Hainaut and M. Olivier (2007). "Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database." Hum Mutat **28**(6): 622-629.
- Pettersen, E. F., T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng and T. E. Ferrin (2004). "UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis." J Comput Chem **25**(13): 1605-1612.
- Puopolo, K., M. Sczekan, R. Magner and M. Forgac (1992). "The 40-kDa subunit enhances but is not required for activity of the coated vesicle proton pump." J Biol Chem **267**(8): 5171-5176.
- Rice, T. W., E. H. Blackstone and V. W. Rusch (2010). "A cancer staging primer: esophagus and esophagogastric junction." J Thorac Cardiovasc Surg **139**(3): 527-529.
- Rolon, P. A., X. Castellsague, M. Benz and N. Munoz (1995). "Hot and cold mate drinking and esophageal cancer in Paraguay." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **4**(6): 595-605.
- Rossini, A., T. de Almeida Simao, C. B. Marques, S. C. Soares-Lima, S. Herbster, D. C. Rapozo, N. A. Andreollo, M. A. Ferreira, K. B. El-Jaick, R. Teixeira, D. P. Guimaraes, R. M. Albano and L. F. Ribeiro Pinto (2010). "TP53 mutation profile of esophageal squamous cell carcinomas of patients from Southeastern Brazil." Mutat Res **696**(1): 10-15.
- Rustgi, A. K. and H. B. El-Serag (2014). "Esophageal carcinoma." N Engl J Med **371**(26): 2499-2509.
- Sali, A. and T. L. Blundell (1993). "Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints." J Mol Biol **234**(3): 779-815.
- Schweigert, M., A. Dubecz and H. J. Stein (2013). "Oesophageal cancer--an overview." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **10**(4): 230-244.
- Serra-Peinado, C., A. Sicart, J. Llopis and G. Egea (2016). "Actin Filaments Are Involved in the Coupling of V0-V1 Domains of Vacuolar H⁺-ATPase at the Golgi Complex." J Biol Chem **291**(14): 7286-7299.
- Sewram, V., E. De Stefani, P. Brennan and P. Boffetta (2003). "Mate consumption and the risk of squamous cell esophageal cancer in uruguay." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **12**(6): 508-513.
- Simão, T. A., P. T. Souza-Santos, D. S. de Oliveira, V. Bernardo, S. C. Lima, D. C. Rapozo, C. D. Krueel, P. A. Faria, L. F. Ribeiro Pinto and R. M. Albano (2011). "Quantitative evaluation of SPRR3 expression in esophageal squamous cell carcinoma by qPCR and its potential use as a biomarker." Exp Mol Pathol **91**(2): 584-589.
- Smardon, A. M. and P. M. Kane (2007). "RAVE is essential for the efficient assembly of the C subunit with the vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase." J Biol Chem **282**(36): 26185-26194.

- Smith, A. N., K. J. Borthwick and F. E. Karet (2002). "Molecular cloning and characterization of novel tissue-specific isoforms of the human vacuolar H(+)-ATPase C, G and d subunits, and their evaluation in autosomal recessive distal renal tubular acidosis." Gene **297**(1-2): 169-177.
- Son, S. W., S. H. Kim, E. Y. Moon, D. H. Kim, S. Pyo and S. H. Um (2016). "Prognostic significance and function of the vacuolar H⁺-ATPase subunit V1E1 in esophageal squamous cell carcinoma." Oncotarget **7**(31): 49334-49348.
- Stransky, L., K. Cotter and M. Forgac (2016). "The Function of V-ATPases in Cancer." Physiol Rev **96**(3): 1071-1091.
- Strasser, B., J. Iwaszkiewicz, O. Michielin and A. Mayer (2011). "The V-ATPase proteolipid cylinder promotes the lipid-mixing stage of SNARE-dependent fusion of yeast vacuoles." EMBO J **30**(20): 4126-4141.
- Sukhwal, A. and R. Sowdhamini (2015). "PPCheck: A Webserver for the Quantitative Analysis of Protein-Protein Interfaces and Prediction of Residue Hotspots." Bioinform Biol Insights **9**: 141-151.
- Sun-Wada, G. H., Y. Murata, M. Namba, A. Yamamoto, Y. Wada and M. Futai (2003). "Mouse proton pump ATPase C subunit isoforms (C2-a and C2-b) specifically expressed in kidney and lung." J Biol Chem **278**(45): 44843-44851.
- Sun-Wada, G. H., T. Yoshimizu, Y. Imai-Senga, Y. Wada and M. Futai (2003). "Diversity of mouse proton-translocating ATPase: presence of multiple isoforms of the C, d and G subunits." Gene **302**(1-2): 147-153.
