JEFFREY ROBERTO REINA GARCIASALAS

**Mecanismo molecular do tráfego núcleo-citoplasmático de
maspina**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo

2018

JEFFREY ROBERTO REINA GARCIASALAS

**Mecanismo molecular do tráfego núcleo-citoplasmático de
maspina**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Nathalie Cella

Versão Original

São Paulo

2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Garciasalas Reina, Jeffrey Roberto
Mecanismo molecular do tráfego núcleo-
citoplasmático de maspina / Jeffrey Roberto
Garciasalas Reina; orientadora Nathalie Cella. --
São Paulo, 2018.
133 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Maspina. 2. NLS. 3. Transporte nuclear. 4.
Carioferinas. I. Cella, Nathalie, orientador. II.
Título.

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Candidato(a): Jeffrey Roberto Reina Garciasalas

Título da Tese: Mecanismo molecular do tráfego núcleo-citoplasmático de maspina

Orientador(a): Profa. Dra. Nathalie Cella

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a) () Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº **652/14** referente ao projeto intitulado: "*Mecanismo molecular do tráfego núcleo-citoplasmático e da meia vida de maspina, um gene supressor de tumor*" sob a responsabilidade de **Jeffrey Roberto Reina Garciasalas**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº466 de 2012.

São Paulo, 26 de março de 2014.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a minha família pelo apoio incondicional durante esta etapa. Especialmente a meus pais e meus irmãos por escutar meus desabafos, minhas alegrias e sempre estar aí quando precisava deles.

A minha orientadora Profa. Dra. Nathalie Cella, por ter me recebido no laboratório dela e ter me ensinado tantas coisas sobre o mundo da pesquisa, da ciência e da vida.

Aos meus colegas do laboratório: Longhi, Magna e Perereinha pela ajuda e parceria nas coisas do laboratório, pelas risadas, cafés, conversas e a sua paciência.

A todos os meus colegas do 428: Pri, Heydi, Ana, Suely, Maira, Luciana, Iuri e Thaiomara pela ajuda e os bons momentos da nossa convivência.

A Profa. Dra. Vanessa Moraes e a Profa. Dra. Marilene por todo o auxílio nesse período.

A Profa. Dra. Nelly Panté do Life Sciences Institute da University of British Columbia por ter me recebido durante 6 meses no seu laboratório e pela orientação e auxílio em todos os momentos.

A Profa. Dra. Júlia Pinheiro Chagas da Cunha do Laboratório Especial de Ciclo Celular-LECC/cetics do Instituto Butantan pela ajuda com o espectrômetro de massas.

A todos os membros do “Panté Lab”: Lixin, Shuang, Bern, Shaghayegh e Julian, por toda a ajuda, conversas e paciência para me ensinar as coisas do laboratório.

A todos os meus amigos do departamento de Biologia Celular e Tecidual, do ICB e da USP, por toda a ajuda e colaboração com empréstimo de reagentes e de equipamento.

A minha família em São Paulo: Luna, Arno, Bia, Nilo, Flavio e Carol. Obrigado por todo o apoio durante esses anos, sem vocês teria sido mais difícil me adaptar a essa cidade. Obrigado por todas as viagens e diversões e estar ai quando precisava.

Aos meus amigos em Vancouver: Fabricio, Yasmin, Gerson, Giorgos, Eleni, JJ, Kate, Derek, Onur, Alp, Jeanisse, David, Abhijit, Niny, Shams, Felipe e o resto dos meus amigos de St. John's College por ter sido minha família durante esses 6 meses em Vancouver, por todo o apoio que recebi e por todas as noites de foosball e de Fifa para aliviar o estresse.

Aos meus amigos da Guatemala, Richard, Jonas, Daniela, Lalu, Briones, Valerie, Erick, Pris, Winnie, Hugo, Julio por sempre estar me apoiando e torcendo para mim de longe.

A todos meus amigos dessa cidade e desse maravilhoso pais por ter me acolhido durante todo esse tempo.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Estudantes Convênio Pós-Graduação (PEC-PG) da CAPES/CNPq pela concessão da bolsa de doutorado direto (Processo: 12568-13-9) e permitir realizar meus estudos no Brasil.

Ao *Canadian Bureau for International Education* pela concessão da bolsa *Emerging Leaders of The Americas Program* (ELAP) para realizar o estágio no laboratório da Profa. Dra. Nelly Panté em Vancouver, Canadá.

À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

RESUMO

REINA GARCIASALAS, J.R. **Mecanismo molecular do Tráfego núcleo-citoplasmático de maspina**. 2018. 133 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Maspina (SERPINB5) é um potencial gene supressor de tumor com atividades biológicas pleiotrópicas, incluindo a regulação da proliferação, morte, adesão e migração celular e a expressão gênica e a resposta ao estresse oxidativo. O mecanismo molecular subjacente a sua função é pouco conhecido. Vários estudos sugerem que a localização subcelular de maspina tem um papel essencial na sua função biológica e sua atividade supressora de tumor. A maspina nuclear tem sido associada a um bom prognóstico, enquanto que a sua localização núcleo-citoplasmática tem sido correlacionada à progressão tumoral. Portanto, este trabalho teve como objetivo investigar o mecanismo molecular da translocação nuclear de maspina. Assim, identificamos um sinal de localização nuclear (NLS) bipartido na sequência de maspina usando um software de predição de NLS. Deleção do NLS resulta em diminuição dos níveis de maspina nuclear. No entanto, observamos que maspina também é capaz de se difundir ao núcleo em células HeLa permeabilizadas com digitonina. Porém, estudos prévios indicaram que a localização subcelular de maspina é regulada na célula intacta. Assim, para poder distinguir o transporte regulado do passivo, fusionamos a sequência inteira de maspina e do seu NLS a 5GFPs (MaspinFL e 5GFPs-MaspinNLS, respectivamente). Foi observado que o NLS de maspina, mas não a sequência inteira da proteína, foi capaz de translocar a proteína quimérica ao núcleo, o que sugere que a disponibilidade do NLS de maspina pode ser regulada na sua estrutura nativa. Além disso, foi observado que a translocação nuclear de 5GFPs-MaspinNLS foi inibida pela co-transfecção com mutantes de Ran-GTPase, indicando que o processo depende de Ran-GTPase e portanto ocorre ativamente. Não observamos uma interação do NLS de maspina com carioferina alfa 2 (KPNA2) nem uma inibição do transporte nuclear de maspina ao tratar células com importazole, um inibidor da via clássica, o que sugere que maspina transloca para o núcleo de uma forma não convencional.

Palavras-chave: Maspina. NLS. Transporte nuclear. Carioferinas.

ABSTRACT

REINA GARCIASALAS, J.R. **Molecular mechanism of maspin nucleocytoplasmic traffic**. 2018. 133 f. PhD Thesis (Cell and Tissue Biology) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Maspin (SERPINB5) is a potential tumor suppressor gene with pleiotropic biological activities, including regulation of cell proliferation, death, adhesion, migration, gene expression and oxidative stress response. The molecular mechanism underlying maspin function is poorly understood. Several studies suggest that subcellular localization plays an essential role on maspin biological function and tumor suppression activity. Nuclear maspin has been associated with a good prognostic, whereas nucleocytoplasmic localization correlates with tumor progression. The objective of this project was to investigate the mechanism underlying maspin nuclear translocation. We identified a bipartite Nuclear Localization Signal (NLS) in maspin protein sequence using an NLS prediction software. Deletion of maspin NLS leads to decrease in maspin nuclear levels. However, we also observed that maspin diffuses into the nucleus of digitonin-permeabilized cells. Still, previous studies indicated that maspin subcellular localization is regulated in the intact cell. Considering this, in order to distinguish between regulated and passive nuclear transport, maspin NLS sequence and full-length protein sequence were fused to 5GFPs (5GFPs-MaspinNLS and MaspinFL, respectively). We observed that MaspinNLS, but not MaspinFL, was able to drive 5GFPs nuclear translocation, suggesting that the availability of maspin NLS may be regulated in the native maspin structure. Furthermore, 5GFPs-MaspinNLS nuclear translocation was abrogated by mutant Ran-GTPase co-transfection, indicating that this process depends on Ran-GTPase and it occurs actively. An interaction between Maspin NLS and karyopherin alpha 2 (KPNA2) was not detected neither an inhibition of maspin nuclear transport when cells were treated with importazole, an inhibitor of the classic nuclear import pathway. These data suggest that maspin may be translocating to the nucleus in a non-conventional manner.

Keywords: Maspin. NLS. Nuclear transport. Karyopherins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura tridimensional de Maspina.....	22
Figura 2. Representação das funções de maspina e sua localização subcelular.....	24
Figura 3. Publicações de maspina e câncer no período do dia 28 de janeiro de 1994 ao dia 24 de abril de 2017.....	34
Figura 4. A via clássica de importação e exportação nuclear.....	37
Figura 5. Estrutura de importina α	40
Figura 6. Vias não convencionais de importação nuclear.....	45
Figura 7. Predição de um NLS na sequência de maspina humana utilizando o programa cNLS Mapper.....	64
Figura 8. Deleção do possível sinal de localização nuclear (NLS) de maspina.....	66
Figura 9. Localização de maspina com os resíduos do NLS predito deletados.....	67
Figura 10. Diagrama esquemático das mutações em lisinas e argininas feitas no plasmídeo maspina-GFP.....	69
Figura 11. Localização de maspina-GFP com as mutações em lisina no NLS de maspina.....	70
Figura 12. Localização de maspina-GFP com as mutações em arginina no NLS de maspina.....	71
Figura 13. Localização de maspina-GFP com as mutações em serinas.....	73
Figura 14. A maspina conjugada a partículas de ouro não é capaz de entrar no núcleo em ovócitos de <i>Xenopus laevis</i>	75
Figura 15. Maspina se difunde para o núcleo em células permeabilizadas com digitonina.....	77
Figura 16. Plasmídeos de 5GFPs utilizados para o estudo do transporte regulado de maspina.....	79
Figura 17. O NLS de maspina fusionado a 5GFPs induz o transporte nuclear da proteína quimérica em células HeLa.....	81
Figura 18. O NLS de maspina fusionado a 5GFPs induz o transporte nuclear da proteína quimérica em células HEK23T.....	82
Figura 19. O NLS de maspina fusionado a 5GFPs induz o transporte nuclear da proteína quimérica em células MCF10A.....	83
Figura 20. Os mutantes de Ran-GTPase inibem a importação nuclear de 5GFPs-MaspinNLS em células HeLa.....	85
Figura 21. O NLS de maspina não interage com KPNA2 em células HeLa transfectadas.....	87
Figura 22. O NLS de maspina não interage com KPNA2 em células HeLa transfectadas.....	88
Figura 23. Maspina não interage com KPNA2 em células MCF10A.....	89
Figura 24. A maspina nuclear aumenta depois da inibição de KPNB1.....	92
Figura 25. Análise das proteínas que co-imunoprecipitam com maspina após tratamento com Importazole.....	93
Figura 27. O NLS de maspina se encontra conservado em mamíferos.....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tipos de NLS e suas sequencias de consenso.	39
Tabela 2. Resíduos essenciais para ligação do NLS na importina α	41
Tabela 3. Nomenclatura da família de importinas.	42
Tabela 4. Importinas semelhantes a importina β e sua carga.	43
Tabela 5. Primers utilizados para as mutações sítio-dirigidas das lisinas e argininas do possível NLS de maspina.	52
Tabela 6. Organismos utilizados no alinhamento múltiplo.	60
Tabela 7. Variações na sequência do NLS de maspina associadas a tumores	95
Tabela 8. Proteínas com múltiplas vias de importação e exportação nuclear.	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcMNPV: *Autographa californica Multiple Nucleopolyhedrovirus*

ARM: Repetições armadillo

ATCC: do inglês *American Type Culture Collection*

ATP: Adenosina trifosfato

bFGF: fator de crescimento fibroblástico básico (*Basic Fibroblast Growth Factor*)

BSA: Albumina de Soro Bovino (*Bovine Serum Albumin*)

CAS: proteína de susceptibilidade de apoptose celular (*Cellular apoptosis susceptibility protein*)

cDNA: DNA complementar

cNLS: NLS clássico

Crml: do inglês *Chromosome region maintenance 1*

DMEM: do inglês *Dulbecco's modified Eagle's medium*

DMSO: Di-metilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DTS: do inglês, *DNA nuclear targeting sequence*

DTT: 1,4-Ditiotreitol

EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (*Ethylenediamine Tetraacetic Acid*)

EGF: Fator de Crescimento Epidermal (*Epidermal Growth Factor*)

EGFR: Receptor do Fator de Crescimento Epidermal (Epidermal Growth Factor Receptor)

EGTA: Ácido Etileno Glicol Tetracético (*Ethylene Glycol Tetraacetic Acid*)

eNOS: óxido nítrico endotelial (*endotelial Nitric Oxide Synthase*)

ERK: Proteínas Quinases Reguladas por Estímulos Extracelulares (*Extracellular Signal Regulated Kinases 1/2*)

FG: motivos de fenilalanina-glicina

GCF2: Fator 2 ligante de GC (*GC binding factor 2*)

GDP: Guanosina difosfato

GFP: Proteína Verde Fluorescente (*Green Fluorescent Protein*)

GST: Glutathione S-Transferase (*Glutathione S-Transferase*)

GTP: Guanosina trifosfato

HDAC1: Deacetilase de histona 1 (*Histone Deacetylase 1*)

HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)-1piperazineetanossulfônico (*4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*)

HIV-1: Vírus de Imunodeficiência Humana 1

HRE: Elemento Responsivo a Hormônios (*Hormone response element*)

HSP90: Proteína de choque térmico de 90kDa (*Heat Shock Protein 90*)

IBB: Domínio de ligação à importina beta (*Importin Beta Binding domain*)

IKK α : Quinase I κ B quinase α (*I κ B kinase α*)

IPZ: Importazole

IRF6: Fator regulador de interferon 6 (*Interferon regulatory factor 6*)

ITC: Calorimetria de Titulação Isotérmica (*Isothermal Titration Calorimetry*)

KPNA1: Carioferina alfa 1 (*Karyopherin alpha 1*)

KPNA2: Carioferina alfa 2 (*Karyopherin alpha 2*)

KPNA3: Carioferina alfa 3 (*Karyopherin alpha 3*)

KPNA4: Carioferina alfa 4 (*Karyopherin alpha 4*)

KPNA5: Carioferina alfa 5 (*Karyopherin alpha 5*)

KPNA6: Carioferina alfa 6 (*Karyopherin alpha 6*)

KPNA7: Carioferina alfa 7 (*Karyopherin alpha 7*)

KPNB1: Carioferina beta 1 (*Karyopherin beta 1*)

KPNB2: Carioferina beta 2 (*Karyopherin beta 2*)

KPNB3: Carioferina beta 3 (*Karyopherin beta 3*)

LEF1: Fator ligante do potencializador linfóide 1 (*Lymphoid Enhancer Binding Factor 1*)

MaspinFL: Sequência inteira de maspina (*Full length*)

MBP: Maltose Binding Protein

MnSOD: dismutase de superóxido de Manganês (*Manganese Superoxide Dismutase*)

MT: Myc tag

Na₃VO₄: Ortovanadato de sódio

NaCl: Cloreto de sódio

NES: Sinal de exportação nuclear (*Nuclear export signal*)

NF κ B: Fator nuclear kappa B (*Nuclear factor kappa B*)

NLS: Sinal de localização nuclear (*Nuclear localization signal*)

NOS: Sintase de óxido nítrico (*Nitric oxide synthase*)

NPC: Complexo do poro nuclear (*Nuclear Pore Complex*)

Nups: Nucleoporinas

P110: Inibidor de protease 10 (*Protease Inhibitor 10*)

PAI2: Inibidor do ativador de plasminogênio 2 (Plasminogen activator inhibitor-2)

PBS: Tampão de fosfato salina (*Phosphate buffered saline*)

PBST: PBS com 0,1% de Tween 20

PDEF: Fator Ets derivado de próstata (*Prostate derived ets factor*)

PEDF: Fator derivado de epitélio pigmentado (*Pigment epithelium-derived factor*)

PEI: Polietilenimina

PFA: Paraformaldeído

PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinase (Phosphatidylinositol 3-kinase)

PINCH1: Proteína nova rica em cisteína-histidina particularmente interessante 1 (*Particularly interesting new cysteine-histidine rich protein 1*)

PMSF: Fluoreto de fenilmetilsulfonil (*Phenylmethanesulfonyl Fluoride*)

PTEN: Fosfatase homóloga a tensina (*Phosphatase and tensin homolog*)

PY-NLS: Sinal de localização nuclear de prolina-tirosina (*Proline-tyrosine nuclear localization signal*)

Ran: Proteína nuclear relacionada a Ras (*Ras related nuclear protein*)

RANKL: Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa-B (*Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*)

RCC1: Regulador de condensação de cromossomos 1, fator de troca de guanina de Ran (*Ran Guanine nucleotide Exchange fator*).

RanGAP: proteína ativadora de GTPase de Ran (*Ran GTPase activating protein*).

RCL: do inglês, *reactive center loop*; também referida como *reactive site loop* (RSL)

RFP: Proteína fluorescente vermelha (*Red Fluorescent Protein*)

RNA: Ácido ribonucleico

ROS: espécies reativas de oxigênio

SCCA1: Antígeno celular de carcinoma escamoso 1 (*Squamous cell carcinoma antigen 1*)

SCCA2: Antígeno celular de carcinoma escamoso 1 (*Squamous cell carcinoma antigen 2*)

SDS: Dodecil sulfato de sódio (*Sodium dodecyl sulfate*)

SV40: Antígeno T do Simian virus 40 (*Simian Virus antigen T*)

STRA8: proteína 8 estimulada pelo ácido retinóico (*Stimulated by retinoic acid 8*)

TF: Fator de transcrição

TGF- β : Fator de crescimento tumoral beta (*Tumor growth factor beta*)

TNF α : Fator de necrose tumoral alfa (*Tumor necrosis factor alpha*)

tPA: Ativador de plasminogênio tecidual (*Tissue plasminogen activator*)

uPA: Ativador de Plasminogênio do tipo uroquinase (*Urokinase-type Plasminogen Activator*)

uPAR: Receptor do Ativador de Plasminogênio do tipo uroquinase (*Urokinase-type Plasminogen Activator Receptor*)

VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular (*Vascular endothelial growth factor*)

WASP: Proteína da síndrome de Wiskott-Aldrich

WT: do inglês *Wild type*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 <i>Maspina</i>	20
1.1.1 Estrutura molecular	21
1.1.2 Localização subcelular e funções biológicas de maspina	23
1.1.2.1 Maspina extracelular	24
1.1.2.2 Maspina citoplasmática	26
1.1.2.3 Maspina nuclear	27
1.1.3 Regulação da expressão gênica de maspina	29
1.1.3.1 Regulação positiva	29
1.1.3.2 Regulação negativa	30
1.1.4 Modificações pós-traducionais de maspina	31
1.1.5 Maspina e câncer	32
1.2 <i>O Transporte nuclear</i>	35
1.2.1 A via clássica de importação e exportação nuclear	35
1.2.2 NLS	37
1.2.3 Importinas da via clássica: importinas alfa e beta	39
1.2.4 Vias de importação nuclear não clássicas	43
1.2.5 Transporte núcleo-citoplasmático e regulação dos processos celulares	46
2 OBJETIVOS	47
2.1 <i>Objetivo geral</i>	47
2.2 <i>Objetivos específicos</i>	47
3 MATERIAL E MÉTODOS	48
3.1 <i>Predição do NLS de Maspina</i>	48
3.2 <i>Cultura de Células</i>	48
3.2.1 Cultivo de células HeLa	48
3.2.2 Cultivo de células HEK293T	48
3.2.3 Cultivo de células MCF10A	48
3.3 <i>Plasmídeos e clonagem</i>	49
3.3.1 Clonagem de Maspina-GFP	49
3.3.2 Clonagem de MaspinFL-5GFPs	49
3.3.3 Clonagem de 5GFPs-MaspinNLS	50
3.3.4 Outras construções	50
3.3.4.1 Plasmídeo 5GFPs-NLS1	51
3.3.4.2 Plasmídeo de Ran-GTPase e mutantes	51
3.4 <i>Mutações sítio dirigidas</i>	51
3.4.1 Deleção do NLS	51
3.4.2 Mutações sítio dirigidas dos resíduos de Lisina e Arginina do possível NLS:	51
3.4.3 Mutação sítio dirigida dos resíduos de Serina:	52
3.5 <i>Transfecção e Co-transfecção de plasmídeos</i>	52
3.5.1 Transfecção de células HeLa com Lipofectamine 2000	53
3.5.2 Transfecção de células HEK293T com PEI	53
3.5.3 Transfecção de células HeLa e MCF10A com Eugene HD	53
3.5.4 Visualização das células transfectadas	53

3.6	Quantificação da importação nuclear.....	54
3.7	Ensaio de Importação nuclear em células permeabilizadas com digitonina	54
3.8	Microinjeção de <i>Xenopus laevis</i> com Maspina-Ouro	55
3.9	Tratamento de células MCF10A com Importazole	55
3.10	Imunofluorescência de maspina e p65 em células MCF10A:	56
3.11	Co-Imunoprecipitação	56
3.11.1	Extração de proteínas para co-imunoprecipitação	56
3.11.2	Co-Immunoprecipitação de KPNA2 com anti-GFP	57
3.11.3	Co-Immunoprecipitação de GFP com KPNA2	57
3.11.4	Co-Immunoprecipitação de KPNA2 com anti-maspina	58
3.11.5	Identificação por Espectrometria de Massas de proteínas que co- imunoprecipitam com maspina em células tratadas com Importazole.	58
3.12	Western Blot.....	59
3.13	Alinhamento múltiplo da sequência do NLS de maspina em outros organismos ..	59
3.14	Variações dos aminoácidos na sequência do NLS de maspina que estão associadas a tumores.....	61
4	RESULTADOS.....	62
4.1	Predição de um Sinal de Localização Nuclear (NLS) de maspina.....	63
4.2	A sequência do NLS de Maspina está envolvida no transporte nuclear de maspina	64
4.3	Localização subcelular de Maspina com mutações sítio-dirigidas dos resíduos de Lisina e Arginina no possível NLS	68
4.4	Localização subcelular de Maspina com as mutações dos resíduos de Serina 135 e 240	72
4.5	A localização de maspina depende do tipo de célula	74
4.6	Maspina se difunde ao núcleo em células permeabilizadas com digitonina	76
4.7	O NLS de maspina fusionado a 5GFPS transporta a proteína quimérica em células HeLa transfectadas.....	78
4.8	Ran-GTPase está envolvido no transporte nuclear do NLS de maspina.....	84
4.9	O NLS de maspina não interage com KPNA2	86
4.10	O NLS de maspina transloca para o núcleo por uma via não convencional.....	89
4.11	A sequência do NLS de Maspina se encontra conservada em outros organismos	93
4.12	Variações dos aminoácidos na sequência do NLS de maspina estão associadas a tumores.....	94
5	DISCUSSÃO	96
6	CONCLUSÕES	105
	REFERÊNCIAS.....	106
	APÊNDICE.....	129

1 INTRODUÇÃO

A maspina é uma proteína supressora de tumor identificada pela primeira vez quando foram comparados genes expressos em células da glândula mamária normais que não eram expressos em células tumorais (ZOU et al., 1994). Maspina tem diversas atividades biológicas: inibe o crescimento tumoral e a invasão, regula a adesão e migração celular, e apoptose, modula a resposta celular ao estresse oxidativo e controla a transcrição gênica (BAILEY et al., 2006).

O papel de maspina como supressora de tumor é ainda controverso. Alguns estudos têm observado uma diminuição da expressão de maspina em tumores (HOJO et al., 2001; MAASS et al., 2001; SOPEL; KASPRZYK; BERDOWSKA, 2005). No entanto, outros trabalhos mostram o contrário (KIM et al., 2003; UMEKITA; YOSHIDA, 2003; LEE; SUH; LI, 2006; TSOLI et al., 2007). Estudos mais recentes têm observado que não é a expressão de maspina mas sua localização subcelular que tem um papel importante na progressão tumoral (SOOD et al., 2002; MOHSIN et al., 2003; DIETMAIER et al., 2006). A localização citoplasmática de maspina tem sido associada a um prognóstico ruim, enquanto a localização nuclear a um prognóstico bom (MARIONI et al., 2005; LONARDO et al., 2006; MARIONI et al., 2006; MARIONI et al., 2008; MARIONI et al., 2009; MARIONI et al., 2010; MARIONI et al., 2011). Além disso, vários trabalhos têm demonstrado que a localização nuclear de maspina é essencial para o seu papel de supressor de tumor (GOULET et al., 2011; MACHOWSKA et al., 2014).

O mecanismo pelo qual maspina transloca para o núcleo e ainda desconhecido. Não existe evidência na literatura de uma sequência da proteína envolvida nesse transporte nem de ligantes que possam realizar essa função. Devido a que a localização subcelular de maspina está correlacionada à progressão tumoral é importante entender o mecanismo do tráfego núcleo-citoplasmático de maspina, o que poderia resultar em novos alvos terapêuticos para o tratamento do câncer. Assim, neste trabalho investigamos esse mecanismo pelo qual maspina transloca para o núcleo. Tivemos como hipótese que maspina tem um sinal de localização nuclear (NLS) clássico na sua

sequência e que, portanto, interage com proteínas dessa via clássica para ser internalizada no núcleo.

Abordaremos a seguir dois temas fundamentais para entender a pesquisa realizada: a maspina e o tráfego núcleo-citoplasmático. Ambas as áreas têm sido muito estudadas já que alterações destas podem resultar em doenças, como câncer.

1.1 Maspina

Maspina foi descrita pela primeira vez em células epiteliais mamárias humanas, quando foram identificadas proteínas presentes em células normais e ausentes em células tumorais (ZOU et al., 1994; GAO et al., 2004). Assim, foi descrita como uma proteína supressora de tumor. O nome de maspina vem do inglês *Mammary Serpin Protease Inhibitor*, já que foi inicialmente descrita no tecido mamário e pertence à família das serpinas ou inibidores de serinas protease (SHI; ZHANG; ZHANG, 2015). Por isso, maspina também é conhecida como Serpina B5. Inicialmente descrita em células mamárias, maspina é expressa em outros tecidos principalmente em células epiteliais, incluindo ovário, próstata, pâncreas, pulmão, colón e epiderme, entre outros. Além das células epiteliais, também é expressa em células endoteliais dos vasos sanguíneos (QIN; ZHANG, 2010), na endoderme de embriões (GAO et al., 2004) e em células estromais da córnea (BAILEY et al., 2006).

O gene da maspina humana está localizado na região 18q21.3 do cromossomo 18. Nessa mesma região estão localizadas outras serpinas como P18, P110, SCCA1, SCCA2, Headpina, PAI2 e Megsina (BARTUSKI et al., 1997; SILVERMAN et al., 1998; SCOTT et al., 1999; NAKASHIMA et al., 2000). O gene tem 28 Kb e está formado por 7 éxons e 6 íntrons. A proteína da maspina tem um tamanho de 42 kDa formada por uma sequência de 375 aminoácidos o que equivale a uma sequência codificante de DNA de 1.128 bp (BODENSTINE et al., 2012).

A maspina tem um papel importante no desenvolvimento já que a ausência desta é letal durante a embriogênese em camundongos *knockout* (GAO et al., 2004). Porém,

um estudo mais recente com camundongos *knockout* condicional para maspina gerados com outra estratégia, mostrou que maspina não tem um papel fundamental na embriogênese nem de supressor de tumor (TEOH et al., 2014). Contudo, esse estudo tem sido alvo de críticas por parte de outros pesquisadores. Uma das críticas é que a estratégia para criar os camundongos *knockout* foi inserindo um códon *stop* depois do éxon 4 de maspina, sendo possível gerar por splicing alternativo uma maspina sem esse éxon mas que ainda possua algumas funções biológicas (SHI; ZHANG; ZHANG, 2015). Além disso, os anticorpos usados nesse estudo detectam varias bandas inespecíficas no *Western Blot* e a presença de maspina em alguns tecidos de camundongos *knockout* (SHI; ZHANG; ZHANG, 2015). Também, os primers utilizados na PCR para detectar mRNA de maspina têm amplicons de diferentes tamanhos e quando foram utilizados em outro estudo amplificaram bandas inespecíficas (ZHANG et al., 2017). Assim, um estudo ainda mais recente procurou esclarecer a contradição entre ambos os trabalhos. Este último trabalho confirmou o papel essencial de maspina no desenvolvimento e seu papel como supressora de tumor mediante a geração de camundongos *knockout* gerados de maneira semelhante as duas formas previamente utilizadas (DZINIC et al., 2017). Com esse estudo confirmou-se o papel fundamental de maspina na embriogênese como descrito previamente por GAO et al. (2004), já que não foram obtidas crias *knockout* para maspina. Com uma estratégia experimental similar a utilizada por TEOH et al. (2014), evitaram essa letalidade na embriogênese gerando crias *knockout* de maspina viáveis. No entanto, ao contrário do mostrado por TEOH et al. (2014) esses camundongos *knockout* de maspina apresentam anormalidades, como uma redução no peso, adenocarcinoma pulmonar, hiperplasia mioepitelial da glândula mamária, hiperplasia nas células luminais da próstata, entre outras (DZINIC et al., 2017). Confirmando assim, o papel supressor de tumor de maspina mesmo ele parecendo ser contexto-dependente (DZINIC et al., 2017).

1.1.1 Estrutura molecular

A estrutura de maspina é diferente da maioria das serpinas em alguns aspectos devido a que não tem uma função inibitória de serina proteases (BODENSTINE et al., 2012). A maspina, como as outras serpinas, está formada por três folhas β (A, B e C) e

nove hélices α (hA-hI) (FITZPATRICK et al., 1996; AL-AYYOUBI; GETTINS; VOLZ, 2004; LAW et al., 2005) (Figura 1). Uma característica fundamental na estrutura das serpinas é o *Reactive Center Loop* (RCL). Dentro da estrutura de maspina o RCL se encontra exposto e é o sítio onde ocorre a interação com as proteases. Em serpinas inibitórias o RCL é clivado após a interação com a protease alvo. Depois da clivagem, a protease fica presa, sendo inserida entre duas folhas beta dentro da serpina. Esta reação é irreversível resultando na inativação da protease e aumentando a estabilidade da serpina. No entanto, maspina tem um RCL mais hidrofóbico e mais curto, com 4 aminoácidos a menos. Assim, esse RCL é mais rígido na estrutura, sendo incapaz de passar pelas mudanças conformacionais necessárias para a inibição de proteases (HOPKINS; WHISSTOCK, 1994; PEMBERTON et al., 1995). Até hoje, não foram identificadas proteases que sejam inibidas por maspina usando o mecanismo das serpinas, colocando a maspina dentro do grupo das serpinas não inibitórias da família das serpinas. Dessa forma, tem sido exploradas outras funções biológicas de maspina (BODENSTINE et al., 2012).

Figura 1. Estrutura tridimensional de Maspina. A maspina, semelhante as outras serpinas, está formada por três folhas β (A, B e C) e nove hélices α (hA-hI) e um *reactive center loop* (RCL ou RSL). Adaptado de NARAYAN; TWINING (2010)

1.1.2 Localização subcelular e funções biológicas de maspina

O RCL de maspina apesar de não ter uma função inibitória, é indispensável para a maspina realizar suas funções biológicas (BODENSTINE et al., 2012). A maspina tem uma diversidade de atividades biológicas (Figura 2). Na membrana inibe a angiogênese, inibe a migração e invasão celular por meio da regulação da atividade do ativador de plasminogênio tipo uroquinase (uPA) e aumenta a adesão celular por meio da interação com integrina $\beta 1$. No citoplasma regula a resposta ao estresse oxidativo por meio da interação com a Glutathione S-transferase (GST) e é pro-apoptótica na mitocôndria. No núcleo regula a expressão gênica interagindo com o fator regulatório do interferon 6 (IRF6) e com a deacetilase de histona 1 (HDAC1). Esta diversidade de funções biológicas se reflete nos inúmeros ligantes de maspina e na sua localização subcelular, como mostro a seguir.

Figura 2. Representação das funções de maspina e sua localização subcelular. No espaço extracelular e na membrana maspina inibe a angiogênese, a migração e adesão celular por meio das interações com o ativador de plasminogênio uroquinase (uPA) e integrina beta. No citoplasma regula a resposta ao estresse oxidativo por meio de sua interação com a Glutathione S-transferase GST e na mitocôndria é pró-apoptótica. No núcleo controla a expressão gênica interagindo com o fator regulatório de interferon 6 (IRF6) e a deacetilase de histonas 1 (HDAC1). Adaptado de: BODENSTINE et al. (2012)

1.1.2.1 Maspina extracelular

Uma das primeiras descobertas foi que maspina humana recombinante podia atuar na membrana celular do tumor e inibir a migração e invasão celular (SAGER et al., 1994; SHENG; PEMBERTON; SAGER, 1994; ZOU et al., 1994; SHENG et al., 1996; SEFTOR et al., 1998). Estas observações têm sido confirmadas tanto em células

tumorais (JIANG et al., 1997; SHENG et al., 1998; NGAMKITIDECHAKUL et al., 2001) como em células normais (NGAMKITIDECHAKUL et al., 2001). Um dos mecanismos da inibição da migração celular por maspina envolve a inibição de atividades de GTPases (SHI et al., 2007). Assim, um estudo mostrou que maspina recombinante é capaz de diminuir a atividade de Rac1 e CDC42 em células tumorais (SHI et al., 2007).

Maspina também é conhecida por aumentar a adesão celular, e portanto, explica-se porque células tumorais têm menos mobilidade depois do tratamento com maspina (SHI; ZHANG; ZHANG, 2015). Um dos primeiros trabalhos mostrou que a adição de maspina recombinante a células tumorais de mama aumenta a expressão das integrinas $\alpha 5\beta 1$ e $\alpha 3\beta 1$, o que resulta em um aumento na adesão celular a fibronectina (SEFTOR et al., 1998). Um estudo mais recente mostrou que maspina interage com integrina $\beta 1$ e dessa forma aumenta a adesão celular (CELLA et al., 2006). Maspina também se liga ao fator ativador de tecidos (tPA) e ao complexo do ativador de plasminogênio tipo uroquinase e seu receptor (uPA/uPAR) (SHENG et al., 1998; YIN et al., 2006). A ligação de maspina com uPA/uPAR induz a internalização do complexo na superfície da célula inibindo a sua atividade e portanto aumentando a adesão celular e diminuindo a invasão celular (YIN et al., 2006).

Maspina, assim como outras serpinas, inibe a angiogênese (DAWSON et al., 1999; KISKER et al., 2001; ZHENG et al., 2013). ZHANG et al. (2000) demonstraram pela primeira vez que maspina inibe angiogênese. Nesse estudo foi visto que maspina atua diretamente em células endoteliais cultivadas impedindo sua migração em direção ao fator de crescimento fibroblástico (bFGF) e ao fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), quimioatraentes importantes durante a angiogênese (ZHANG et al., 2000).

A maspina foi detectada em meio condicionado de várias linhagens indicando que é secretada. Maspina também foi encontrada em grandes quantidades em lágrimas de humanos e camundongos, sendo secretada por células da córnea estromais e epiteliais (NGAMKITIDECHAKUL et al., 2001; NGAMKITIDECHAKUL et al., 2003), e também no

sobrenadante em células normais de mama MCF10A e em células endoteliais HUVECs (QIN; ZHANG, 2010). Verificou-se que a secreção de maspina é dependente da diferenciação celular e das condições de cultivo, já que as passagens mais velhas parecem secretar mais maspina do que as mais novas (MIKUS et al., 1993; ENDSLEY et al., 2011). Contudo, maspina não tem um peptídeo sinal de secreção, e o mecanismo pelo qual é secretada é ainda desconhecido (SHI; ZHANG; ZHANG, 2015). Alguns estudos indicam que maspina é um dos componentes dos produtos secretados por exossomos depois da resposta ao estresse induzido por p53 e portanto pode ser que esteja sendo secretada por meio de exossomos (YU; HARRIS; LEVINE, 2006). Essa informação foi recentemente confirmada por estudo independente e sugere que maspina exossomal seja considerada no diagnóstico e tratamento do câncer (DEAN et al., 2017).

Finalmente, outros ligantes extracelulares de maspina foram identificados como catepsina D, uma protease que degrada matriz extracelular mas é inibida quando liga com maspina (KHALKHALI-ELLIS; HENDRIX, 2007). Igualmente, ensaio em duplo-híbrido mostrou que maspina é um ligante de colágeno I e III (BLACQUE; WORRALL, 2002), embora a estrutura da molécula não confirme essa interação, já que a sequência que interagiria com colágeno está críptica no interior da molécula (AL-AYYOUBI; GETTINS; VOLZ, 2004).

1.1.2.2 Maspina citoplasmática

Uma boa parte de maspina se localiza no citoplasma da célula (PEMBERTON et al., 1997). Uma das funções de maspina no citoplasma é induzir apoptose. O primeiro estudo mostrando que maspina intracelular induz apoptose na glândula mamária foi publicado por ZHANG et al. (1999). Nesse estudo animais transgênicos que superexpressavam maspina sob o controle do promotor de WAP, uma proteína do leite, observou-se altos níveis de apoptose e redução das estruturas alveolares. Outro estudo superexpressando maspina na linhagem tumoral de mama MDA-231 observou que aumenta a sensibilidade das células para apoptose (JIANG et al., 2002). Maspina

medeia apoptose através da ativação das vias de caspase, já que células tumorais expressando maspina exibem uma redução da proteína anti-apoptótica Bcl-2 e um aumento da proteína pro-apoptótica Bax (ZHANG; SHI; ZHANG, 2005). Em outro estudo observou-se que maspina é capaz de migrar para a membrana interna da mitocôndria, aumentando a permeabilidade mitocondrial e tornando a célula mais sensível a estímulos apoptóticos (LATHA et al., 2005). No entanto, como essa migração à mitocôndria é controlada ainda é desconhecido.

A maspina também interage com GST (YIN et al., 2005). O primeiro estudo que descreveu essa interação observou um incremento da atividade GST e uma diminuição dos níveis de espécies reativas de oxigênios (ROS) (YIN et al., 2005). Essa interação entre as duas proteínas aumenta quando a quantidade de ROS aumenta na célula (YIN et al., 2005) indicando que ambas as proteínas trabalham em conjunto. Estudos mais recentes mostraram que a maspina regula ROS a través de três cisteínas que se encontram expostas estruturalmente e que formam ácido sulfônico depois de expostas ao estresse oxidativo (MAHAJAN et al., 2013). Ao mesmo tempo, a remoção desses resíduos de cisteína em maspina aumenta a produção de ROS em células de carcinoma mamário de camundongo TM40D (MAHAJAN et al., 2013).

Maspina também se liga a IRF6 no citoplasma e impede a translocação deste ao núcleo e sua degradação pelo proteassomo (BAILEY et al., 2005; BAILEY et al., 2008). Como IRF6 é um fator de transcrição, maspina regula a expressão gênica mediada por IRF6 (BAILEY et al., 2008). Maspina também se liga à proteína *heat shock* 90 (Hsp90), uma proteína chaperona que ajuda no dobramento de proteínas (LOCKETT et al., 2006). Já que varias oncoproteínas e fatores anti-apoptóticos interagem com Hsp90, maspina pode estar regulando a progressão tumoral através da sua interação com Hsp90 (LOCKETT et al., 2006).

1.1.2.3 Maspina nuclear

No núcleo maspina interage com HDAC1 e inibe sua atividade (LI et al., 2006). Um estudo mostrou que maspina inibe genes regulados por HDAC1 como Bax, p21 e CK18 (LI et al., 2006; LOCKETT et al., 2006). A deacetilação de histonas promove a condensação da cromatina, que conseqüentemente impede o acesso de fatores de transcrição ao DNA. Essa interação coincide com o papel que HDAC1 tem no desenvolvimento e na progressão tumoral (SHI; ZHANG; ZHANG, 2015). Outro estudo mais recente confirmou que maspina é um inibidor de HDAC1 e que superexpressão de maspina resulta em mudanças na expressão de uma grande quantidade de proteínas provavelmente alterando a acetilação de vários fatores de transcrição (KAPLUN et al., 2012). Finalmente, um estudo identificou uma mutação pontual na sequência de maspina que aumenta a afinidade a HDAC1, aumentando a inibição da atividade desta e sua localização nuclear (DZINIC et al., 2013).

Outro estudo também mostrou que maspina se liga a cromatina e que a localização nuclear de maspina é necessária para ter atividade supressora de tumor (GOULET et al., 2011). Quando maspina foi expressa no núcleo de duas linhagens tumorais observou-se uma inibição de metástase. Entretanto, quando maspina foi excluída do núcleo fusionando-a a um sinal de exportação nuclear, os efeitos supressores de metástase desapareceram (GOULET et al., 2011; GOULET et al., 2012). Também, em outro estudo a transfecção de maspina fusionada a um NLS em linhagens tumorais mostrou uma diminuição da proliferação tumoral (MACHOWSKA et al., 2014). Além disso, foi confirmado que maspina está associada a cromatina e que se liga nas regiões dos promotores dos genes CSF1 e ERRA, genes que são críticos na progressão do câncer de mama (GOULET et al., 2012). Contudo, ainda não se sabe por que maspina se liga especificamente a esses promotores (SHI; ZHANG; ZHANG, 2015).

Maspina também interage no núcleo com o fator 2 ligante de GC (GCF2), um repressor transcricional envolvido na resposta ao estresse (BAILEY et al., 2006). Também o fator de transcrição TFIID foi identificado como um possível ligante de

maspina (YIN et al., 2005). Todos esses ligantes de maspina confirmam o papel de maspina na regulação da transcrição.

1.1.3 Regulação da expressão gênica de maspina

Maspina foi identificada inicialmente comparando células epiteliais normais de mama com células tumorais (ZOU et al., 1994). Para poder responder por que só as células normais expressavam maspina vários estudos investigaram como é regulada a sua expressão gênica. O primeiro estudo conseguiu identificar os elementos mais importantes para a transcrição de maspina em células epiteliais mamárias. Isto foi feito através do isolamento de um fragmento de DNA genômico que continha o promotor de maspina (ZHANG et al., 1997). Nesse estudo foi identificado que os sítios Ets e Ap1 no promotor de maspina encontravam-se ativos em células normais e inativos em células tumorais (ZHANG et al., 1997). Esse estudo demonstrou que a perda da expressão de maspina durante a progressão tumoral é devida em parte à ausência da ativação transcricional pelos sítios Ets e AP1 (ZHANG et al., 1997).

1.1.3.1 Regulação positiva

O fator Ets derivado da próstata (PDEF ou PSE) , um dos membros da família Ets de fatores de transcrição, é capaz de ligar ao sítio Ets do promotor de maspina e ativar a expressão gênica em células epiteliais de próstata (YAMADA et al., 2000). PDEF foi capaz também de ativar a expressão gênica de maspina em linhagens tumorais de mama (FELDMAN et al., 2003). Do mesmo modo, PDEF também ativa a expressão gênica do inibidor do ciclo celular p21 a través do sítio Ets (SCHAEFER et al., 2010). Curiosamente, tanto maspina como p21 são ativados por p53. Assim, confirmou-se que maspina tem um sítio de ligação a p53 e que é induzido por este (ZOU et al., 2000). Adicionalmente, maspina também pode ser ativado por TGF- β (WANG et al., 2007), PTEN (EITEL et al., 2009; ZHANG, 2009), ATF-2 (MAEKAWA et al., 2008) e p63 (KIM et al., 2004). As ativações, tanto por TGF- β como por PTEN, dependem de p53 (EITEL et al., 2009).