- Toei, M., R. Saum and M. Forgac (2010). "Regulation and isoform function of the V-ATPases." Biochemistry **49**(23): 4715-4723.
- Toyomura, T., Y. Murata, A. Yamamoto, T. Oka, G. H. Sun-Wada, Y. Wada and M. Futai (2003). "From lysosomes to the plasma membrane: localization of vacuolar-type H⁺ -ATPase with the a3 isoform during osteoclast differentiation." J Biol Chem **278**(24): 22023-22030.
- Uziela, K., D. Menendez Hurtado, N. Shu, B. Wallner and A. Elofsson (2017). "ProQ3D: improved model quality assessments using deep learning." Bioinformatics **33**(10): 1578-1580.
- van Zundert, G. C. P., J. Rodrigues, M. Trellet, C. Schmitz, P. L. Kastiris, E. Karaca, A. S. J. Melquiond, M. van Dijk, S. J. de Vries and A. Bonvin (2016). "The HADDOCK2.2 Web Server: User-Friendly Integrative Modeling of Biomolecular Complexes." J Mol Biol **428**(4): 720-725.
- Vangone, A. and A. M. Bonvin (2015). "Contacts-based prediction of binding affinity in protein-protein complexes." Elife **4**: e07454.
- Vassallo, A., P. Correa, E. De Stefani, M. Cendan, D. Zavala, V. Chen, J. Carzoglio and H. Deneo-Pellegrini (1985). "Esophageal cancer in Uruguay: a case-control study." J Natl Cancer Inst **75**(6): 1005-1009.
- Victora, C. G., N. Munoz, N. E. Day, L. B. Barcelos, D. A. Peccin and N. M. Braga (1987). "Hot beverages and oesophageal cancer in southern Brazil: a case-control study." Int J Cancer **39**(6): 710-716.

- Vitavska, O., H. Merzendorfer and H. Wiczorek (2005). "The V-ATPase subunit C binds to polymeric F-actin as well as to monomeric G-actin and induces cross-linking of actin filaments." J Biol Chem **280**(2): 1070-1076.
- Voss, M., O. Vitavska, B. Walz, H. Wiczorek and O. Baumann (2007). "Stimulus-induced phosphorylation of vacuolar H(+)-ATPase by protein kinase A." J Biol Chem **282**(46): 33735-33742.
- Wagner, C. A., K. E. Finberg, S. Breton, V. Marshansky, D. Brown and J. P. Geibel (2004). "Renal vacuolar H+-ATPase." Physiol Rev **84**(4): 1263-1314.
- Webb, B. A., M. Chimenti, M. P. Jacobson and D. L. Barber (2011). "Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression." Nat Rev Cancer **11**(9): 671-677.
- Wiederstein, M. and M. J. Sippl (2007). "ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins." Nucleic Acids Res **35**(Web Server issue): W407-410.
- Xu, D. and Y. Zhang (2011). "Improving the physical realism and structural accuracy of protein models by a two-step atomic-level energy minimization." Biophys J **101**(10): 2525-2534.
- Xu, J., R. Xie, X. Liu, G. Wen, H. Jin, Z. Yu, Y. Jiang, Z. Zhao, Y. Yang, B. Ji, H. Dong and B. Tuo (2012). "Expression and functional role of vacuolar H(+)-ATPase in human hepatocellular carcinoma." Carcinogenesis **33**(12): 2432-2440.
- Xu, T. and M. Forgac (2001). "Microtubules are involved in glucose-dependent dissociation of the yeast vacuolar [H+]-ATPase in vivo." J Biol Chem **276**(27): 24855-24861.
- Xue, L. C., J. P. Rodrigues, P. L. Kastritis, A. M. Bonvin and A. Vangone (2016). "PRODIGY: a web server for predicting the binding affinity of protein-protein complexes." Bioinformatics **32**(23): 3676-3678.
- Yang, J., R. Yan, A. Roy, D. Xu, J. Poisson and Y. Zhang (2015). "The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction." Nat Methods **12**(1): 7-8.
- Zhang, Z., T. Inoue, M. Forgac and S. Wilkens (2006). "Localization of subunit C (Vma5p) in the yeast vacuolar ATPase by immuno electron microscopy." FEBS Lett **580**(8): 2006-2010.
- Zoncu, R., L. Bar-Peled, A. Efeyan, S. Wang, Y. Sancak and D. M. Sabatini (2011). "mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H(+)-ATPase." Science **334**(6056): 678-683.
- Zuo, J., S. Vergara, S. Kohno and L. S. Holliday (2008). "Biochemical and functional characterization of the actin-binding activity of the B subunit of yeast vacuolar H+-ATPase." J Exp Biol **211**(Pt 7): 1102-1108.