Existem ainda outros fatores que regulam a expressão gênica de maspina. O ácido- γ -linoleico induz a expressão de mRNA de maspina (JIANG et al., 1997). Além desse, a Mn-superóxido dismutase (MnSOD) e o óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) também têm efeito similar em células tumorais MCF7 (LI; COLBURN; OBERLEY, 1998; DUAN et al., 2003; KHALKHALI-ELLIS; HENDRIX, 2003). Por último, observou-se que o antagonista do receptor de estrógeno tamoxifen aumenta a expressão de maspina através da regulação do seu promotor (SHAO; RADZISZEWSKI; BARSKY, 2000; KHALKHALI-ELLIS et al., 2004; LIU et al., 2004).

1.1.3.2 Regulação negativa

Ao mesmo tempo em que foram identificados os sítios Ets e Ap1 como elementos positivos da regulação da expressão gênica de maspina, foi identificado o sítio HRE (*Hormone Response Element*) como elemento negativo (ZHANG; MAGIT; SAGER, 1997). O sítio HRE está localizado a -297 bp do sítio do início da transcrição de maspina (ZHANG; MAGIT; SAGER, 1997). O receptor de andrógeno se liga a HRE diminuindo a expressão de maspina em células epiteliais de próstata (ZHANG; MAGIT; SAGER, 1997).

Outro estudo mostrou que a quinase I κ B quinase α (IKK α) é um repressor de maspina, promovendo a metástase em câncer de próstata (LUO et al., 2007). Nesse estudo os resíduos de serina IKK α foram substituídos por alaninas em um camundongo transgênico que desenvolve tumor de próstata, dessa maneira impedindo a ativação dessa quinase. Assim, camundongos com a IKK α mutada desenvolvem tumores tardiamente, os tumores primários crescem mais devagar, a metástase é inibida e os animais vivem mais tempo quando comparados com os camundongos com IKK α selvagem (LUO et al., 2007). Ao comparar a expressão dos supressores de tumor em ambos os camundongos, a maspina foi o único identificado com uma diferença consistente. IKK α funciona como repressor de maspina quando IKK α é fosforilado por RANKL sendo translocado ao núcleo onde interage com o promotor de maspina e regula negativamente a sua expressão (LUO et al., 2007).

Outro regulador negativo de maspina ocorre através de modificações epigenéticas. Um estudo mostrou que maspina é metilada na região do promotor impedindo sua expressão gênica (FUTSCHER et al., 2002). Assim, foi descrito que em células que expressam maspina, o promotor não está metilado e as histonas se encontram acetiladas podendo então realizar a transcrição do gene. Por outro lado, em células que não expressam maspina, o promotor se encontra metilado e é ocupado por histonas hipoacetiladas, impedindo a transcrição do gene. Adicionalmente, ao inibir a metilação do DNA, a inibição da transcrição do gene de maspina é revertida (FUTSCHER et al., 2002).

A metilação do promotor de maspina está associada ao silenciamento da expressão de maspina em células tumorais de mama (DOMANN et al., 2000). A expressão de maspina é recuperada quando são tratadas com 5-aza-2'-deoxicitidina, um agente que causa a desmetilação do DNA (DOMANN et al., 2000; MAASS; BIALLEK; et al., 2002). Além disso, o tratamento de células tumorais de mama com 5-aza-2'-deoxicitidina junto com a transdução de p53 pode restaurar os níveis de maspina e inclusive elevá-los aos níveis de uma célula normal (OSHIRO et al., 2003). Esta reativação de maspina por p53 se deve ao fato de que este se liga ao seu sítio no promotor de maspina estimulando a acetilação de histonas e a acessibilidade nesse promotor (OSHIRO et al., 2003). Estes estudos mostram que a metilação de DNA e a acetilação de histonas são em parte responsáveis pelo silenciamento de maspina em células tumorais de mama (SHI; ZHANG; ZHANG, 2015).

1.1.4 Modificações pós-traducionais de maspina

Várias formas de fosforilação têm sido descritas em maspina (ODERO-MARAH et al., 2002; OLSEN et al., 2010; NARAYAN; MIRZA; TWINING, 2011; MERTINS et al., 2014; TSAI et al., 2015; HUANG et al., 2016). Um estudo mostrou a fosforilação de maspina endógena e maspina transfectada em células normais e tumorais de mama (ODERO-MARAH et al., 2002). Maspina recombinante é fosforilada pelo domínio

quinase TKD38 de EGFR em um sistema *in vitro* (ODERO-MARAH et al., 2002). A estrutura sugere que as cinco tirosinas de maspina que, apesar de não serem acessíveis a uma quinase devido à flexibilidade das regiões de maspina, poderiam permitir essa fosforilação (LAW et al., 2005). Assim foram achadas fosforilações em tirosina, porém esses resíduos se encontram fosforilados na maspina intracelular e não na secretada (NARAYAN; MIRZA; TWINING, 2011). Nosso grupo mostrou que os níveis de maspina aumentam no citoplasma quando células foram tratadas com um inibidor de tirosina fosfatase, sugerindo que a fosforilação de maspina e a localização subcelular estão correlacionados (TAMAZATO LONGHI; CELLA, 2012). Isso também foi confirmado quando células MCF10A carentes e tratadas com EGF apresentaram uma maior quantidade de maspina nuclear (TAMAZATO LONGHI et al., 2016). Além da fosforilação em tirosina, fosforilação em resíduos de serina e treonina foram identificados em células da córnea por meio de espectrometria de massas (NARAYAN; MIRZA; TWINING, 2011).

Além de fosforilação, maspina forma pontes de dissulfeto entre resíduos de cisteína quando é exposta ao estresse oxidativo em células MCF10A (NAWATA et al., 2011). Nessa condição maspina não consegue mais interagir com GST e, portanto, deve ter um papel na resposta da célula ao estresse oxidativo (BODENSTINE et al., 2012). Em células epiteliais de próstata a superexpressão da sintase de óxido nítrico (NOS) resulta na nitrosilação de maspina (LAM et al., 2010). No entanto, o significado biológico dessa alteração é desconhecido.

Finalmente, análises por espectrometria de massas identificaram acetilação e ubiquitinação em resíduos de lisina (LUNDBY et al., 2012; WEINERT et al., 2013; LUMPKIN et al., 2017). Essas foram análises do tipo *high throughput*, o significado biológico dessas modificações em maspina não foram abordados.

1.1.5 Maspina e câncer

Várias publicações indicam o papel de maspina como supressor de tumor e diminuindo a progressão tumoral, angiogênese, invasão e migração celular (SHI; ZHANG; ZHANG, 2015). Assim, alguns estudos pré-clínicos usando maspina tem sido desenvolvidos. Um desses estudos usou camundongos transgênicos que desenvolvem tumores de mama os quais foram tratados com complexos lipossomais contendo o DNA de maspina. Os tumores de camundongos tratados com maspina mostraram uma redução do tamanho do tumor primário e da metástase (SHI et al., 2002). Outro estudo realizou um tratamento com maspina recombinante para inibir a angiogênese tumoral em camundongos implantados com células de câncer de próstata (ZHANG et al., 2000).

Muitos dos trabalhos feitos para investigar os mecanismos celulares de maspina *in vivo* ou *in vitro* confirmaram o papel de Maspina como supressora de tumor (ZHANG et al., 2017). Porém vários estudos clínicos de maspina apresentaram resultados mais difíceis de interpretar, já que vários deles são contraditórios (BODENSTINE et al., 2012). Por exemplo, os primeiros estudos de maspina mostraram que era um supressor de tumor na glândula mamária (HOJO et al., 2001; SOPEL; KASPRZYK; BERDOWSKA, 2005; SHARMA et al., 2011) e que não está expressa em formas agressivas de câncer (MAASS et al., 2001). A expressão de maspina também foi correlacionada com um aumento da sobrevida e um melhor prognóstico (MACHTENS et al., 2000; MAASS; NAGASAKI; et al., 2002; STARK et al., 2010). No entanto, estudos associaram a expressão de maspina a tipos mais agressivos de carcinoma de mama (UMEKITA; YOSHIDA, 2003). Além disso, outros estudos associaram maspina com um prognóstico ruim e características malignas no câncer de mama (KIM et al., 2003; LEE; SUH; LI, 2006; TSOLI et al., 2007).

Esses conflitos entre expressão de maspina e progressão tumoral foram observados em outros tipos de câncer além do câncer de mama, como no câncer de tireoide (BOLTZE et al., 2003; BOLTZE et al., 2004; ITO, Y. et al., 2004), gástrico (SON et al., 2002; ITO, R. et al., 2004; WANG et al., 2004; ZHENG et al., 2004; KIM et al., 2005; TERASHIMA et al., 2005; HE et al., 2007; SONG et al., 2007; YU et al., 2007) e colorretal (SONG et al., 2002; ZHENG et al., 2007; FUNG et al., 2010; MARKL et al., 2010). Porém a maioria dos estudos experimentais e clínicos validou o papel de

maspina como supressora de tumor (BODENSTINE et al., 2012; ZHANG et al., 2017) (Figura 3). A maioria das discrepâncias entre dados clínicos e experimentais é provavelmente devido ao fato de que nos estudos clínicos maspina tem que ser examinada levando em consideração as diferenças do contexto tecidual e celular dos pacientes (BODENSTINE et al., 2012).

Figura 3. Publicações de maspina e câncer no período do dia 28 de janeiro de 1994 ao dia 24 de abril de 2017. A. Estudos correlativos de maspina em espécimes clínicos. B. Estudos biológicos e mecanísticos de maspina. C. Estudos pré-clínicos de maspina usando a linhagem celular MDA-MB-231. As barras em preto representam evidencia, em número de publicações, de maspina como supressora de tumor e em branco como um fator insignificante ou promotora de tumor. Adaptado de ZHANG et al. (2017)

Uma explicação para essa divergência entre a expressão de maspina e a progressão tumoral nos diversos estudos tem sido a localização subcelular de maspina nesses estudos (BODENSTINE et al., 2012). Evidências indicam que não é a expressão de maspina que está associada a progressão tumoral mas sim a localização subcelular desta. Nesses estudos foi observado que a localização nuclear é essencial para maspina ter um papel de supressora de tumor (GOULET et al., 2012);(GOULET et al., 2011; MACHOWSKA et al., 2014) . A maspina nuclear inibe o crescimento tumoral e a metástase em células de câncer de mama (GOULET et al., 2011). Também, foi visto que a presença de maspina no núcleo altera a expressão de genes envolvido na progressão tumoral (GOULET et al., 2011; GOULET et al., 2012). Dados clínicos também confirmaram que maspina nuclear é um indicador de um prognostico bom e um aumento da sobrevida (MARIONI et al., 2005; LONARDO et al., 2006; MARIONI et al., 2006; SOLOMON et al., 2006; BLANDAMURA et al., 2008; MARIONI et al., 2008; FREY

et al., 2009; MARIONI et al., 2009; MARIONI et al., 2010; MARIONI et al., 2011). Devido à importância da localização nuclear de maspina na progressão tumoral, esse trabalho investigou o mecanismo pelo qual maspina é translocada ao núcleo. Assim, segue-se uma introdução sobre o transporte núcleo-citoplasmático na célula.

1.2 O Transporte nuclear

As células eucariotas são compartimentalizadas, tendo toda a maquinaria para a transcrição de um gene dentro do núcleo e a maquinaria para a tradução no citoplasma. A membrana nuclear controla e regula esse transporte de moléculas entre os dois compartimentos através de múltiplos complexos grandes de proteínas conhecidos como complexos do poro nuclear (NPC). Os NPC são estruturas com um tamanho ao redor dos 125 MDa em vertebrados que atravessam tanto a membrana interna quanto a externa do núcleo, formando uma barreira para a passagem de moléculas (REICHEL et al., 1990). O NPC é formado por aproximadamente 30 proteínas conhecidas como Nucleoporinas ou Nups (CRONSHAW et al., 2002). Um dos três tipos de Nups localizado na parte mais interna do NPC é formado por repetições de motivos de fenilalanina-glicina (FG), que é o lugar onde interagem com os fatores do transporte nuclear (ONISCHENKO; WEIS, 2011; GROSSMAN; MEDALIA; ZWERGER, 2012). Moléculas com um tamanho menor de 40 kDa e até 9 nm de diâmetro conseguem passar a través do NPC na membrana nuclear por meio de difusão. Por outro lado, proteínas com um tamanho maior a 40 kDa e até 39 nm de diâmetro precisam de transporte ativo para poder ser importadas ao núcleo (PANTE; KANN, 2002). No entanto, hoje sabe-se que esse limite é muito mais flexível e variável (TIMNEY et al., 2016). O controle desse tráfego núcleo-citoplasmático é fundamental para a regulação da expressão gênica da célula.

1.2.1 A via clássica de importação e exportação nuclear

O transporte ativo de proteínas a través do NPC é facilitado por proteínas conhecidas como carioferinas (RADU; MOORE; BLOBEL, 1995). Aquelas carioferinas que importam moléculas ao núcleo são conhecidas como importinas (GORLICH et al., 1994) e as que exportam como exportinas (STADE et al., 1997). As importinas

reconhecem sequências de aminoácidos específicas conhecidas como sinais o sequências de localização nuclear (NLS) (CHOOK; BLOBEL, 2001). Por outro lado, as exportinas reconhecem sequências conhecidas como sinais ou sequências de exportação nuclear (NES) (KUTAY; GUTTINGER, 2005). Existem hoje em dia ao redor de 19 carioferinas humanas e 14 carioferinas em leveduras (CHOOK; SUEL, 2011).

A via que a maioria das proteínas usa para translocar para o núcleo é conhecida como a via clássica. Nessa via clássica o NLS é reconhecido pela importina α , que por sua vez funciona como um adaptador e é reconhecida pela importina β . O complexo proteína/importina α e β transloca para o núcleo a través da interação com as proteínas do NPC (STEWART, 2007). Dentro do núcleo importina β interage com Ran-GTP, essa interação libera importina α e a carga dentro do núcleo (GORLICH et al., 1996). O direcionamento das proteínas é regulado pela gradiente Ran-GTP/GDP, onde Ran-GTP é abundante no núcleo e Ran-GDP no citoplasma (GORLICH et al., 1996). Isso é alcançado pela presença do fator de troca de guanina de Ran (RCC1) no núcleo que transforma Ran-GDP em Ran-GTP e a proteína ativadora de GTPase de Ran (RanGAP) no citoplasma, que ativa a hidrólise de GTP e mantém Ran sob a forma Ran-GDP (BISCHOFF; PONSTINGL, 1991). No núcleo Ran-GTP permite a liberação da carga enquanto que no citoplasma Ran-GDP permite a interação do complexo de importinas com as moléculas a serem transportadas (GORLICH et al., 1996). Uma representação gráfica da via clássica de importação nuclear é mostrada na Figura 4.

Depois da carga ser liberada no núcleo as importinas são recicladas. Para tal, ambas as importinas se associam a Ran-GTP (MATSUURA; STEWART, 2004). No caso da importina α também se liga à proteína de susceptibilidade de apoptose celular (CAS) que também participa no transporte ao citoplasma (PUMROY et al., 2012). As proteínas a serem exportadas do núcleo se associam às exportinas, como a *Chromosome region maintenance 1* (Crm1) ou exportina 1, que formam um complexo com Ran-GTP e assim são transportadas ao citoplasma (FORNEROD et al., 1997). Já no citoplasma Ran-GTP é convertido a Ran-GDP pela GAP liberando as importinas e a

carga, e assim importina α pode interagir de novo com um NLS e recomeçar o ciclo (YARBROUGH et al., 2014) (Figura 4).

Figura 4. A via clássica de importação e exportação nuclear. Uma proteína com um sinal de localização nuclear (NLS) é reconhecida por importina α por sua vez é reconhecida por importina β . O complexo carga/importinas transloca para o núcleo onde Ran-GTP interage com Importina β , liberando a proteína. Para ser exportada do núcleo a proteína com um sinal de exportação nuclear (NES) se liga a exportina que por vez se liga com Ran-GTP, dessa maneira é transportada ao citoplasma onde RanGTP é transformado em RanGDP por hidrólise liberando a exportina e a proteína. Adaptado de PATEL; CHU (2011).

1.2.2 NLS

Os NLS clássicos estão formados por grupos de aminoácidos básicos lisinas (K) ou argininas (R) que interagem com importina α . O primeiro NLS clássico ou cNLS a ser identificado e o mais caracterizado é o NLS de do antígeno T do *simian virus 40* (SV40) (KALDERON et al., 1984). Esse NLS é formado pela sequência de aminoácidos PKKKRKV que promove a importação de proteínas citoplasmáticas ao núcleo (KALDERON et al., 1984). Depois foi encontrado um NLS mais comprido, de 16 aminoácidos, na proteína nucleoplasmina de *Xenopus laevis* um organismo modelo

para estudar transporte núcleo-citoplasmático (DINGWALL et al., 1988). A sequência de nucleoplasmina ao contrario do NLS de SV40 tem dois grupos de aminoácidos básicos separado por um *linker* de aminoácidos e por isso é conhecida como um NLS bipartido (KOSUGI et al., 2009). As sequências do NLS de SV40 e de nucleoplasmina foram designadas como os protótipos dos NLS monopartido e bipartido respectivamente.

KOSUGI et al. (2009) classificou os NLS clássicos (cNLS) em 6 tipos diferentes (Tabela 1). Os NLS da classe 1 são definidos como aqueles com uma sequência continua de 4 aminoácidos básicos (KOSUGI et al., 2009). Um exemplo de NLS da classe 1 é o NLS do antígeno T de SV40: PKKKRK. Por outro lado, os da classe 2 têm uma sequência que começa com Prolina (P) seguida por uma sequência de até 3 resíduos e depois seguida por um grupo de 4 aminoácidos dos quais 3 são básicos (KOSUGI et al., 2009) (Tabela 1). Um exemplo de NLS da classe 2 é o NLS de c-Myc PAAKRVKLD. O terceiro tipo são NLS monopartidos formados por um grupo de só 2 aminoácidos básicos (KOSUGI et al., 2009). Um exemplo é o NLS da RNA helicase nucleolar II humana: KRSFSKAF. O quarto tipo é formados por NLS com sequência de 3 aminoácidos básicos (KOSUGI et al., 2009). A última classe de NLS monopartidos, a classe 5, é parecida com a classe 4 mas é especifica para plantas (KOSUGI et al., 2009).

No caso dos NLS bipartidos KOSUGI et al. (2009) os classifica na classe 6. Os NLS bipartidos têm um primeiro grupo formado por só 2 aminoácidos básicos, separados por um *linker* de 10-13 aminoácidos e seguido por um segmento onde 3 dos últimos 5 aminoácidos são básicos (KOSUGI et al., 2009) (Tabela 1). No entanto, recentemente foram identificados NLS bipartidos com mais do que 13 aminoácidos no *linker* (KREBS; MUELLER-ROEBER; RUZICIC, 2010; LANGE et al., 2010). Um exemplo é o NLS da Ty1 integrase que tem 29 aminoácidos como *linker* (LANGE et al., 2010). Portanto, a sequência consenso de NLS bipartidos clássicos pode ser expandida (KREBS; MUELLER-ROEBER; RUZICIC, 2010; LANGE et al., 2010).

Além dos NLS clássicos que se ligam a importina α , estão os NLS não clássicos que se ligam diretamente a importinas β (Tabela 1). NLSs que são ricos em argininas

podem se ligar diretamente a importina $\beta 1$ (GU et al., 2011). Também existem os NLS conhecidos como PY-NLS que são reconhecidos por importina $\beta 2$ (KPNB2) ou transportina 1 (LEE et al., 2006). Esses NLSs foram chamados assim já que são formados por uma sequência de um aminoácido básico, que pode ser inclusive histidina, separado por 2 a 5 aminoácidos terminando com uma prolina (P) e tirosina (Y) (LEE et al., 2006) (Tabela 1). O primeiro PY-NLS a ser identificado foi a proteína hnRNP A1 (LEE et al., 2006). Há também sequências ricas em lisinas que podem ser reconhecidas por carioferina $\beta 3$ (KPNB3). Estas sequências geralmente possuem mais de 25 aminoácidos e são mais complexas. Por último, estão as proteínas que têm domínios ricos em serina ou arginina (SR), como a proteína SR ASF/F2 humana, que são translocadas ao núcleo por meio de transportina 3 (MAERTENS et al., 2014). A maioria das proteínas translocadas por transportina 3 está envolvida no metabolismo de mRNA (MAERTENS et al., 2014).

Tabela 1. Tipos de NLS e suas sequências de consenso. Adaptado de (KOSUGI et al., 2009; CHOOK; SUEL, 2011; MARFORI et al., 2011; WU, 2014)

Tipo de NLS	Sequência de consenso	Exemplo	NLS
Classe 1	KR(K/R)R, K(K/R)RK	SV40 TA	PKKKRK
Classe 2	(P/R)XXKR(^DE)(K/R)	c-Myc	PAAKRVKLD
Classe 3	KRX(W/F/Y)XXAF	Helicase nucleolar de RNA II humana	KRSFSKAF
Classe 4	(R/P)XXKR(K/R)(^DE)	Ligase de SUMO E3 PIASy	PRPKRRCPFQF
Classe 5	LGKR(K/R)(W/F/Y)	Proteína de reparo de cross-link de DNA SM1	LGKRRR
Classe 6	KRX10–12K(KR)(KR)b KRX10– 12K(KR)X(K/R)b	Nucleoplasmina	KRPAATKKAFQAKKK
Ricos em argininas	Não existe	Proteína Rex do vírus da Leucemia de células T tipo 1	MPKTRRRPRRSQRKRPT
PY-NLS	R/H/KX(2-5)PY	hnRNP A1 humana	RSSGPY
Ricos em lisinas	Não existe	Spo12p de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KKSTS NLKSSHTTS NLVKKTMF KR DLLKQDPKRKL
Ricos em arginina e serina	Não existe	Proteína SR ASF/F2 humana	Resíduos 198-248

(^DE): qualquer aminoácido com exceção de ácido aspártico ou ácido glutâmico. X: qualquer aminoácido

1.2.3 Importinas da via clássica: importinas alfa e beta

As importinas que medeiam a importação nuclear pertencem a família das β carioferinas (CHOOK; SUEL, 2011). As carioferinas β têm pouca homologia nas sequências, porém a sequência no N-terminal é altamente conservada já que é o sítio onde se liga a Ran-GTP (CHOOK; BLOBEL, 2001).

A estrutura de importina α mostrou que tem três regiões funcionais. No N-terminal esta a sequência que liga a importina β (IBB), dois sítios onde ligam ao NLS no meio, e a região C-terminal (CONTI et al., 1998) (Figura 5). Interessantemente, no domínio N-terminal de importina α existe uma sequência similar a um cNLS formado pela sequência de aminoácidos KRR (MOROIANU; BLOBEL; RADU, 1996a). Essa sequência compete com o cNLS de proteínas e portanto é conhecido como uma sequência autoinibitória (KOBÉ, 1999). Proteínas com cNLS preferem se ligar a complexos importina α/β mais do que a importina α livre (GOLDFARB et al., 2004). Quando o complexo transloca para o núcleo, a importina β interage com Ran-GTP desassociando-se de importina α . Dessa forma, o domínio IBB agora livre compete com o cNLS ajudando na liberação da proteína no núcleo (MOROIANU; BLOBEL; RADU, 1996b).

Figura 5. Estrutura de importina α . A importina α contém três regiões funcionais: um domínio de ligação a Importina β (IBB) no N-terminal, uma região central formada por repetições armadillo (ARM) que tem os sítios de ligação (menor e maior) ao NLS, e uma região C-terminal. Adaptado de WU (2014)

A importina α apresenta 10 repetições Armadillo (ARM), através da qual a importina α se liga ao NLS (CONTI et al., 1998). A importina α tem dois sítios de ligação ao NLS, um sítio maior formado pelas repetições ARM 2 a 4 e um sítio menor formado pelas repetições ARM 6 a 8 (CONTI et al., 1998). O sítio maior interage com NLS

monopartidos formados por mais de três aminoácidos básicos ou no grupo com mais de dois aminoácidos básicos no caso dos NLS bipartidos (Tabela 2). O sítio menor por outro lado, interage com o grupo menor dos NLS bipartidos e é único sítio de ligação em alguns NLS como os da classe 3 e 4 (CHOOK; BLOBEL, 2001; KOSUGI et al., 2009; XU; FARMER; CHOOK, 2010) (Tabela 2). Os aminoácidos essenciais para que o NLS se ligue ao sítio menor de importina α são conhecidos como P1' a P4' e os do sítio maior como P1 a P5 (MARFORI et al., 2011) (Tabela 2). No caso do sítio menor, em P1' e P2' sempre existe uma sequência KR no NLS para poder se ligar a importina α (CHANG et al., 2013). Já no sítio maior uma lisina (K) na posição P2 é crítica para se ligar a importina α , seguida por P3 e P5 que podem ser argininas (R) ou lisinas (K).

Tabela 2. Resíduos essenciais para ligação do NLS na importina α . Adaptado de MARFORI et al. (2011).

Source protein *	Minor cNLS-binding site P1' P2' P3' P4'	Linker	Major cNLS-binding site P1 P2 P3 P4 P5	Linker length (P1' - P1)	PDB ID **
SV40 TAg	P K K K R K V		P P K K K R K V		1EJL, 1BK6, 1Q1S, 1Q1T
α IBB		D E Q M L K K R N V S			1IAL, 1IQ1
AR		G A R K L K K L G			3BTR
PLSCR1		G K I S K H W			1Y2A
c-Myc	K R V K L		P A A K R V K L		1EE4
pepTM	K K R R E A		P F K K K R R E A		3L3Q
Nup50	M A K R V A E...				2C1M
Nup2p	A K R V A D...				1UN0, 2C1T
TPX2	K R K H...		...V K M I K L	42	3KND
Np1	A V K R P A	A T K K A G Q A K K K K L D		11	1EE5, 1EJY
Rb	K R S A	E G S N P P K P L K K L R		12	1PJM
N1N2	R K K R K T	E E E S P L K D K A K K S K		13	1PJN
PB2	K R K R D S	SILTDS Q T A T K R I R M A		13	2JDQ
CBP80	S R R R R H	S D E N D G G Q P H K R R K T S		13	3FEY, 3FEX

Todos os organismos têm um único gene que codifica para importina β . Entretanto, a importina ou carioferina α (KPNA) é formada por uma família de 7 isoformas (KPNA1-KPNA7) (MIYAMOTO; YAMADA; YONEDA, 2016). Esta se divide em três subfamílias (α 1, α 2, α 3) (GOLDFARB et al., 2004). A primeira subfamília (α 1) é formada pelas importinas KPNA1, KPNA5 e KPNA6. A subfamília α 2 inclui importina KPNA2 e a importina KPNA7 (HU et al., 2010; KELLEY et al., 2010). Por ultimo a subfamília α 3, inclui a importina KPNA3 e KPNA4. A maioria das importinas é expressa na maioria dos tecidos, com exceção de KPNA5 que é sua expressão parece estar

restrita a testículos. Apesar disso, é possível que os diferentes tipos de importina α apresentem padrões específicos em cada tecido (KAMEI et al., 1999; KOHLER et al., 2002; QUENSEL et al., 2004). Também, é possível que NLS se liguem especificamente a uma isoforma de importina α ou que possam se ligar a várias ou a todas (KOHLER et al., 1999). A nomenclatura dos diferentes importinas é complexa e, por isso criou-se um consenso de símbolos aprovados para cada uma delas (Tabela 3).

Tabela 3. Nomenclatura da família de importinas. Adaptado de: YATES et al. (2017)

Approved Symbol	Approved Name	Previous Symbols	Synonyms	Chromosome
IPO4	importin 4		Imp4, FLJ23338	14q12
IPO5	importin 5	KPNB3, RANBP5	IMB3, MGC2068, Pse1	13q32.2
IPO7	importin 7	RANBP7	Imp7	11p15.4
IPO8	importin 8	RANBP8	IMP8	12p11.21
IPO9	importin 9		Imp9, FLJ10402	1q32.1
IPO11	importin 11		RanBP11	5q12.1
IPO13	importin 13		IMP13, KIAA0724, RANBP13	1p34.1
KPNA1	karyopherin subunit alpha 1		SRP1, RCH2, NPI-1, IPOA5	3q21.1
KPNA2	karyopherin subunit alpha 2	RCH1	SRP1alpha, IPOA1, QIP2	17q24.2
KPNA3	karyopherin subunit alpha 3		SRP1gamma, SRP4, hSRP1, IPOA4	13q14.2
KPNA4	karyopherin subunit alpha 4		QIP1, SRP3, IPOA3, MGC12217, MGC26703	3q25.33
KPNA5	karyopherin subunit alpha 5		SRP6, IPOA6	6q22.1
KPNA6	karyopherin subunit alpha 6		IPOA7, KPNA7, MGC17918, FLJ11249	1p35.2
KPNA7	karyopherin subunit alpha 7		IPOA8	7q22.1
KPNB1	karyopherin subunit β 1		NTF97, IPOB, MGC2155, MGC2156, MGC2157, IMB1, Impnb, IPO1	17q21.32
TNPO1	transportin 1	KPNB2	MIP, TRN, IPO2, MIP1	5q13.2
TNPO2	transportin 2		IPO3, KPNB2B, FLJ12155, TRN2	19p13.13
TNPO3	transportin 3	LGMD1F	TRN-SR, MTR10A, TRN-SR2, IPO12	7q32.1

Além da importina β 1 ou KPNB1, existem outras importinas com estrutura e funções semelhantes a esta (STROM; WEIS, 2001; CHOOK; SUEL, 2011). Por exemplo, a Transportina1/KPNB2 que realiza o transporte nuclear de proteínas que possuem um PY-NLS (LEE et al., 2006). Além dessas carioferinas β foram descritas 11 importinas no ser humano que realizam o transporte nuclear de moléculas através da

interação com nucleoporinas (STROM; WEIS, 2001). A importina β 1/KPNB1 também foi chamada como importina 1 e a Transportina1/KPNB2 como importina 2 (Tabela 3 e Tabela 4). Assim, as próximas importinas parecidas a importina β receberam os nomes de importina 3 a 13 (YATES et al., 2017). Cada importina realiza o transporte nuclear de cargas específicas como é mostrado na Tabela 4 (STROM; WEIS, 2001; TRAN; BOLGER; WENTE, 2007; TWYFFELS; GUEYDAN; KRUYIS, 2014).

Tabela 4. Importinas semelhantes a importina β e sua carga. Adaptado de: (STROM; WEIS, 2001; TRAN; BOLGER; WENTE, 2007; TWYFFELS; GUEYDAN; KRUYIS, 2014)

Importina	Sinônimos	Carga
IPO1	KPNB1	Proteínas reconhecidas por importin α com cNLS
IPO2	TNPO1/KPNB2	Proteínas com PY-NLS
IPO3	TNPO2	Proteínas com PY-NLS ou semelhantes a um PY-NLS
IPO4		Histonas, proteína ribossomal S3a, proteína de transição 2
IPO5	KPNB3	Proteínas ricas em K, histonas, proteínas ribossomais,
IPO7		Proteínas ribossomais, Smad, ERK
IPO8		SRP19, Smad
IPO9		Histonas, proteínas ribossomais
IPO11		UbcM2, rpL12
IPO12	TNOP3/TRN-SR	Proteínas ricas em SR
IPO13		UBC9, Y14

1.2.4 Vias de importação nuclear não clássicas

Existem NLS não clássicos, que são independentes de importina α , como os já mencionados com sequências ricas em arginina (R), os PY-NLS e os ricos em lisina (K). Da mesma forma, existem outras proteínas que também utilizam vias de importação nuclear sem a necessidade de uma proteína adaptadora como importina α (ROTH et al., 2007; ROTH et al., 2011). Uma dessas proteínas é Snurportina 1. que funciona como proteína adaptadora e se liga a importina β , já que contem um domínio parecido

ao IBB. A Snuportina 1 realiza o transporte nuclear de ribonucleoproteínas do spliceossomo que contem UsnRNAs (UsnRNPS), onde o *cap* de m3G no RNA funciona como um NLS para se ligar a Snuportina 1 (FISCHER et al., 1993). Snuportina por sua vez se liga à importina β através do seu domínio parecido ao IBB (HUBER et al., 1998).

Existem proteínas que utilizam o citoesqueleto para facilitar a interação com importinas. O citoesqueleto, tanto de microtúbulos quanto de actina, ajuda no acúmulo e no transporte dessas proteínas para as proximidades do núcleo onde é reconhecido pelas importinas e translocam ao núcleo. Um exemplo desse transporte é o da proteína relacionada ao hormônio paratireoideano (PTHrP) que interage com os microtúbulos, deslocando-se a través deles até chegar próximo do núcleo (ROTH et al., 2007; ROTH et al., 2011). Vários vírus também se valem do citoesqueleto para chegar ao núcleo. Como a proteína viral semelhante à síndrome de Wiskott-Aldrich (WASP) no baculovirus *Autographa californica Multiple Nucleopolyhedrovirus* ou AcMNPV, que ativa a polimerização de actina por Arp2/3 e que foi identificada como a responsável de translocar AcMNPV através do NPC (GOLEY et al., 2006; OHKAWA; VOLKMAN; WELCH, 2010).

Outras proteínas não dependem de importinas e translocam ao núcleo interagindo diretamente com as nucleoporinas. Esse é o caso da Nup153 que interage diretamente com proteínas como a integrase do HIV-1 (WOODWARD et al., 2009), STAT1 (MARG et al., 2004) e ERK2 para importá-las ao núcleo (WHITEHURST et al., 2002). Outro exemplo de uma via independente de importinas é a mediada por Ran-GDP e repetições Ankyrin conhecida como RaDAR (RanGDP/AR) (LU et al., 2014). Por essa via é realizado o transporte nuclear de reguladores transcricionais como os que regulam NF κ B e p53 (LU et al., 2014).

Além das mencionadas, existem proteínas que utilizam calmodulina em um contexto cálcio dependente para serem transportadas ao núcleo (SWEITZER; HANOVER, 1996; HANOVER; LOVE; PRINZ, 2009). Outra via é a mediada pela família de lectinas que reconhecem porções de açúcares em proteínas glicosiladas e dessa forma realizam o transporte nuclear (DUVERGER; ROCHE; MONSIGNY, 1996;

RONDANINO et al., 2003; MONSIGNY et al., 2004). Finalmente, outras proteínas que translocam interagindo diretamente com nucleoporinas funcionam como carioferinas dando carona (*piggyback*) às proteínas que se ligam a estas e que carecem de um NLS, como no caso da proteína LEF1 e sua interação com β -catenina (HUBER et al., 1996; KIM; HAY, 2001; ASALLY; YONEDA, 2005). Isso é observado em plasmídeos que são reconhecidas por fatores de transcrição na região conhecida como *DNA nuclear targeting sequence* (DTS) (geralmente na região do promotor). Quando esses fatores de transcrição translocam ao núcleo via importinas, estes levam junto as moléculas de DNA (VACIK et al., 1999; WILSON et al., 1999; DEAN; STRONG; ZIMMER, 2005). Isso é utilizado em terapia gênica para aumentar a eficiência do transporte nuclear de plasmídeos. Um resumo de todas essas vias não convencionais de importação nuclear é mostrado na Figura 6.

Figura 6. Vias não convencionais de importação nuclear. 1. Via clássica de importação através de importinas α e β . 2. Via clássica de exportação nuclear por exportina 1. 3. Importação nuclear facilitada pelo citoesqueleto, que acumula as proteínas a serem transportadas perto do núcleo. 4. Proteínas podem ser importadas ao núcleo por calmodulina (laranja). 5. Proteínas também podem ser exportadas por calreticulina (laranja) em um contexto cálcio (azul) dependente. 6. Importação nuclear através de difusão. 7. Importação de β -C ligada a LEF-1. 8. Importação de Gly ligada a L. 9. Importação de TF ligada a DNA com DTS. 10. Via desconhecida.

7. Importação nuclear por “carona” com proteínas que carecem de um NLS mediada por proteínas que interagem diretamente com nucleoporinas ou são importadas pela via clássica. 8. Importação nuclear de proteínas glicosiladas (Gly) pelo reconhecimento de açúcares por meio da família das lectinas (L). 9. Importação nuclear de DNA por meio da interação da sequência de DNA (DTS) com fatores de transcrição (TF) que translocam pela via clássica. Adaptado de WAGSTAFF; JANS (2009)

1.2.5 Transporte núcleo-citoplasmático e regulação dos processos celulares

O controle do tráfego núcleo-citoplasmático tem o papel de controlar as moléculas que entram e saem do núcleo onde se encontra a maquinaria para realizar a transcrição de um gene. Além, desse papel na regulação da expressão gênica, a maquinaria desse tráfego também desempenha outras funções biológicas, por exemplo, KPNA2 está envolvida na regulação da proliferação celular promovida pelo estrógeno (TAN et al., 2014). A KPNA2 também está associada a metástase pela via c-Jun (TSAI et al., 2016). Também, outras importinas, como KPNB1 é requerida para a sinalização retrograda de axônios danificados (PERRY et al., 2012).

Não só as importinas têm outros papéis importantes na célula, Ran-GTPase além de controlar a direcionalidade no transporte do núcleo tem um papel importante na mitose, participando na montagem do fuso mitótico, na dinâmica da membrana nuclear e controlando as transições nas etapas do ciclo celular (CLARKE; ZHANG, 2008). O NPC é um importante regulador da expressão gênica devido a sua influencia na arquitetura do núcleo e ao controle do fluxo da informação genética das moléculas associadas à tradução de proteínas no citoplasma (STRAMBIO-DE-CASTILLIA; NIEPEL; ROUT, 2010). Foi observado que a maquinaria do transporte nuclear também é importante para a diferenciação celular, onde o um transporte nuclear alterado de fatores de transcrição importantes podem resultar em doenças (YASUHARA; OKA; YONEDA, 2009; KIMURA; IMAMOTO, 2014). De fato, devido à importância da localização espaço-temporal de supressores de tumor e proto-oncogenes, e o papel das carioferinas na mitose e a integridade cromossomal, uma alteração no sistema dos componentes do transporte núcleo-citoplasmático tem sido associada a doenças, incluindo câncer (CAGATAY; CHOOK, 2018). Esses dados demonstram a integração do sistema de controle do tráfego núcleo-citoplasmático com os processos celulares.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O principal objetivo deste trabalho é determinar o mecanismo do tráfego núcleo-citoplasmático de Maspina

2.2 Objetivos específicos

1. Determinar o sinal de localização nuclear de maspina
2. Investigar o mecanismo da translocação nuclear de maspina
3. Determinar o papel da fosforilação de maspina no tráfego núcleo-citoplasmático

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho não envolveu a manipulação direta de seres humanos ou animais, e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais e pela Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do ICB, Protocolo CEP-ICB Nº. 654/14

3.1 *Predição do NLS de Maspina*

Foi usado o software cNLS mapper (KOSUGI et al., 2009) para predizer um possível NLS na sequência de aminoácidos de maspina (UniProt identifier: P36952-1). Para a predição, foi usada a região inteira de maspina usando um *cut-off* do score de 6.0.

3.2 *Cultura de Células*

Foram utilizadas três linhagens de células neste trabalho, todas obtidas do *American Type Culture Collection* (ATCC).

3.2.1 Cultivo de células HeLa

Células HeLa foram cultivadas em DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium) (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% soro fetal bovino (Sigma-Aldrich) e 1X Penicilina-Estreptomicina. As células foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO₂.

3.2.2 Cultivo de células HEK293T

Células HEK293T foram cultivadas em DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (GIBCO) suplementado com 10% soro fetal bovino (GIBCO) e 1X Penicilina-Estreptomicina. As células foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO₂.

3.2.3 Cultivo de células MCF10A

Células MCF10A foram cultivadas em DMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagle's médium/Nutrient Mixture F-12) (GIBCO) suplementado com 5% soro de cavalo

(GIBCO), EGF 20ng/ml, Hidrocortisona 0.5mg/ml, Toxina Colérica 100ng/ml, Insulina 10ug/ml e 1X Penicilina-Estreptomicina. As células foram mantidas a em atmosfera úmida de 5% de CO₂.

3.3 *Plasmídeos e clonagem*

Foram feitas várias construções para poder estudar o transporte nuclear de maspina:

3.3.1 Clonagem de Maspina-GFP

Para estudar o possível NLS de maspina foi gerado o plasmídeo Maspina-GFP, a sequência do cDNA de maspina foi obtida do plasmídeo SERPINB5 (Origene, número de catalogo: RC224287) e inserido ao vetor pEGFP-N3. O cDNA de maspina foi obtido usando primers desenhados com os sítios de restrição da enzima XhoI e XmaI (New England Biolabs). As sequências dos primers Hmaspin-XhoI-Forward e Hmaspin-XmaI-Reverse usados foram, respectivamente: 5'- GAA CTC GAGGCC GCC GCG ATC GCC-3' e 5'-ATT ATT GTT CCC GGG GGA GAA CAG AAT TTG CCA AAG AA-3'. O produto de PCR digerido com XhoI e XmaI foi inserido ao vetor pEGFP-N3 também digerido com as mesmas enzimas de restrição e ligado usando T4 DNA ligase (Thermo Scientific). O produto da ligação foi transformado em bactérias DH10 β eletrocompetentes. Foi determinado quais das colônias obtidas tinham o inserto por meio de PCR de colônia usando os mesmos primers utilizados na clonagem e por meio da presença do inserto depois da digestão do plasmídeo das colônias com as enzimas de restrição XhoI e XmaI. A clonagem de maspina no vetor pEGFP-N3 foi confirmada por meio de sequenciamento.

3.3.2 Clonagem de MaspinFL-5GFPs

Para estudar o transporte regulado de maspina foi gerado o plasmídeo MaspinFL-5GFPs (FL – *full length*), a sequência do cDNA de maspina foi obtida do plasmídeo maspin-GFP previamente clonado. O cDNA de maspina foi obtido usando primers desenhados com os sítios de restrição da enzima NheI (New England Biolabs) em

ambos os extremos. As sequências dos primers Mas-NheI-F2 (forward) e Mas-Nhe-R-1 (reverse) usados foram, respectivamente: 5'-GAA CCG TCA GAT CCG CTA GCG CT-3' e 5'-CAC TAG CTA GCG GAG AAC AGA ATT TGC CAA AGA AAA T-3'. O produto de PCR digerido com NheI foi inserido ao vetor pEGFP-GFP5 também digerido com NheI e ligado usando T4 DNA ligase (New England Biolabs).

O produto da ligação foi transformado por meio de choque térmico em células competentes Subcloning Efficiency™ DH5α™ Competent Cells (Invitrogen) e as colônias foram testadas para confirmar a presença do inserto por meio de PCR com os primers usados na clonagem e por meio da digestão com a enzima XhoI (New England Biolabs). Aquelas colônias positivas para a presença do inserto foram confirmadas por sequenciamento.

3.3.3 Clonagem de 5GFPs-MaspinNLS

Para testar o possível NLS de maspina foi feita a construção de 5GFPs-MaspinNLS a sequência de DNA do possível NLS de maspina foram desenhados primers contendo os sítios de restrição da enzima BamHI (ThermoFisher Scientific) e a sequência do NLS. Os primers usados foram NLS/maspin-F (forward): 5'-GAT CCA AAC TAA TCA AGC GGC TCT ACG TAG ACA AAT CTC TGA ATC TTT CTA CAG AGT TCA TCA GCT CTA CGA AGA GAC CCT ATG CAG-3' e NLS/maspin-R (reverse): 5'-GAT CCT GCA TAG GGT CTC TTC GTA GAG CTG ATG AAC TCT GTA GAA AGA TTC AGA GAT TTG TCT ACG TAG AGC CGC TTG ATT AGT TTG-3'. Os primers foram anelados e ligados ao vetor pEGFP-GFP5 (cortesia do Dr. Gergely Lukacs, McGill University) previamente digerido com BamHI usando T4 DNA ligase (New England Biolabs).

O produto da ligação foi transformado por meio de choque térmico em células competentes Subcloning Efficiency™ DH5α™ Competent Cells (Invitrogen). A presença do inserto nas colônias obtidas foi confirmada por sequenciamento.

3.3.4 Outras construções

Foram utilizadas várias construções já descritas na literatura para estudar o transporte nuclear de maspina. Essas construções foram gentilmente cedidas por alguns colegas:

3.3.4.1 Plasmídeo 5GFPs-NLS1

A construção 5GFPs-NLS1 contendo o NLS da proteína NP do vírus da Influenza A foi uma cortesia da Dra. Nelly Panté, The University of British Columbia (WU et al., 2017).

3.3.4.2 Plasmídeo de Ran-GTPase e mutantes

Para estudar se Ran-GTPase tem um papel no transporte nuclear do possível NLS de maspina foi utilizada a construção pcDNA-RanWT-mRFP1-polyA que foi um presente de Yi-Zhang (Addgene plasmid#59750). Também foram utilizadas as construções dos mutantes de Ran-GTPase: pTK21 (RanT24N) foi um presente de Ian Cheeseman (Addgene plasmid# 37396) e o plasmídeo pmCherry-C1-RanQ69L foi um presente de Jay Brenman (Addgene plasmid# 30309).

3.4 Mutações sítio dirigidas

Para estudar o papel de certos resíduos no transporte nuclear de maspina foram realizadas várias mutações sítio-dirigidas. Todas as mutações foram feitas seguindo o protocolo descrito por LIU; NAISMITH (2008):

3.4.1 Deleção do NLS

Para testar se o NLS predito tem alguma função na localização nuclear de maspina foi feita uma deleção da sequência completa do possível NLS de maspina, do resíduo 87 ao 114. Foram utilizados os primers Hmaspin Δ 87-114 Fwd: 5' TAC TCA CTG GAA TTG GAA ACT GTT GAC TTC AAA GAT AAA TTG G 3' e Hmaspin Δ 87-114 Rvs: 5' TTC CAA TTC CAG TGA GTA AAA GGA ACT AAG TTT GTT TAC ATCC 3'.

3.4.2 Mutações sítio dirigidas dos resíduos de Lisina e Arginina do possível NLS:

Foram mutadas as lisinas 87, 90, 109, 114 e as argininas 91 e 110 do plasmídeo maspina-GFP foram substituídas por alanina e glutamina, respectivamente. Para tal, foram desenhados os seguintes primers (Tabela 5):

Tabela 5. Primers utilizados para as mutações sítio-dirigidas das lisinas e argininas do possível NLS de maspina

Aminoácido	Primer	Sequência do primer
Lisina 87	F-K87A	5'-AGTTCCTTTTACTCACTGGCCCTAATCAAGCGG-3'
	R-K87A	5'-CAGTGAGTAAAAGGAACTAAGTTTGTTTAC-3'
Lisina 90	F-K90A	5'-TACTCACTGAACTAATCGCACGGCTCTACGTA-3'
	R-K90A	5'-GATTAGTTTCAGTGAGTAAAAGGAACTAAG-3'
Lisina 109	F-K109A	5'-AGAGTTCATCAGCTCTACGGCAAGACCGTATGC-3'
	R-K109A	5'-CGTAGAGCTGATGAACTCTGTAGAAAGATT-3'
Lisina 114	F-K114A	5'-ACGAAGAGACCGTATGCAGCAGAATTGGAACT-3'
	R-K114A	5'-TGCATACGGTCTCTTCGTAGAGCTGATGAA-3'
Arginina 91	F-R91Q	5'-CTCACTGAACTAATCAAGCAACTCTACGTAGA-3'
	R-R91Q	5'-GCTTGATTAGTTTCAGTGAGTAAAAGGAAC-3'
Arginina 110	F-R110Q	5'-AGTTCATCAGCTCTACGAAGCAACCGTATGCAA-3'
	R-R110Q	5'-CTTCGTAGAGCTGATGAACTCTGTAGAAAG-3'

3.4.3 Mutao stio dirigida dos resduos de Serina:

Para substituir as serinas 135 e 240 por alanina no plasmdeo maspina-GFP foram desenhados os seguintes primers: S135A-Fwd: TCA ACA ACG CAA TTA AGG ACC TCA CAG ATG GCC AC; S135A-Rvs: CTT AAT TGC GTT GTT GAT CTG ACC TTT CGT TTC TTC; S240A-Fwd: ATG AGG CGA CAG GAT TGG AGA AGA TTG AAA AAC AAC; e S240A-Rvs: CCT GTC GCC TCA TCC TCC ACA TCC TTG GGT AGT AG.

3.5 Transfeco e Co-transfeco de plasmdeos

Foram transfectadas trs linhagens celulares diferentes para estudar o transporte nuclear de maspina. Para cada linhagem foi utilizado um reagente em especfico e foi seguido um protocolo diferente.

3.5.1 Transfecção de células HeLa com Lipofectamine 2000

Células HeLa foram cultivadas em lamínulas em meio DMEM com 10% de Soro Fetal Bovino sem antibióticos em placas de 24 poços. Os plasmídeos foram transfectados usando 1,5ul de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) e 500 ng de plasmídeo seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Para a co-transfecção, foram usados 250 ng de DNA de cada plasmídeo.

3.5.2 Transfecção de células HEK293T com PEI

Células foram cultivadas em lamínulas em meio DMEM com 10% de Soro Fetal Bovino com antibióticos em uma placa de 6 poços. Depois de atingirem uma confluência de 70-80%, foram transfectadas diluindo 3 µg do plasmídeo em 200µl de DMEM puro com 9 mg de PEI (Polyethylenimine) 25kD lineal (Polysciences, cat#23966-2). Os reagentes foram incubados por 15 min a temperatura ambiente antes de serem adicionados às células. No caso de placas de 24 poços foram utilizados 2 µg do plasmídeo em 100 µl de DMEM puro com 3,3 mg de PEI.

3.5.3 Transfecção de células HeLa e MCF10A com Eugene HD

Células HeLa ou MCF10A foram cultivadas em lamínulas com meio sem antibióticos em placas de 24 poços. Os plasmídeos foram transfectados usando 500 ng de DNA do plasmídeo e 1,5 µl de FuGENE HD reagent (Promega) seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. No caso de placas de 60 mm foram utilizados 6.5 µg de DNA do plasmídeo e 19,5 µl de FuGENE HD reagente (Promega).

3.5.4 Visualização das células transfectadas

Após 24h da transfecção, as células cultivadas em lamínulas foram fixadas com PFA3% diluído em PBS pH 7,4 por 10 min e lavadas com PBS por 5 min três vezes. As lamínulas foram montadas em lâminas usando o meio de montagem ProLong Diamond Antifade com ou sem DAPI (Molecular Probes). Quando foi utilizado meio de montagem sem DAPI, as lamínulas foram incubadas com Hoechst (1:5000) por 10 min e lavadas

por 10 min com PBS-Tween 0,1% antes de serem montadas. As células foram visualizadas no microscópio de fluorescência confocal Olympus Fluoview FV1000 confocal laser scanning microscope na University of British Columbia ou no Zeiss LSM 780-NLO no CEFAP do Instituto de Ciências Biomédicas na Universidade de São Paulo ou no microscópio de fluorescência DMI8-Leica no Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

3.6 Quantificação da importação nuclear

Para as células transfectadas com as mutações do plasmídeo maspina-GFP foi realizada uma contagem de quantas células apresentam uma maior localização nuclear de maspina em relação ao citoplasma. Foi usado o teste de Fisher's Exact ($p < 0.05$) para determinar se existe diferença significativa no número de células que apresentam uma menor quantidade de maspina no núcleo.

Para as células transfectadas com os plasmídeos com 5GFPs a importação nuclear foi quantificada segundo o descrito por WU; SUN; PANTE (2007). Brevemente, a intensidade da fluorescência foi medida em áreas definidas (20 x 20 pixels) dentro do núcleo (Fn) e no citoplasma (Fc) usando ImageJ (National Institute of Health), assim como intensidade média do fundo ou *background* (MB) foi medida também. A razão da intensidade da fluorescência do núcleo pela do citoplasma foi calculada usando a equação: $Fn/Fc = (Fn-MB)/(Fc-MB)$. Foram obtidos dados de pelo menos 50 células por experimento. Foi feito um teste de distribuição normal para cada conjunto de dados usando o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. No caso de ter uma distribuição normal, foi realizada uma ANOVA de uma via para comparar as médias entre os grupos. No caso de uma distribuição não normal, foi realizado um teste de Kruskal-Wallis. Para comparar todos os grupos foi feito um teste post-hoc de Dunns. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando GraphPad Prism e um valor $p < 0,05$ foi considerado significativo. Todos os dados foram representados como a média $\pm$ o erro padrão da média (*standard error of the mean* ou S.E.M).

3.7 Ensaio de Importação nuclear em células permeabilizadas com digitonina

Células HeLa cultivadas em lamínulas foram permeabilizadas com digitonina (20 µg/ml) por 3 min a temperatura ambiente. Depois foram lavadas 3 vezes com tampão de importação (HEPES pH 7,4 20 mM, acetato de potássio 110 mM, EGTA 1mM, acetato de sódio 5mM, acetato de magnésio 2mM, DTT 2mM, 10 µg/ml inibidores de protease) e incubadas durante 30 min a 37°C com 2 µg de maspina recombinante (Peprotech), BSA fusionado ao NLS de SV40 (BSA-NLS) e BSA conjugados ao fluoróforo Cy3. BSA-NLS e BSA foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente. A conjugação das proteínas com Cy3 foi feita usando o Cy3 bis-Reactive dye pack (GE Healthcare Amersham). As diferentes proteínas conjugadas com Cy3 foram incubadas na presença ou não de solução de um tampão regenerativo de energia (0,4mM ATP, 0,45mM GTP, 4,5mM fosfocreatina, 18U/ml de fosfocreatinaquinase, 1,6 mg/ml BSA) e de extrato de proteínas do citosol (Rabbit Reticulocyte Lysate tratado com Nuclease, Promega). Em seguida foram lavadas com tampão de importação, fixadas com paraformaldeído (PFA) 3% por 10 min e montadas usando meio de montagem com DAPI ProLong Diamond Antifade (Molecular Probes). As lâminas foram visualizadas ao microscópio de fluorescência confocal Olympus Fluoview FV1000 confocal laser scanning microscope na University of British Columbia

3.8 Microinjeção de *Xenopus laevis* com Maspina-Ouro

Ovócitos de *X. laevis* foram obtidos e microinjetados com maspina recombinante (Peprotech), BSA e BSA-NLS conjugados com ouro coloidal. BSA e BSA-NLS foram utilizados como controles, respectivamente. Após 1h ou 2h da microinjeção citoplasmática os ovócitos foram fixados com glutaraldeído 2% como descrito por COHEN; AU; PANTE (2009); AU; COHEN; PANTE (2010). Os ovócitos foram desidratados e embebidos em Epon e foram feitos cortes para visualização ao microscópio eletrônico de transmissão FEI Tecnai G2 Spirit na University of British Columbia.

3.9 Tratamento de células MCF10A com Importazole

Para determinar se maspina transloca para o núcleo pela via clássica, células MCF10A foram tratadas com Importazole um inibidor KPNB1 (SODERHOLM et al., 2011). Para tal, células foram cultivadas em lamínulas tratadas com Poli-D-Lisina. Em seguida, as células foram carenciadas por 16h e tratadas com Importazole (50 μ M) ou DMSO (0,4%) por 6h. Como controle positivo da inibição do transporte nuclear por importazole foi utilizado p65, uma subunidade de NF κ B que tem um NLS clássico (BLANK; KOURILSKY; ISRAEL, 1991). Para induzir a translocação de p65 após o tratamento com Importazole, as células foram tratadas com TNF α (10ng/ml) por 2h.

3.10 *Imunofluorescência de maspina e p65 em células MCF10A:*

Células MCF10A cultivadas em lamínulas foram fixadas com paraformaldeído 2% por 20 min. Em seguida, as células foram permeabilizadas com Triton X-100 0,5% em PBS por 10 min. Após a permeabilização as células foram bloqueadas com PBS-soro de cabra 10% durante 1h e incubadas com o anticorpo primário (1:100) *overnight*. No caso de maspina foi utilizado o anticorpo produzido em coelho anti-SerpinB5 (Sigma HPA019132). No caso do p65 foi utilizado o anticorpo produzido em coelho anti-NF κ B p65 (Cell Signaling, C2284). No dia seguinte, as lamínulas foram lavadas com PBS-Tween 20 (PBST) 0,1% 3 vezes por 10 min e incubadas com o anticorpo secundário (1:300) produzido em cabra anti-coelho Alexa Fluor®488 (Invitrogen). Em seguida as lamínulas foram lavadas com PBS-Tween 20 0,1% 3 vezes por 10 min e os núcleos foram corados com Hoechst (1:5000) durante 10 min. Por fim, as lamínulas foram lavadas por 10 min com PBS-Tween 0,1%, montadas e observadas no microscópio de fluorescência.

3.11 *Co-Imunoprecipitação*

Para identificar os possíveis mediadores do transporte nuclear de maspina foram feitas co-imunoprecipitações usando diferentes tipos de células e imunoprecipitando diferentes proteínas.

3.11.1 Extração de proteínas para co-imunoprecipitação

As células foram tratadas com 40 μ M of Importazole (Sigma-Aldrich) por 4h como foi descrito em KUBLUN et al. (2014). O Importazole rompe a interação entre KPNB1 e Ran-GTPase, estabilizando as interações transientes entre KPNA2 e as proteínas. Depois do tratamento, foram preparados extratos de proteína usando o tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 5%, glicerol, 1% NP-40) com inibidores de protease. as células foram lavadas duas vezes com PBS gelado e depois 600 μ l do tampão de lise foi adicionado às células cultivadas em placas de 60 mm. As células foram coletadas, incubadas a 4°C sob agitação por 30 min e centrifugadas a 10.000 g a 4°C por 10 min. O sobrenadante foi recuperado, aliquoteado e mantido a -20°C.

3.11.2 Co-Immunoprecipitação de KPNA2 com anti-GFP

Células HeLa foram transfectadas com os plasmídeos 5GFPs-MaspinNLS, MaspinFL-5GFPs, 5GFPs-NLS1 e 5GFPs. O plasmídeo 5GFPs-NLS1 foi usado como controle positivo da Co-IP, já que foi demonstrado que este NLS da proteína NP do vírus da Influenza A interage com KPNA2 (WANG; PALESE; O'NEILL, 1997; SASAKI et al., 2013). A Co-IP foi realizada utilizando o kit μ MACs anti-GFP starting Kit (Miltenyi Biotec) de acordo com as instruções do fabricante. 50ul de Microbeads magnéticos conjugados a anti-GFP foram adicionados a 600ul de extrato proteico das células transfectadas e incubados por 30 min em gelo. Em seguida, o material foi aplicado nas μ colunas (Miltenyi Biotec), nas quais os microbeads ficaram retidos. O material foi lavado 4 vezes com 200 μ l de tampão de lise e uma vez com tampão de lavagem 2 (10 mM Tris-HCl pH 7.5). Em seguida, foi adicionado às colunas o tampão de eluição (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 50 mM DTT, 1%SDS, 1 mM EDTA, 0.005% azul de bromofenol, 10% glicerol) pré-aquecido a 95°C para coletar o eluato. O eluato foi analisado por *Western Blot* utilizando o anticorpo anti-KPNA2 (Abcam, ab70609) diluído em BSA 2% (1:1000) e o anticorpo anti-GFP (Thermo Scientific, MA5-15256) diluído em PBST-5% Leite desnatado.

3.11.3 Co-Immunoprecipitação de GFP com KPNA2

Células HeLa foram transfectadas com os plasmídeos 5GFPs-MaspinNLS, MaspinFL-5GFPs, 5GFPs-NLS1 e 5GFPs. Foram incubados 600 μ l do extrato com 2 μ g

de anti-KPNA2 (Santa Cruz, sc-55538) a 4°C com agitação *overnight*. No dia seguinte, os extratos foram imunoprecipitados usando *beads* de *sepharose* com Proteína G (GE Healthcare) e incubando-se por 1h a 4°C com agitação. Os *beads* de *sepharose* foram lavados 4 vezes com tampão de lise e 1 vez com tampão de lavagem 2 (10 mM Tris-HCl pH 7.5). Os *beads* foram eluídos com 30 µl de tampão de amostra redutor (62,5 mM Tris HCL pH 6,8 2% SDS, 10% glicerol, 5% 2-mercaptoetanol, azul de bromofenol) e incubou-se a 95°C por 5 min. O eluato foi analisado por *Western Blot* utilizando o anticorpo anti-KPNA2 (Abcam, ab70609) diluído em BSA 2% (1:1000) e o anticorpo anti-maspina (Sigma, HPA019132) diluído em PBST-5% Leite desnatado.

3.11.4 Co-Imunoprecipitação de KPNA2 com anti-maspina

Células MCF10A foram carenciadas por 24h e tratadas com EGF (20ng/ml) por 1h, já que foi descrito previamente que EGF estimula a localização nuclear de maspina nessas células (TAMAZATO LONGHI et al., 2016). Foram incubados 500 µg do extrato com 2 µg de anti-maspina (Millipore, MABC603) a 4°C com agitação *overnight*. No dia seguinte, os extratos foram imunoprecipitados usando *beads* de *sepharose* com Proteína G (GE Healthcare) e incubando-se por 1h a 4°C com agitação. Os *beads* de *sepharose* foram lavados 4 vezes com tampão de lise utilizado e 1 vez com tampão de lavagem 2 (10 mM Tris-HCl pH 7.5). Os *beads* foram eluídos com 30 µl de tampão de amostra redutor (62,5 mM Tris HCL pH 6,8 2% SDS, 10% glicerol, 5% 2-mercaptoetanol, azul de bromofenol) e incubou-se a 95°C por 5 min. O eluato foi analisado por *Western Blot* utilizando o anticorpo anti-KPNA2 (Abcam, ab84440) diluído em BSA 5% (1:1000) e o anticorpo anti-GFP (Thermo Scientific, MA5-15256) diluído em PBST-5% Leite desnatado.

3.11.5 Identificação por Espectrometria de Massas de proteínas que co-imunoprecipitam com maspina em células tratadas com Importazole.

Células MCF10A foram cultivadas em placas de 100mm e tratadas com Importazole 50 µM durante 6h. As células foram lavadas 2 vezes com PBS gelado e coletadas em buffer H (50 mM β Glicerofosfato pH 7,3, 1,5 mM EGTA, 1mM EDTA, 1mM DTT, 0,1

mM Na₃VO₄, 10 µg/ml aprotinina, 10 µg/ml leupeptina). Em seguida, as células foram sonicadas a uma amplitude de 20% por 7s, duas vezes com um intervalo de 20s. Depois, foram centrifugadas a 15.000 g por 15 min e o sobrenadante foi recuperado. Foram incubados 250 µg de extrato proteico das células com 2µg de anticorpo anti-maspina *overnight* a 4°C. Em seguida, o complexo anticorpo-antígeno foi incubado com *beads* de *sepharose*-proteína G por 1h a 4°C. Os *beads* foram lavados três vezes com buffer H sem DTT e uma vez com Tris-HCl 50 mM pH 8,0. Em seguida, os *beads* foram eluídos 3 vezes com 50 µl de glicina 0,2M pH 2,6 para análise no espectrômetro de massas. Esse trabalho foi feito em colaboração com a Dra. Julia Pinheiro Chagas da Cunha, do Laboratório Especial de Ciclo Celular-LECC/cetics do Instituto Butantã. Após termos as proteínas identificadas, foi feita uma análise de enriquecimento as proteínas identificadas por espectrometria de massas utilizando o software online DAVID (HUANG DA; SHERMAN; LEMPICKI, 2009b; a).

3.12 Western Blot

Os eluatos das Co-Imunoprecipitações e os extratos de proteínas foram separados em um SDS-PAGE a 10%. As proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de PVDF (Millipore) usando o tampão de transferência (25 mM Tris, 150 mM glicina e 20% metanol) e o sistema de transferência Trans-Blot SD Semi-dry Transfer Cell (Biorad). Em seguida, a membrana foi bloqueada com leite desnatado 5% diluído em PBS-Tween 20 0,1% por 1h. Após o bloqueio, a membrana foi incubada *overnight* com o anticorpo primário. Depois a membrana foi lavada com PBST 3 vezes por 10 min e incubada com anticorpo secundário conjugado a peroxidase por 1h diluído no tampão de bloqueio. Em seguida, a membrana foi lavada de novo com PBST 3 vezes por 10 min. A membrana foi incubada com Clarity Western ECL Blotting Substrate (BioRad), exposta a um filme de raio X (Ortho CP-G Plus – AGFA).

3.13 Alinhamento múltiplo da sequência do NLS de maspina em outros organismos:

Para determinar se o NLS de maspina se encontra conservado em outros organismos, foi feita uma busca dessa sequência nos bancos de dados da Uniprot ((CHEN; HUANG; WU, 2017)) usando BLAST no site da ExpASy (GASTEIGER et al.,

2003). A sequência de maspina humana foi alinhada com a sequência de 38 mamíferos (Tabela 6) pelo método MUSCLE na plataforma online (EDGAR, 2004). Para uma melhor visualização dos aminoácidos conservados foram utilizados os programas BoxShade (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html) e foi criada uma sequência logo usando WebLogo (CROOKS et al., 2004).

Tabela 6. Organismos utilizados no alinhamento múltiplo.

Uniprot Accesion Nº	Organismo
G1LIJ9	<i>Ailuropoda melanoleuca</i>
L8HPG3	<i>Bos mutus</i>
A4FV69	<i>Bos taurus</i>
B1MTB7	<i>Callicebus moloch</i>
U3D1I0	<i>Callithrix jacchus</i>
S9X5F1	<i>Camelus ferus</i>
E2REC1	<i>Canis familiaris</i>
H0VPS2	<i>Cavia porcellus</i>
A0A0D9S023	<i>Chlorocebus sabaeus</i>
G3HD42	<i>Cricetulus griseus</i>
F6YDZ0	<i>Equus caballus</i>
M3W9H2	<i>Felis catus</i>
A0A091D0H5	<i>Fukomys damarensis</i>
E1BTE2	<i>Gallus gallus</i>
G3RPE0	<i>Gorilla gorilla</i>
G5BH00	<i>Heterocephalus glaber</i>
P36952	<i>Homo sapiens</i>
I3M9Q3	<i>Ictidomys tridecemlineatus</i>
G3T7I5	<i>Loxodonta africana</i>
G7PWX3	<i>Macaca fascicularis</i>
F7CTZ9	<i>Macaca mulatta</i>
F7ASZ9	<i>Macaca mulatta</i>
F7DMP5	<i>Monodelphis domestica</i>
P70124	<i>Mus musculus</i>
G9KN55	<i>Mustela putorius</i>
L5MB33	<i>Myotis davidii</i>
U6CUZ1	<i>Neovison vison</i>
G1RBT6	<i>Nomascus leucogenys</i>
F6XZ96	<i>Ornithorhynchus anatinus</i>
G1TCD0	<i>Oryctolagus cuniculus</i>
H0X9B7	<i>Otolemur garnettii</i>
W5P8T8	<i>Ovis aries</i>
H2R6Q3	<i>Pan troglodytes</i>

A0A096N0K8	<i>Papio anubis</i>
H2NWH8	<i>Pongo abelii</i>
L5KHD8	<i>Pteropus alecto</i>
P70564	<i>Rattus norvegicus</i>
F1SMW3	<i>Sus scrofa</i>
L9L820	<i>Tupaia chinensis</i>

3.14 Variações dos aminoácidos na sequência do NLS de maspina que estão associadas a tumores

Foi realizada uma busca no banco de dados de Ensembl (ZERBINO et al., 2018) de possíveis variações na sequência de DNA dos aminoácidos do possível NLS de maspina. Não foram analisadas as variações que se encontravam dentro de íntrons. Dentro das variações encontradas dentro da sequência de DNA foram procuradas aquelas que estão associados a tumores segundo o banco de dados da COSMIC (FORBES et al., 2017).

4 RESULTADOS

Maspina tem múltiplas atividades biológicas que incluem regulação da proliferação, adesão, migração e morte celular, expressão gênica e resposta ao estresse oxidativo (BAILEY et al., 2006). Essas atividades dependem das moléculas com as quais interage e da sua localização subcelular. No núcleo maspina regula a expressão gênica interagindo com o fator regulatório de interferon 6 (IRF6) (BAILEY et al., 2005) e a deacetilase de histona 1 (HDAC1) (LI et al., 2006). Na mitocôndria é pró-apoptótica (ZHANG et al., 1999; JIANG et al., 2002; LATHA et al., 2005; ZHANG; SHI; ZHANG, 2005) e no citoplasma regula a resposta ao estresse oxidativo interagindo com GST (YIN et al., 2005; MAHAJAN et al., 2013). Na membrana e no espaço extracelular maspina aumenta a adesão celular mediante a sua interação com integrina $\beta 1$ (CELLA et al., 2006) e uPA/uPAR (SHENG et al., 1998; YIN et al., 2006). Assim, estudar a regulação da localização subcelular de maspina é importante para entender o controle das suas funções celulares.

Maspina inicialmente foi descrita como um gene supressor de tumor em células tumorais de mama (ZOU et al., 1994). Deste modo, os primeiros estudos confirmaram o papel de maspina como supressora de tumor (HOJO et al., 2001; MAASS et al., 2001; BOLTZE et al., 2003; BOLTZE et al., 2004; SOPEL; KASPRZYK; BERDOWSKA, 2005; SHARMA et al., 2011), em parte devido a seu papel na migração, adesão e morte celular. No entanto, estudos clínicos também mostraram uma correlação da expressão de maspina e um aumento da progressão tumoral (SONG et al., 2002; KIM et al., 2003; UMEKITA; YOSHIDA, 2003; ITO, Y. et al., 2004; KIM et al., 2005; TERASHIMA et al., 2005; LEE; SUH; LI, 2006; TSOLI et al., 2007). Outra controvérsia que ainda não tem sido resolvida é se a localização subcelular de maspina está associada com o seu papel como supressora de tumor. A maior parte dos estudos indicam que a expressão de maspina no núcleo está associada a um bom prognóstico e é essencial para o seu papel de supressora de tumor (GOULET et al., 2011; MACHOWSKA et al., 2014). Entretanto, também surgiram trabalhos mostrando o contrário (WOENCKHAUS et al., 2007; MARTINOLI et al., 2014). Assim, ao elucidar o mecanismo que controla o tráfego

núcleo-citoplasmático de maspina poderemos reconciliar essas divergências. Também, essas divergências indicam que as funções biológicas de maspina dependem do tipo celular e são contexto-dependentes. Contudo, o mecanismo envolvido nesse tráfego núcleo-citoplasmático de maspina ainda é desconhecido. Desta forma, neste trabalho investigamos o mecanismo da translocação de maspina para o núcleo. A maioria das proteínas utiliza a via clássica de importação nuclear, portanto, investigamos se maspina tinha um NLS clássico na sua sequência de aminoácidos a través de um software de predição.

4.1 Predição de um Sinal de Localização Nuclear (NLS) de maspina

Utilizando o algoritmo de predição de NLS cNLS mapper (KOSUGI et al., 2009) identificamos uma sequência de aminoácidos de um possível NLS monopartido ou bipartido de maspina (Figura 7A). Levando em consideração a grande variabilidade de NLS descritos, e que o tamanho do linker entre os grupos de aminoácidos básicos é bastante variável, desenhamos o NLS hipotético de maspina como: $(KX_2KR)X_{17}(KRX_3K)$. Ou seja, o possível NLS contém dois grupos de aminoácidos enriquecidos de lisina e arginina separados por um link de 17 aminoácidos (Figura 7B).

A

cNLS Mapper Result

Predicted NLSs in query sequence	
MDALQLANSFAVDL FKQLCEKEPLGNVLFSPICLSTSLSLAQVGAKGDT	50
ANEIGQVLHFENVKDVFPFGFQTVTSDVNKLSSFYSL KLIKRLYVDKSLNL	100
STEFISSTKRPYAKEL ETVDFKDKLEETKGQINNSIKDLTDGHFENILAD	150
NSVNDQTKILVVNAAYFVGKWMKKFSESETEKCPFRVNKTDTKPVQMMNM	200
EATFCMGNIDSINCKIIELPFQNKHLSMFILLPKDVEDESTGLEKIEKQL	250
NSESLSQWNTNPSTMANAKVKLSIPKFKVEKMIDPKACLENLGLKHIFSED	300
TSDFSGMSETKGVALSNVIHKVCLEITEDGGDSIEVPGARILQHKDELNA	350
DHPFIYIIRHNKTRNIIFFGKFCSP	375

Predicted monopartite NLS		
Pos.	Sequence	Score
108	TKRPYAKEL	6

Predicted bipartite NLS		
Pos.	Sequence	Score
87	KLIKRLYVDKSLNLSTEFISSTKRPYAK	6.1

B

KLIKRLYVDKSLNLSTEFISSTKRPYAK
 (K87X₂K90R91)X₁₇(K109R110X₃K114)

Figura 7. Predição de um NLS na sequência de maspina humana utilizando o programa cNLS Mapper. A. Sequência de aminoácidos da maspina humana (painel superior) e predição de um NLS monopartido (painel do meio) ou bipartido (painel inferior). B. Sequência hipotética do NLS de maspina mostrando os resíduos de lisina e arginina em vermelho.

4.2 A sequência do NLS de Maspina está envolvida no transporte nuclear de maspina

Para testar se esse possível NLS de maspina é responsável pela localização nuclear de maspina construímos um plasmídeo com o cDNA de maspina humana fusionado com GFP (Figura 8A). Dessa maneira poderíamos fazer mutações na sequência do NLS e depois transfectar em células para observar os efeitos na localização subcelular de maspina por meio de microscopia de fluorescência. Assim, para avaliar esse possível NLS decidimos deletar os 28 aminoácidos que constituem esse NLS no plasmídeo maspina-GFP (Figura 8B). Em seguida, transfectamos essa construção em células HEK293T e observamos a localização subcelular de maspina (Figura 9A) ao microscópio de fluorescência.

A

Created with SnapGene®

B

Maspina-GFP

Maspina_{ΔNLS}-GFP

Figura 8. Deleção do possível sinal de localização nuclear (NLS) de maspina. A. Mapa do plasmídeo Maspina-GFP. B. Diagrama esquemático da localização do possível NLS de maspina e a deleção desse NLS na sequência de maspina-GFP

Figura 9. Localização de maspina com os resíduos do NLS predito deletados. A. Células HEK293T foram transfectadas com os plasmídeos indicados à esquerda da figura. Os núcleos foram corados com Hoechst e o material foi analisado em um microscópio confocal. Barra de escala: 10 μ m. B.

Quantificação do número de células que apresentam uma maior quantidade de maspina no núcleo com ambos os plasmídeos.

Observamos que ao transfectar esse plasmídeo sem o NLS de maspina em células HEK293T há uma diminuição de maspina no núcleo quando comparado com a maspina selvagem (Figura 9A). Esses níveis de maspina nuclear foram quantificados pela contagem de células com uma maior quantidade de maspina no núcleo do que no resto da célula (Figura 9B). Usando o teste de Fisher's Exact ($p < 0,05$) foi determinado que existe diferença significativa no número de células que apresentam uma menor quantidade de maspina no núcleo quando foi deletado o NLS de maspina. Esse resultado sugere que esse NLS tem um papel na localização subcelular de maspina.

4.3 Localização subcelular de Maspina com mutações sítio-dirigidas dos resíduos de Lisina e Arginina no possível NLS

Depois de termos observado uma redução dos níveis de maspina nuclear quando a sequência do possível NLS foi deletada, decidimos fazer mutações pontuais dos aminoácidos básicos dessa sequência já que são os essenciais para a interação com as importinas. Logo, cada uma das lisinas e argininas presentes na sequência desse NLS foi mutada. Desse modo, podemos identificar quais são os aminoácidos fundamentais desse NLS de maspina (Figura 10) Para tanto, por meio de mutações sítio-dirigidas foram mutadas 4 lisinas por alaninas: lisina 87, 90, 109 e 114; e 4 argininas por glutamina: arginina 91 e 110.

Figura 10. Diagrama esquemático das mutações em lisinas e argininas feitas no plasmídeo maspina-GFP.

Os plasmídeos de maspina-GFP contendo as mutações pontuais de lisinas (Figura 11) e argininas (Figura 12) no NLS de maspina foram transfectados em células HEK293T e foi observada a localização subcelular de maspina por microscopia de fluorescência.

Figura 11. Localização de maspina-GFP com as mutações em lisina no NLS de maspina. Células HEK293T foram transfectadas com os plasmídeos indicados à esquerda da figura. Os núcleos foram corados com Hoechst e o material foi analisado em microscópio confocal. Barra de escala: 10 μ m.

Figura 12. Localização de maspina-GFP com as mutações em arginina no NLS de maspina. Células HEK293T foram transfectadas com os plasmídeos indicados à esquerda da figura. Os núcleos foram corados com Hoechst e o material foi analisado em microscópio confocal. Barra de escala: 10 μ m.

Não observamos nenhuma diferença entre a localização de maspina com as mutações nos resíduos de lisina e arginina comparada com a localização de maspina selvagem (Figura 11 e Figura 12). Como verificamos que a deleção do NLS resultou em diminuição significativa de maspina no núcleo, os ensaios das transfecções com as mutações pontuais indicam que essas não foram suficientes para abolir a localização nuclear de maspina. No entanto, é possível que diferentes combinações dessas mutações sejam necessárias para observar uma diminuição de maspina no núcleo.

4.4 Localização subcelular de Maspina com as mutações dos resíduos de Serina 135 e 240

Sabemos também por trabalhos prévios do nosso grupo que a localização nuclear de maspina é regulada por meio da sinalização de EGF (TAMAZATO LONGHI et al., 2016). Nesse estudo foi observado um aumento no número de células com maiores níveis de maspina no núcleo depois do tratamento com EGF. Sabendo isso, fizemos uma busca de quais aminoácidos de maspina poderiam estar fosforilados usando o preditor de sítios de fosforilação online NetPhos 2.0 (BLOM; GAMMELTOFT; BRUNAK, 1999). Usando esse software online conseguimos identificar vários possíveis sítios de fosforilação. Em seguida, procuramos no banco de dados PhosphositePlus® (HORNBECK et al., 2015) quais desses possíveis sítios de fosforilação de maspina já tinham sido confirmados empiricamente. Assim, achamos que os resíduos de serina 135 e 240 com *score* alto no preditor de sítios de fosforilação e com evidência experimental dessa fosforilação (OLSEN et al., 2010; NARAYAN; MIRZA; TWINING, 2011; TSAI et al., 2015). Como nossos dados indicam que a fosforilação pode ter um papel na localização subcelular de maspina, foram feitas mutações sítio-dirigidas nos resíduos de serina 135 e 240 para investigar se esses resíduos estão envolvidos na localização subcelular de maspina (Figura 13A).

Figura 13. Localização de maspina-GFP com as mutações em serinas. A. Diagrama esquemático das mutações em serina feitas no plasmídeo maspina-GFP B. Células HEK293T foram transfectadas com os plasmídeos indicados à esquerda da figura. Os núcleos foram corados com Hoechst e o material foi analisado em microscópio de fluorescência. Barra de escala: 10 μ m.

Os plasmídeos maspina-GFP com as mutações em serina foram transfectados em células HEK293T e foi observada a localização de maspina por microscopia de fluorescência (Figura 7B). Observamos que comparado com o plasmídeo de maspina selvagem as mutações em serina não têm nenhum efeito na localização subcelular de maspina (Figura 13B). Concluímos que nessa linhagem a fosforilação desses resíduos de maspina não têm um papel na localização subcelular de maspina.

4.5 A localização de maspina depende do tipo de célula

A localização de maspina porém parece variar em função do tipo celular, já que a localização de maspina-GFP com as transfecções que realizamos em HEK293T e HeLa é maior no núcleo diferente do que foi observado em outras linhagens celulares. Em células TM40D e MDA-MB 231 a localização de maspina é citoplasmática (ZHANG; SHI; ZHANG, 2005; BODENSTINE et al., 2014); e em células H1299, Hs578T e MCF7 é predominantemente citoplasmática porém também tem maspina nuclear (DZINIC et al., 2013; BODENSTINE et al., 2014; MACHOWSKA et al., 2014). Em estudo prévio do nosso grupo, análise por imunofluorescência em corte histológico da glândula mamária pudemos observar células com bastante maspina no núcleo, outras com uma menor quantidade no núcleo e inclusive células com núcleo sem qualquer marcação para maspina (TAMAZATO LONGHI et al., 2016). Esta variação também está relacionada com as condições fisiológicas da célula. Por exemplo, no caso da glândula mamária apesar de ser o mesmo tipo celular, algumas células podem estar com uma via de sinalização ativa e outras não. Assim, devido a que a maspina pode estar envolvida nesses processos a sua localização subcelular varia.

O modelo do ovócito de *Xenopus laevis* provou ser útil para investigar os mecanismos que regulam o tráfego núcleo-citoplasmático (PANTÉ, 2006). Por isso, esse modelo foi utilizado para estudar o transporte nuclear de maspina. Para isso, microinjetamos no citoplasma dos ovócitos maspina recombinante conjugada a partículas de ouro. Uma partícula de ouro é muito grande e não é capaz de atravessar a membrana nuclear somente por difusão. Por isso precisa de transporte ativo para ser translocada ao núcleo. Portanto, depois de microinjetar maspina-Ouro observamos a

localização de maspina em cortes dos ovócitos por meio de microscopia eletrônica (Figura 14). Como controle negativo foi utilizado BSA e como controle positivo BSA conjugado ao NLS de SV40. Observamos que BSA-Ouro não transloca para o núcleo, a diferentemente do BSA fusionado com o NLS de SV40 (Figura 14, painéis superiores, setas). No caso de Maspina, não conseguimos observar nenhuma partícula de ouro dentro do núcleo (Figura 14, painel inferior, setas). Esse ensaio confirma que a localização subcelular de maspina varia em função do tipo celular e do estado das células.

Figura 14. A maspina conjugada a partículas de ouro não é capaz de entrar no núcleo em ovócitos de *Xenopus laevis*. Ovócitos de *X. laevis* foram microinjetados com maspina, BSA ou BSA-NLS conjugados com ouro coloidal. Após 1 e 2h foram fixados com glutaraldeído 2% *overnight*. Em seguida foram desidratados, embebidos em Epon, seccionados e visualizados em um microscópio eletrônico de transmissão. As setas indicam as partículas de ouro. N: núcleo. C: Citoplasma. Barra de escala: 500 nm.

4.6 Maspina se difunde ao núcleo em células permeabilizadas com digitonina

Por muito tempo o modelo prevalecente de transporte passivo de moléculas através do NPC previa uma barreira rígida para moléculas acima de 30-60 kDa (PAINE; FELDHERR, 1972; PAINE; MOORE; HOROWITZ, 1975). Estudo recente demonstrou que não existe um limite de tamanho ou massa molecular capaz de determinar se uma proteína se difunde passivamente para o núcleo (TIMNEY et al., 2016). Nesse estudo eles observaram que conforme aumentava a massa molecular da proteína o transporte passivo diminuía, como era esperado. No entanto, não observaram uma diminuição acentuada, e ainda, proteínas com mais de 60 kDa conseguem se difundir um pouco para o núcleo. Ou seja, o NPC forma uma barreira flexível e não é rígida como se pensava antes. Esse limite para a difusão para o núcleo depende de outros fatores além do tamanho, como a estrutura e carga de uma proteína. Nas transfecções de maspina-GFP que tem 69 kDa, em células HEK293T e HeLa é possível observar uma quantidade alta de maspina no núcleo. Logo, nos perguntamos se a maspina nuclear que estávamos observando era translocação passiva. No caso de maspina, sabemos por trabalhos prévios do nosso grupo que a localização nuclear de maspina é regulada por meio da sinalização de EGF (TAMAZATO LONGHI et al., 2016). Entretanto, nos perguntamos se além desse transporte regulado estávamos observando translocação passiva.

Para testar isso, foi feito um ensaio de importação nuclear em células HeLa. Nesse ensaio as células são permeabilizadas com digitonina, removendo o citosol, porém deixando o núcleo da célula intacto. Em seguida, as células foram incubadas com maspina recombinante, BSA e BSA-NLS conjugado ao Cy3. Essas proteínas foram incubadas na presença ou ausência de um sistema regenerativo de energia e do conjunto de proteínas necessárias para realizar a importação nuclear, que nesse caso estão no extrato de citosol. A seguir, as células foram visualizadas em um microscópio de fluorescência para observar a localização de maspina nessas condições (Figura 15).

Figura 15. Maspina se difunde para o núcleo em células permeabilizadas com digitonina. Células HeLa foram permeabilizadas com digitonina (20 $\mu\text{g/ml}$) por 3 min e incubadas com maspina, BSA, BSA-NLS conjugadas ao fluoróforo Cy3. As células foram incubadas com e sem energia e citosol (RRL). Em seguida as células foram fixadas em PFA 3%. Os núcleos foram corados com DAPI e as células foram visualizadas em um microscópio confocal. Ambas barras de escala representam 10 μm . As imagens circunscritas em quadrados estão mostradas em maior aumento.

Confirmamos que os núcleos das células permeabilizadas com digitonina se encontravam intactos, já que ao incubar as células com Dextran Texas Red não achamos o polissacarídeo dentro de núcleo (Figura 15A). Confirmamos também que o sistema de importação nuclear estava funcionando incubando as células permeabilizadas com BSA fusionado ao NLS clássico de SV40 (BSA-NLS) (Figura 15B). Observamos que na ausência de energia e de extrato citosólico o BSA-NLS se encontra só no citoplasma (Figura 15B, painéis da esquerda), enquanto que na presença de energia e de extrato citosólico o BSA-NLS foi translocado para o núcleo (Figura 15B, painéis da direita). Em contraste ao BSA-NLS, maspina foi capaz de translocar para o núcleo tanto na ausência quanto na presença de energia e de citosol (Figura 15C). Esse resultado indica que sob essas condições experimentais maspina transloca para o núcleo por meio de difusão.

4.7 O NLS de maspina fusionado a 5GFPs transporta a proteína quimérica em células

HeLa transfetadas

Apesar do ensaio em células permeabilizadas indicar que maspina é capaz de translocar para o núcleo passivamente, existe evidência que a localização subcelular de maspina é regulada. Maspina tem diferentes funções biológicas dependendo da localização subcelular e isto parece ser importante para sua atividade supressora de tumor (SOOD et al., 2002; MOHSIN et al., 2003; DIETMAIER et al., 2006; GOULET et al., 2011; MACHOWSKA et al., 2014). Além disso, em células MCF10A, maspina se acumula no núcleo quando estimulada com ligantes de EGFR (TAMAZATO LONGHI et al., 2016) e se acumula no citoplasma na presença de inibidores de tirosina fosfatase (TAMAZATO LONGHI; CELLA, 2012). Nós estávamos interessados em estudar o transporte regulado de maspina. Para tal, baseados em um estudo que mostra que um complexo formado por até 4 proteínas de GFP(108 kDa) ainda consegue se difundir para o núcleo (WANG; BRATTAIN, 2007), decidimos construir o plasmídeo para expressão de toda a cadeia polipeptídica de maspina fusionada a 5GFPs, denominado MaspinFL-5GFPs (FL- *full lenght*). Dessa forma, poderíamos distinguir o transporte regulado do transporte passivo de maspina. Maspina fusionada a 5GFPs resulta em uma proteína de 172 kDa incapaz de se difundir para o núcleo (Figura 16A). Também, decidimos fusionar o NLS de maspina com 5GFPs para testar a capacidade dessa sequência de promover a importação nuclear de 5GFPs, dando origem a construção de 5GFPs-MaspinNLS (Figura 16B).

Figura 16. Plasmídeos de 5GFPs utilizados para o estudo do transporte regulado de maspina. A. Mapa do plasmídeo MaspinFL-5GFPs. **B.** Mapa do plasmídeo 5GFPs-MaspinNLS.

Esses dois plasmídeos foram transfectados em células HeLa e a localização dos 5GFPs foi visualizada ao microscópio de fluorescência. Observamos que o NLS de maspina foi capaz de induzir o transporte nuclear da proteína quimérica de 5GFPs comparado com o vetor 5GFPs vazio (Figura 17A, painéis superiores e do meio). Curiosamente, MaspinFL-5GFPs não foi observada no núcleo somente no citoplasma (Figura 17A, painel inferior).

Figura 17. O NLS de maspina fusionado a 5GFPs induz o transporte nuclear da proteína quimérica em células HeLa. A. Células HeLa foram transfectadas com os plasmídeos 5GFPs-MaspinNLS, MaspinFL-5GFPs e 5GFPs. Após 24h, as células foram fixadas e visualizadas em um microscópio confocal. Os núcleos foram corados com DAPI. Barra de escala: 10 μ m. B. Quantificação da razão da fluorescência nuclear pela citoplasmática das imagens tiradas ao microscópio confocal. A fluorescência de pelo menos 50 células foi medida em cada condição. Barras de erro mostram a média $\pm$ o erro padrão da média (*standard error of the mean* ou S.E.M) dos três plasmídeos.

A capacidade do NLS de maspina de translocar os 5GFPs para o núcleo foi quantificação da através da fluorescência do núcleo sobre a fluorescência do citoplasma nas células transfectadas (Figura 17B). Observamos que a translocação de 5GFPs mediada pelo NLS de maspina é significativamente maior do que a de 5GFPs. Assim, podemos concluir que a sequência do NLS de maspina é capaz de promover a translocação da proteína quimérica de 5GFPs para o núcleo.

A ausência de translocação nuclear de MaspinFL-5GFPs sugere que a sequência polipeptídica de maspina impõe alguma restrição ao NLS, de tal forma a impedi-lo de interagir com a maquinaria de translocação. Essa restrição poderia ser de natureza conformacional (NLS estaria críptico), ou talvez uma outra proteína estaria interagindo e assim ocultando o NLS. É possível também que alguma sinalização seja necessária para de alguma forma liberar esse NLS, ou torna-lo “ativo” (essas hipóteses não são mutuamente exclusivas). Assim, decidimos repetir as transfecções nas linhagens HEK293T (Figura 18) e MCF10A (Figura 19). Em HEK293T havíamos observado que o NLS de maspina participa da regulação da translocação de maspina para o núcleo (Figura 9), indicando que nessas células de alguma forma o NLS de maspina estaria “ativo”. Em MCF10A maspina endógena se acumula no núcleo quando a via de EGFR é ativada (TAMAZATO LONGHI et al., 2016). Portanto, é possível que nessa célula o “sinal” que permite a interação do NLS com a maquinaria de translocação esteja presente.

Figura 18. O NLS de maspina fusionado a 5GFPs induz o transporte nuclear da proteína quimérica em células HEK293T. Células HEK293T foram transfectadas com os plasmídeos 5GFPs-MaspinNLS, MaspinFL-5GFPs e 5GFPs. Após 24h, as células foram fixadas e visualizadas em um microscópio confocal. Os núcleos foram corados com Hoechst. Barra de escala: 10 μ m.

Nesses ensaios observamos que tanto em HEK293T quanto em MCF10A, o NLS de maspina, de forma semelhante ao observado em células HeLa, é capaz de translocar a proteína quimérica de 5GFPs para o núcleo (Figura 18 e Figura 19, respectivamente). Porém, o mesmo não foi observado quando esse NLS está inserido no polipeptídeo de maspina. Embora ainda não se consiga compreender o que impede

a translocação nuclear de MaspinFL-5GFPs, esses ensaios mostraram que o NLS promove translocação nuclear em 3 tipos celulares diferentes.

Figura 19. O NLS de maspina fusionado a 5GFPs induz o transporte nuclear da proteína quimérica em células MCF10A. Células MCF10A foram transfectadas com os plasmídeos 5GFPs-MaspinNLS, MaspinFL-5GFPs e 5GFPs. Após 48h, as células foram fixadas e visualizadas em um microscópio confocal. Os núcleos foram corados com Hoechst. Barra de escala: 10 μ m

4.8 Ran-GTPase está envolvido no transporte nuclear do NLS de maspina

Como observamos que o NLS de maspina era capaz de transportar 5GFPs, para o núcleo em três linhagens celulares, nos perguntamos qual era a maquinaria que poderia estar envolvida nessa translocação. Devido a que esse NLS está translocando uma proteína de 130 kDa, essa translocação deve estar acontecendo às expensas de energia. Assim, decidimos investigar se Ran GTPase, uma das proteínas principais envolvidas no transporte ativo de proteínas do núcleo, estava envolvida no transporte nuclear de maspina. Para tanto, células HeLa foram co-transfectadas com os plasmídeos 5GFPs-MaspinNLS e os mutantes RanQ69L e RanT24N fusionados à proteína fluorescente mCherry. O mutante RanQ69L não é capaz de sofrer hidrólise e portanto sempre fica na forma de Ran-GTP. No caso do mutante RanT24N este tem pouca afinidade por GTP e portanto sempre se mantém na forma Ran-GDP. Ambos os mutantes inibem a importação nuclear dependente de Ran-GTPase e, portanto, decidimos transfectá-los com os plasmídeo 5GFPs-MaspinNLS em células HeLa (Figura 20).

Figura 20. Os mutantes de Ran-GTPase inibem a importação nuclear de 5GFPs-MaspinNLS em células HeLa. A. Células HeLa foram co-transfectadas com os plasmídeos 5GFPs-MaspinNLS, RanWT-mRFP, mCherry-RanT24N e mCherry-RanQ69L (painéis superiores, centrais e inferiores,

respectivamente). **B.** O mesmo procedimento descrito em (A) foi repetido com o plasmídeo 5GFPs. Após 24h, as células foram fixadas e visualizadas em um microscópio confocal. O núcleo foi corado com DAPI. Barra de escala: 10 μ m. **C.** Quantificação da razão da fluorescência nuclear pela fluorescência citoplasmática das imagens tiradas ao microscópio confocal. A fluorescência de pelo menos 50 células foi medida em cada condição. Barras de erro mostram a média $\pm$ o erro padrão da media (*standard error of the mean* ou S.E.M) dos plasmídeos.

Depois de co-transfectar os mutantes de Ran-GTPase com 5GFPs-MaspinNLS observamos que o transporte nuclear do NLS de maspina foi inibido (Figura 20A, painéis centrais e inferiores). Em comparação, observamos que quando 5GFPs-MaspinNLS é transfectado com o plasmídeo selvagem de Ran-GTPase, a fluorescência é claramente observada no núcleo, de forma semelhante ao observado quando células HeLa foram transfectadas somente com plasmídeo 5GFPs-MaspinNLS (compare painéis superiores da Figura 20A com Figura 17B, painéis superiores). Também decidimos transfectar o vetor de 5GFPs vazio com o plasmídeo de Ran-GTPase e os mutantes desta para ter certeza que é o transporte nuclear promovido pelo NLS de maspina não se deve a um aumento da expressão de Ran, e que a localização subcelular dos 5GFPs se mantém igual com os mutantes de Ran. Observamos que a localização subcelular do vetor vazio permanece igual independentemente do plasmídeo de RanGTPase com o qual foi co-transfectado (Figura 20B). Em seguida, quantificamos a importação nuclear nesse ensaio calculando a razão da fluorescência no núcleo pela fluorescência do citoplasma. Assim, observamos que existe uma diferença significativa na importação nuclear de 5GFPs-MaspinNLS quando este é transfectado com Ran-GTPase selvagem comparado com a transfecção com os mutantes de Ran-GTPase (Figura 20C). Concluímos então que o NLS de maspina depende de uma Ran-GTPase funcional para promover a translocação de 5GFPs para o núcleo.

4.9 O NLS de maspina não interage com KPNA2

Após termos identificado que o NLS de maspina depende de Ran-GTPase para realizar a importação nuclear, nos perguntamos se essa translocação era a través de importinas, as principais mediadoras do transporte nuclear de proteínas. Para isso, por meio de Co-IP, testamos se o NLS de maspina estava interagindo com as KPNA2, KPNA4 ou KPNA1; tendo assim um representante de cada subfamília de importina α .

Como KPNA2 mostrou-se como um potencial ligante do NLS de maspina (dado não mostrado), fomos confirmar se o NLS de maspina interage com KPNA2. Para isso, transfectamos células HeLa com os plasmídeos 5GFPs, MaspinFL-5GFPs, 5GFPs-MaspinNLS e 5GFPs-NLS1, preparamos extratos de proteínas dessas células e imunoprecipitamos GFP. Em seguida, analisamos o material imunoprecipitado por *Western Blot* com o anticorpo anti-KPNA2 para identificar se KPNA2 co-imunoprecipitava com o NLS de maspina (Figura 21).

Figura 21. O NLS de maspina não interage com KPNA2 em células HeLa transfectadas. Células HeLa foram transfectadas com os plasmídeos 5GFPs, MaspinFL-5GFPs, 5GFPs-MaspinNLS e 5GFPs-NLS1, como indicado. Os lisados foram imunoprecipitados com anti-GFP e o material imunoprecipitado foi analisado por *Western Blot* para detectar a KPNA2 (painéis inferiores). 4% do total dos extratos utilizados na imunoprecipitação foram incluídos como controles do *Western Blot* e da expressão das proteínas nas células. A membrana também foi incubada com anti-GFP para confirmar a eficiência da imunoprecipitação das proteínas quiméricas de 5GFPs (painel superior).

Nesse ensaio verificamos que a imunoprecipitação foi bem sucedida com todas as amostras. (Figura 21, colunas 1 a 4 painel superior). No entanto, KPNA2 parece interagir inespecificamente com GFP, já que detectamos a proteína no extrato de células transfectadas com 5GFPs (Figura 21, colunas 1, painel do meio). Esse ensaio

indica que a interação entre KPNA2 e o NLS de maspina não é específica. Para confirmar esse resultado, decidimos fazer a Co-IP reversa e imunoprecipitar KPNA2 e observar se o NLS de maspina co-imunoprecipita com este (Figura 22).

Figura 22. O NLS de maspina não interage com KPNA2 em células HeLa transfectadas. Células HeLa foram transfectadas com os plasmídeos 5GFPs, MaspinFL-5GFPs, 5GFPs-MaspinNLS e 5GFPs-NLS1, como indicado. Os lisados foram imunoprecipitados com anti-KPNA2 e o material imunoprecipitado foi analisado por *Western Blot* para detectar as proteínas quiméricas de 5GFPs (painel inferior). 4% do total dos extratos utilizados na imunoprecipitação foram incluídos como controles do *Western Blot* e da expressão das proteínas nas células. A membrana também foi incubada com anti-KPNA2 para confirmar a eficiência da imunoprecipitação (painel superior).

A análise da imunoprecipitação por *Western blot* com anti-KPNA2 mostrou que a imunoprecipitação foi bem sucedida com todas as amostras (Figura 22, colunas 1-4, imagem superior). Por outro lado, a análise com o anticorpo anti-GFP mostrou que nem o NLS de maspina e nem a sequência inteira de maspina co-imunoprecipitam com KPNA2 (Figura 22, colunas 2 e 3, imagem inferior), já que não detectamos nenhuma banda correspondente a essas proteínas. A detecção de GFP nos diferentes extratos indica que a transfecção foi eficiente (Figura 22, colunas 5-8, imagem inferior). Esse ensaio confirma o resultado apresentado na figura 21.

Sabemos que maspina acumula no núcleo em células MCF10A quando tratada com EGF (TAMAZATO LONGHI et al., 2016), por isso decidimos investigar se essa translocação ao núcleo era mediada por KPNA2. Para isso, células MCF10A foram carenciadas e tratadas com EGF por 30 min e o extrato dessas células foi imunoprecipitado com o anticorpo anti-maspina ou o isotipo IgG2b como controle. Em

seguida, analisamos por *Western blot* os produtos dessa imunoprecipitação utilizando o anticorpo anti-KPNA2 para determinarmos se a maspina estava interagindo com KPNA2 nessas condições (Figura 23).

Figura 23. Maspina não interage com KPNA2 em células MCF10A. Células MCF10A foram carenciadas por 24h e tratadas com EGF (20ng/ml) por 30 min. Os lisados foram imunoprecipitados com anti-maspina e o material imunoprecipitado foi analisado por *Western Blot* para detectar KPNA2 (painel superior). 500 µg de extrato total foi imunoprecipitado com IgG2b como controle da imunoprecipitação. Extrato total de células MCF10A foi incluído como controle do *Western Blot* e da expressão das proteínas nas células. A membrana também foi incubada com anti-maspina para confirmar a eficiência da imunoprecipitação (painel inferior).

No *Western Blot* com anti-maspina observamos que a imunoprecipitação foi bem sucedida, já que foi detectada a banda de maspina tanto nas células carenciadas quanto nas tratadas com EGF (Figura 23, poço 1 e 2, imagem inferior). No caso do *Western blot* com anti-KPNA2 não detectamos a KPNA2 nos extratos de células carenciadas nem nas tratadas com EGF e imunoprecipitadas com anti-maspina. Apesar disso, no extrato total de células MCF10A a KPNA2 foi detectada (Figura 23, poço 4, imagem superior). Concluindo assim que a maspina não interage com KPNA2 e que deve estar utilizando outras vias para ser transportada para o núcleo.

4.10 O NLS de maspina transloca para o núcleo por uma via não convencional

Para confirmar que o NLS de maspina não está sendo translocado para o núcleo pela via clássica de importação nuclear, tratamos células MCF10A com Importazole, um

inibidor de KPNB1 (SODERHOLM et al., 2011). Assim, observamos que a translocação para o núcleo de maspina em células MCF10A não diminui quando é inibida a via clássica de importação nuclear. Curiosamente, foi observado um aumento de maspina nuclear quando KPNB1 é inibida (Figura 24A, painel inferior, setas). A inibição da translocação nuclear de p65 induzida por $\text{TNF}\alpha$ confirma que importazole está funcionando como o previsto em nosso sistema (Figura 24B, painel inferior). Portanto, esses dados sugerem que maspina não utiliza a via clássica para sua importação nuclear.

Figura 24. A maspina nuclear aumenta depois da inibição de KPNB1. Células MCF10A carenciadas foram tratadas com importazole 50 μ M ou DMSO (0,4%) durante 6h. Em seguida foram tratadas com TNF α (10ng/ml) durante 2h para translocar p65 para o núcleo, já que foi utilizado p65 como controle positivo da inibição de KPNB1. As células foram fixadas em PFA 2% e analisadas por imunofluorescência com anti-maspina (A) e com anti-p65 (B). Barra de escala: 10 μ m.

A condição experimental em que maspina se acumula no núcleo nos oferece um modelo onde podemos tentar identificar potenciais ligantes de maspina no núcleo. Assim, tratamos células MCF10A com importazole e imunoprecipitamos maspina. O material imunoprecipitado foi analisado por espectrometria de massas para identificar as proteínas que co-imunoprecipitam com maspina. Não foram identificadas proteínas envolvidas no transporte nuclear, porém uma grande quantidade de proteínas ribossomais e proteínas relacionadas a splicing co-imunoprecipitam com maspina (Figura 25). Além disso, foram identificadas algumas proteínas sinalizadoras como PIK3CA, 14-3-3 proteína gamma e a Peptidilprolil isomerase A (PPIA) (APÊNDICE A).

A

B

Figura 25. Análise das proteínas que co-imunoprecipitam com maspina após tratamento com Importazole. Células MCF10A carenciadas foram tratadas com importazole 50 μ M durante 6h. 250 μ g do extrato de proteínas foram incubados com 1 μ g de anticorpo e *beads* de *sepharose* com proteína G. As proteínas foram eluídas em Glicina 0.2M pH 2,6 e analisadas em um espectrômetro de massas. **A.** Diagrama de Venn indicando o número de proteínas específicas e comuns para cada condição. **B.** Análise de enriquecimento por anotação dos processos biológicos das proteínas que co-imunoprecipitam com maspina.

4.11 A sequência do NLS de Maspina se encontra conservada em outros organismos

Sequências com funções importantes se encontram conservadas em diferentes organismos, por isso fomos procurar se a sequência do NLS de maspina está

conservada. O alinhamento da sequência de aminoácidos que constituem o possível NLS de maspina com a sequência de aminoácidos de maspina de outros organismos mostrou que quase todos esses aminoácidos se encontram conservados (Figura 26). Dos 27 aminoácidos que constituem o sinal de localização nuclear, somente a leucina (L) 100 não se encontra conservada na sequência de maspina em mamíferos (Figura 26B). Curiosamente, os aminoácidos básicos (lisinas e argininas) se encontram altamente conservados. Assim, o fato que o NLS se encontrar conservado em diferentes organismos sugere que essa sequência tem uma função importante, o que pode estar relacionado com seu papel na localização nuclear de maspina.

Figura 26. O NLS de maspina se encontra conservado em mamíferos. A. As sequências de aminoácidos do NLS de maspina de *H. sapiens*, *P.troglodytes*, *M.musculus*, *Rattus norvegicus*, *E.caballus* e *G.gallus* foram alinhadas mediante o algoritmo MUSCLE. Os aminoácidos idênticos foram marcados em preto e os similares em cinza usando o software Boxshade. B. A sequência de aminoácidos do NLS de maspina humana foi alinhada com a de outros 46 mamíferos usando o algoritmo MUSCLE. Foi criado um logo da sequência usando o software online WebLogo. Azul: aminoácido básico. Vermelho: aminoácido ácido. Verde e roxo: aminoácido Polar. Preto: Demais aminoácidos. A altura de cada aminoácido corresponde a sua frequência de ocorrência no alinhamento.

4.12 *Variações dos aminoácidos na sequência do NLS de maspina estão associadas a tumores*

Sabemos que a localização subcelular de maspina está associada a progressão tumoral então nos perguntamos se existem polimorfismos nesse NLS que estejam associados a tumores. Para verificar essa possibilidade procuramos no banco de dados

do Ensembl (ZERBINO et al., 2018) variações na sequência de DNA de maspina que codifica aos aminoácidos do NLS. Depois analisamos se essas variações nesses aminoácidos estavam associadas a tumores (Tabela 7).

Tabela 7. Variações na sequência do NLS de maspina associadas a tumores

Aminoácido	Sequência Aminoácidos	Fenótipo	Tipo de mutação	Aminoácidos resultantes
R 91	SLKLIKrLYVDKSL	Tumor de pulmão	Missense	Q
Y 93	KLIKRLyVDKSLNL	Não tem	Sinônima	Y
K 109	EFISSTkRPYAKEL	Não tem	Missense	E
R 110	FISSTKrPYAKEL	Tumor de Intestino grosso	Missense	I

Foi verificado que variações nos aminoácidos R91 e R110 estão associadas com tumor de pulmão e tumor de intestino grosso respectivamente. Esses dados apoiam o fato que esses aminoácidos são parte do NLS de maspina e que uma diminuição da translocação para o núcleo está associada com desenvolvimento de tumores.

5 DISCUSSÃO

Maspina tem uma atividade pleiotrópica na célula que depende da sua localização subcelular. Entre essas funções biológicas está a inibição da angiogenese, migração e invasão celular, aumento da adesão celular, regulação da resposta ao estresse oxidativo e controle da expressão gênica (SHI; ZHANG; ZHANG, 2015). A localização subcelular de maspina é importante para o seu papel supressor de tumor (GOULET et al., 2011; MACHOWSKA et al., 2014). Desta forma, a maioria dos estudos mostra uma associação entre maspina nuclear e um melhor prognóstico (LONARDO et al., 2006; SOLOMON et al., 2006; BLANDAMURA et al., 2008; MARIONI et al., 2011). Como a maioria dos estudos sobre maspina foi realizada em modelos clínicos, pouco se sabe sobre as funções celulares e o mecanismos envolvido, em particular do seu transporte e distribuição subcelular. Assim, neste trabalho investigamos o mecanismo do tráfego núcleo-citoplasmático de maspina. Para isso, esse projeto teve como objetivos determinar se maspina tem um NLS e qual é a maquinaria que maspina utiliza para sua translocação ao núcleo. Assim, identificamos uma sequência de 27 aminoácidos na sequência de maspina que é capaz de transportar para o núcleo um complexo de 5GFPs em três diferentes tipos de células. Também observamos que esse NLS depende de Ran-GTPase para realizar essa translocação, que aparentemente independe da via clássica. Finalmente, observamos que maspina também transloca para o núcleo de forma passiva em células permeabilizadas com digitonina.

As proteínas sintetizadas no citoplasma que têm uma função no núcleo podem ser transportadas ao núcleo de forma passiva ou de forma ativa, com gasto de energia. Inicialmente as evidências indicavam, que o tamanho da proteína definia se essa poderia ou não se difundir ao núcleo. Assim proteínas de até 30-60 kDa podiam ser translocadas ao núcleo de forma passiva (PAINE; FELDHERR, 1972; PAINE; MOORE; HOROWITZ, 1975). No entanto, estudos mais recentes têm mostrado que esse limite é mais flexível e que depende de outros fatores além do tamanho (TIMNEY et al., 2016). Assim proteínas maiores de 60 kDa ainda conseguem se difundir ao núcleo (WANG; BRATTAIN, 2007; TIMNEY et al., 2016). Maspina é uma proteína de 42 kDa o que a

coloca dentro dos limites de translocar para o núcleo por difusão. De fato, aqui observamos que maspina recombinante em células permeabilizadas com digitonina transloca para o núcleo de forma passiva.

Vários estudos transfectaram maspina-GFP, em diferentes tipos de células. Em células TM40D e MDA-MB 231 maspina-GFP tem uma localização citoplasmática (ZHANG; SHI; ZHANG, 2005; BODENSTINE et al., 2014). Da mesma forma em células tumorais de mama Hs578T e MC7 e nas células tumorais de pulmão H1299 maspina é predominantemente citoplasmática com alguns níveis de maspina nuclear (DZINIC et al., 2013; BODENSTINE et al., 2014; MACHOWSKA et al., 2014). Porém, nas transfecções de maspina-GFP feitas nas células HeLa e HEK293T observamos uma maior quantidade de maspina no núcleo. Além disso, a maspina na glândula mamária de camundongo apresenta diferentes localizações que variam em uma mesma estrutura tecidual (um ducto mamário) e parece variar em função da fase do desenvolvimento (TAMAZATO LONGHI et al., 2016; dados não publicados). Igualmente, ao microinjetar maspina recombinante no citoplasma de *X. laevis* observamos que maspina não transloca para o núcleo. Assumindo que o transporte passivo observado em células semi-permeabilizadas é replicado na célula intacta, e levando em conta as diferentes localizações subcelulares acima citadas, é provável que existam diferentes *pools* de maspina cujas funções biológicas estejam estritamente relacionadas e talvez dependam do compartimento subcelular para funcionarem adequadamente. As alterações de localização subcelular de maspina observada em inúmeros tipos tumorais e a sua correlação com prognóstico, além das variações observadas em função do tipo e contexto celular sustentam essa hipótese.

Nesse estudo mostramos pela primeira vez um NLS de maspina que é capaz de promover a translocação de proteínas para o núcleo de forma ativa. Entretanto, também demonstramos que maspina pode translocar para o núcleo de forma passiva. Já que as funções de maspina dependem de sua localização subcelular e a localização de maspina no núcleo é essencial para seu papel como supressora de tumor (GOULET et al., 2011; MACHOWSKA et al., 2014), é possível que maspina tenha várias formas para

translocar ao núcleo. Isso ajuda a maspina a desempenhar suas diferentes funções em diferentes condições mesmo quando certas vias de transporte nuclear se encontram inibidas. Outras proteínas com papel importante importante utilizam várias vias para sua translocação ao núcleo (WAGSTAFF; JANS, 2009). Muitas dessas proteínas translocam ao núcleo mediante a via clássica de transporte nuclear e possuem uma via alternativa. WAGSTAFF; JANS (2009) descreveram alguns exemplos dessas proteínas com múltiplas vias de importação nuclear (Tabela 8).

Tabela 8. Proteínas com múltiplas vias de importação e exportação nuclear. Adaptado de WAGSTAFF; JANS (2009).

Protein	Primary pathway	Cytoskeletal facilitation	Alternative pathway	References
(a) Nuclear import				
SRY/SOX-9	Imp β 1	–	Calmodulin	Argentaro et al. (28), Sim et al. (31), Harley et al. (33), Li et al. (34) and Smith et al. (35)
β -Catenin	Involves Ran and a cytoplasmic binding partner	–	Direct nucleoporin binding	Suh et al. (68) and Koike et al. (69)
SMADs	Imps including Imp 7 and Imp 8	–	Direct nucleoporin binding	Xu et al. (72) and Yao et al. (105)
HIV-1 integrase	Imp α/β	–	Diffusion and binding to nuclear components	Hearps and Jans (53)
PTHrP	Imp β 1	Microtubule	Diffusion and binding to nuclear components	Roth et al. (16) and Lam et al. (106)
p53	Imp α/β	Microtubule	–	Roth et al. (16) and Liang and Clarke (107)
NF- κ B	Imp α 3/Imp β 1	Actin	–	Fagerlund et al. (21) and Fazal et al. (22)
(b) Nuclear export				
I κ B	CRM-1	–	Direct nucleoporin binding	Kose et al. (56) and Lee and Hannink (76,79)
TR α	Calreticulin	–	CRM-1 enhanced	Grespin et al. (50)

O alinhamento do NLS de maspina de vários mamíferos mostrou que essa sequência se encontra conservada. Igualmente. Igualmente, outras sequências de NLS, como a da Histona 2A (FRIES et al., 2007), do CDC6 (TAKEI; YAMAMOTO; TSUJIMOTO, 1999), do STRA8 (TEDESCO et al., 2009) e de PINCH1 (WANG et al., 2011) se encontram conservados em diferentes espécies. O fato dessa sequência de maspina estar evolutivamente conservado indica que essa sequência tem uma função importante o que concorda com seu papel como NLS de maspina.

Sabemos que existem fatores que regulam a localização subcelular de maspina como a sua fosforilação em resíduos de tirosina (TAMAZATO LONGHI; CELLA, 2012) e pela ativação de EGFR (TAMAZATO LONGHI et al., 2016). Assim, sabemos que o transporte de maspina é regulado. A maioria das proteínas com um transporte regulado transloca ao núcleo pela via clássica, apresentando um NLS que é reconhecido por carioferinas alfa e beta. Nada é conhecido sobre o transporte nuclear de maspina, esse é o primeiro trabalho a identificar um NLS em maspina, já que essa sequência é capaz de mediar a translocação de um complexo de 5GFPs em células HeLa, HEK293T e MCF10A. Porém, este NLS não tem as características de um NLS bipartido clássico, já que contém dois *clusters* de aminoácidos básicos constituídos por dois aminoácidos somente. NLS que possuem só dois aminoácidos básicos unicamente conseguem se ligar ao sítio menor de carioferina alfa. Para que o NLS seja capaz de se ligar ao sítio maior de importina alfa é necessário pelo menos uma sequência formada por três aminoácidos básicos. KOSUGI et al. (2009) classificou os NLS com essas características dentro da classe 3 de NLS. Alguns exemplos de proteínas que se ligam unicamente ao sítio menor de carioferina alfa são a RNA helicase II (KOSUGI et al., 2009) e a Escramblase de fosfolípidos 4 humana (LOTT et al., 2011), com um NLS formado pela sequência KRSFSKAF e GSIIRKWN, respectivamente. O NLS de maspina é semelhante a esta classe de NLS e é possível que pertença a esse grupo.

Devido a essa semelhança com os NLS da classe 3, procuramos identificar algum subtipo de carioferina alfa que interagiria com esse NLS. Porém, não achamos uma interação com carioferina alfa através de ensaios de co-Imunoprecipitação, tanto em células expressando maspina endógena quanto em células transfectadas com 5GFPs-MaspinNLS. A ausência de interação entre o NLS de maspina e carioferina alfa foi corroborada através de Calorimetria de Titulação Isotérmica ou ITC (dados não mostrados). KIMURA et al. (2013) mostraram uma possível interação de maspina com transportina 1 e importina 11. Assim, pretendemos testar se o NLS de maspina interage com o transportina 1 para translocar para o núcleo utilizando o inibidor M9M de transportina 1 (CANSIZOGLU et al., 2007) e por meio de co-Imunoprecipitação.

Curiosamente, quando tratamos células MCF10A com importazole, um inibidor da via clássica de transporte nuclear, há um aumento de maspina no núcleo. Esse efeito inesperado pode ser devido a uma potencialização do transporte nuclear pelas vias alternativas resultante da inibição da via clássica. Esse acúmulo nuclear ao inibir a via clássica do transporte nuclear com Importazole também foi observada com as proteínas AF10A e H2B, proteínas que são importadas ao núcleo de uma forma não convencional (KUBLUN et al., 2014). Dados obtidos através da identificação por espectrometria de massas de proteínas que co-imunoprecipitam com maspina em células MCF10A tratadas com importazole mostraram uma alta frequência de proteínas envolvidas no metabolismo de RNA. Observação semelhante foi feita por nosso grupo em células MCF10A tratadas com EGF, fator que induz um acúmulo de maspina no núcleo (dados não publicados). Essa informação coincide com o fato de proteínas com as mesmas funções utilizam as mesmas vias de importação nuclear (KIMURA et al., 2013). Curiosamente, a maioria das proteínas envolvidas no processamento de RNA utiliza a via da transportina 1 para translocar para o núcleo, a mesma que interage com maspina (KIMURA et al., 2013). Esses dados sustentam a hipótese que está sendo avaliada no momento utilizando um inibidor de transportina 1, como mencionado acima.

As proteínas que interagem com transportina 1 precisam de um NLS conhecido como PY-NLS. Curiosamente, dentro da sequência de aminoácidos que foi identificada através do programa cNLS mapper (Figura 7) existe uma sequência semelhante a um PY-NLS, constituída pelos aminoácidos K₁₀₉R₁₁₀P₁₁₁Y₁₁₂. Apesar da sequência diferir por um aminoácido da sequência consenso dos PY-NLS no C-terminal: K/R/HX₂₋₅PY (LEE et al., 2006), é possível que essa sequência seja um PY-NLS. Foi observado que essa sequência do PY-NLS está dentro de um domínio dobrado dentro da estrutura de maspina (PDB ID 1WZ9), o que faz o PY-NLS ficar menos acessível para se ligar com transportina 1. Porém, as serpinas têm características estruturais únicas nas suas mudanças conformacionais e de dobramento (WHISSTOCK; BOTTOMLEY, 2006). Portanto, é possível que o PY-NLS na sequência de maspina se encontre exposto sob certas condições e seja acessível a transportina 1. Além disso, um estudo mostra que a Histona H3 transloca para o núcleo utilizando Transportina 1, mesmo não apresentando

um PY-NLS (SONIAT; CHOOK, 2016). Curiosamente, essa sequência do possível PY-NLS de maspina também se encontra altamente conservada em mamíferos (Figura 26). Além disso, sequências estruturalmente desordenadas podem funcionar como um PY-NLS (Makoto Kimura, comunicação pessoal). O NLS de maspina fusionado a 5GFPs é provavelmente desordenado, portanto é possível que esse NLS seja um PY-NLS atípico. Assim, é possível que o NLS de maspina transloque para o núcleo interagindo com transportina 1.

A maspina pertence ao clado B dentro da superfamília das serpinas (SILVERMAN et al., 2004). Dentro das serpinas do clado B, apenas a serpina B10 apresenta um NLS clássico (CHUANG; SCHLEEF, 1999). As serpinas B3, B8 carecem de um NLS, porém são translocados para o núcleo de alguma outra maneira (STRIK et al., 2002; KATAGIRI et al., 2006). Serpina B9 transloca para o núcleo de uma forma não convencional (BIRD et al., 2001) e PEDF (*Pigment epithelium-derived factor*), uma serpina sem função inibitória, interage com a transportina 3 (transportina – SR2) para translocar para o núcleo (ANGUISSOLA et al., 2011). PEDF tem um NLS bipartido não clássico semelhante ao NLS de maspina formado pela sequência (K₄₈K₅₃)X₁₂(R₆₇R₆₉) (ANGUISSOLA et al., 2011). Assim o NLS de maspina identificado neste trabalho da mesma forma que as outras serpinas semelhantes parece ter um NLS não convencional e interagir diretamente com algum membro da família das carioferinas beta para sua translocação ao núcleo.

Ainda que o NLS de maspina seja capaz de promover a translocação da proteína quimérica de 5GFPs para o núcleo em células HeLa transfectadas, o mesmo não foi observado quando esse NLS está na sequência inteira de maspina. Esse resultado sugere que a sequência do NLS de maspina pode estar escondido na proteína MaspinFL-5GFPs, deixando-o menos exposto a interação com proteínas envolvidas na translocação nuclear. Também é possível que para deixar exposto esse NLS seja necessária alguma modificação pós-traducional, como discutido a seguir.

Dentro das modificações pós-traducionais de maspina, sabemos que a fosforilação de maspina está associada à localização subcelular de maspina. Maspina acumula no citoplasma ao utilizar inibidores de tirosina fosfatase em células em MCF10A (TAMAZATO LONGHI; CELLA, 2012). Observamos também que a ativação da via de EGFR é seguida de acúmulo de maspina no núcleo e aumento de fosforilação (TAMAZATO LONGHI et al., 2016). Porém, não sabemos se e como a via de EGFR regularia o NLS de maspina. Curiosamente, dados não publicados do nosso grupo mostraram que ao tratar as mesmas células com EGF a fosforilação de maspina em resíduos de tirosina diminui e os níveis de fosforilação em serinas aumenta (dados não publicados). Esse estudo do nosso grupo também viu que EGFR regula a localização de maspina especificamente através das vias de Stat3 e PI3K. De forma semelhante, a proteína PIK3CA, envolvida na ativação de AKT1 por ligantes de receptores de tirosina quinase, co-imunoprecipitou com maspina em células MCF10A tratadas com importazole. É possível, portanto, que essa via de sinalização regule a fosforilação de maspina e direta ou indiretamente, modifique o acesso do NLS aqui identificado.

Um dos mecanismos que regula a translocação de proteínas para o núcleo é o mediado por proteínas que funcionam como âncoras no citoplasma. Essas proteínas retêm as proteínas no citoplasma já que escondem o NLS das proteínas (HOOD; SILVER, 1999). Muitas vezes depois de uma fosforilação ou outra modificação pós-traducional rompe-se essa interação e o NLS é exposto às carioferinas, permitindo assim o seu translocamento para o núcleo (HOOD; SILVER, 1999). Por exemplo, a translocação para o núcleo de p53 é regulada por Parc que funciona como ancora citoplásmica, já que o *knockdown* dessa proteína promove um aumento de p53 no núcleo (NIKOLAEV et al., 2003). No caso de maspina, é possível que a via de EGFR esteja regulando de alguma forma a liberação de maspina de sua âncora citoplasmática. De forma semelhante, a via de EGF não atua diretamente sobre ERK2, mas o libera de suas âncoras, promovendo assim a sua translocação nuclear (WOLF et al., 2001) Também é possível que a variação nos níveis nucleares de maspina em diferentes tipo celulares seja devido à flutuações nos níveis das âncoras citoplasmáticas.

Assim como âncoras citoplasmáticas, podem existir também proteínas que retêm a maspina no núcleo, como acontece com proteínas que não possuem um NLS e entram por difusão ao núcleo e são retidas por proteínas nucleares. A maspina no núcleo interage com HDAC1 e IRF6, ambos reguladores da expressão gênica (BAILEY et al., 2005; LI et al., 2006). A interação entre IRF6 e maspina parece regular a proliferação e a diferenciação celular em células do epitélio mamário (BAILEY et al., 2008). Maspina interage preferencialmente com a forma fosforilada de IRF6. Deste modo foi hipotetizado que maspina inibe a degradação de IRF6 pelo proteassomo e sua translocação ao núcleo, atuando como uma ancora de IRF6 (BAILEY et al., 2008). É possível que IRF6 seja liberado de maspina quando a sua translocação é induzida por EGF. Dessa forma, IRF6 transloca para o núcleo onde promove a parada do ciclo celular.

Dado que a localização subcelular de maspina está associada a seu papel supressor de tumor, procuramos se variações na sequência do NLS de maspina estavam associadas a algum tipo de tumor. Curiosamente, achamos que mutações somáticas nos aminoácidos R91 e R110 estão associadas a tumor de pulmão e tumor de intestino grosso respectivamente. Esses dados apoiam o fato que esses aminoácidos são parte do NLS e que uma diminuição da translocação para o núcleo está associada com desenvolvimento de tumores.

Em resumo, neste trabalho identificamos a primeira sequência na maspina capaz de promover o transporte nuclear de uma maneira Ran-GTP dependente. Além disso, demonstramos que maspina também pode translocar para o núcleo de forma passiva. Além de ter contribuído no entendimento do mecanismo que controla a distribuição de maspina na célula, esse trabalho trouxe pistas importantes sobre um novo papel biológico de maspina – o de regular metabolismo de RNAs. Porém ainda faltam vários aspectos do mecanismo molecular de maspina do transporte nuclear que precisam ser elucidados, como o papel da ativação do EGFR na regulação do NLS de maspina. Também é importante identificar outros possíveis ligantes de maspina que estão

envolvidos na sua translocação ao núcleo assim como na regulação da sua exportação nuclear. Entender por completo o mecanismo molecular de maspina é necessário para poder desenvolver novas terapias para o tratamento do câncer.

6 CONCLUSÕES

- Maspina possui um NLS formado pelos aminoácidos 87 a 113 da sua sequência
- Esse NLS é capaz de promover a translocação de 5GFPs dependente de Ran-GTPase
- Esse NLS parece estar críptico ou inacessível à maquinaria de translocação nuclear quando está inserido na estrutura de maspina
- Mutações pontuais dos aminoácidos de lisina e arginina no NLS de maspina não mudam a sua localização subcelular.
- O transporte nuclear mediado pelo NLS de maspina não é através de KPNA2 e parece ocorrer por uma via não convencional.
- Maspina em células tratadas com Importazole interage com proteínas associadas ao metabolismo de RNAs.
- Além do transporte regulado, maspina também transloca passivamente ao núcleo em células HeLa permeabilizadas com digitonina.

REFERÊNCIAS¹

- AL-AYYOUBI, M.; GETTINS, P. G.; VOLZ, K. Crystal structure of human maspin, a serpin with antitumor properties: reactive center loop of maspin is exposed but constrained. **J Biol Chem**, v. 279, n. 53, p. 55540-4, Dec 31 2004.
- ANGUISSOLA, S.; MCCORMACK, W. J.; MORRIN, M. A.; HIGGINS, W. J.; FOX, D. M.; WORRALL, D. M. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) interacts with transportin SR2, and active nuclear import is facilitated by a novel nuclear localization motif. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. e26234, 2011.
- ASALLY, M.; YONEDA, Y. Beta-catenin can act as a nuclear import receptor for its partner transcription factor, lymphocyte enhancer factor-1 (lef-1). **Exp Cell Res**, v. 308, n. 2, p. 357-63, Aug 15 2005.
- AU, S.; COHEN, S.; PANTE, N. Microinjection of *Xenopus laevis* oocytes as a system for studying nuclear transport of viruses. **Methods**, v. 51, n. 1, p. 114-20, May 2010.
- BAILEY, C. M.; ABBOTT, D. E.; MARGARYAN, N. V.; KHALKHALI-ELLIS, Z.; HENDRIX, M. J. Interferon regulatory factor 6 promotes cell cycle arrest and is regulated by the proteasome in a cell cycle-dependent manner. **Mol Cell Biol**, v. 28, n. 7, p. 2235-43, Apr 2008.
- BAILEY, C. M.; KHALKHALI-ELLIS, Z.; KONDO, S.; MARGARYAN, N. V.; SEFTOR, R. E.; WHEATON, W. W.; AMIR, S.; PINS, M. R.; SCHUTTE, B. C.; HENDRIX, M. J. Mammary serine protease inhibitor (Maspin) binds directly to interferon regulatory factor 6: identification of a novel serpin partnership. **J Biol Chem**, v. 280, n. 40, p. 34210-7, Oct 7 2005.
- BAILEY, C. M.; KHALKHALI-ELLIS, Z.; SEFTOR, E. A.; HENDRIX, M. J. Biological functions of maspin. **J Cell Physiol**, v. 209, n. 3, p. 617-24, Dec 2006.
- BARTUSKI, A. J.; KAMACHI, Y.; SCHICK, C.; OVERHAUSER, J.; SILVERMAN, G. A. Cytoplasmic antiproteinase 2 (PI8) and bomapin (PI10) map to the serpin cluster at 18q21.3. **Genomics**, v. 43, n. 3, p. 321-8, Aug 1 1997.
- BIRD, C. H.; BLINK, E. J.; HIRST, C. E.; BUZZA, M. S.; STEELE, P. M.; SUN, J.; JANS, D. A.; BIRD, P. I. Nucleocytoplasmic distribution of the ovalbumin serpin PI-9 requires a nonconventional nuclear import pathway and the export factor Crm1. **Mol Cell Biol**, v. 21, n. 16, p. 5396-407, Aug 2001.
- BISCHOFF, F. R.; PONSTINGL, H. Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1. **Nature**, v. 354, n. 6348, p. 80-2, Nov 7 1991.

¹ De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS.

NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

BLACQUE, O. E.; WORRALL, D. M. Evidence for a direct interaction between the tumor suppressor serpin, maspin, and types I and III collagen. **J Biol Chem**, v. 277, n. 13, p. 10783-8, Mar 29 2002.

BLANDAMURA, S.; D'ALESSANDRO, E.; GIACOMELLI, L.; GUZZARDO, V.; BATTANELLO, W.; REPELE, M.; NINFO, V. Expression of maspin in papillary Ta/T1 bladder neoplasms. **Anticancer Res**, v. 28, n. 1b, p. 471-8, Jan-Feb 2008.

BLANK, V.; KOURILSKY, P.; ISRAEL, A. Cytoplasmic retention, DNA binding and processing of the NF-kappa B p50 precursor are controlled by a small region in its C-terminus. **EMBO J**, v. 10, n. 13, p. 4159-67, Dec 1991.

BLOM, N.; GAMMELTOFT, S.; BRUNAK, S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. **J Mol Biol**, v. 294, n. 5, p. 1351-62, Dec 17 1999.

BODENSTINE, T. M.; SEFTOR, R. E.; KHALKHALI-ELLIS, Z.; SEFTOR, E. A.; PEMBERTON, P. A.; HENDRIX, M. J. Maspin: molecular mechanisms and therapeutic implications. **Cancer Metastasis Rev**, v. 31, n. 3-4, p. 529-51, Dec 2012.

BODENSTINE, T. M.; SEFTOR, R. E.; SEFTOR, E. A.; KHALKHALI-ELLIS, Z.; SAMII, N. A.; MONARREZ, J. C.; CHANDLER, G. S.; PEMBERTON, P. A.; HENDRIX, M. J. Internalization by multiple endocytic pathways and lysosomal processing impact maspin-based therapeutics. **Mol Cancer Res**, v. 12, n. 10, p. 1480-91, Oct 2014.

BOLTZE, C.; HOANG-VU, C.; SCHNEIDER-STOCK, R.; LEHNERT, H.; ROESSNER, A. [Role of the class II tumor suppressor gene maspin in thyroid carcinogenesis]. **Verh Dtsch Ges Pathol**, v. 88, p. 237-45, 2004.

BOLTZE, C.; SCHNEIDER-STOCK, R.; MEYER, F.; PETERS, B.; QUEDNOW, C.; HOANG-VU, C.; ROESSNER, A. Maspin in thyroid cancer: its relationship with p53 and clinical outcome. **Oncol Rep**, v. 10, n. 6, p. 1783-7, Nov-Dec 2003.

CAGATAY, T.; CHOOK, Y. M. Karyopherins in cancer. **Curr Opin Cell Biol**, v. 52, p. 30-42, Jan 29 2018.

CANSIZOGLU, A. E.; LEE, B. J.; ZHANG, Z. C.; FONTOURA, B. M.; CHOOK, Y. M. Structure-based design of a pathway-specific nuclear import inhibitor. **Nat Struct Mol Biol**, v. 14, n. 5, p. 452-4, May 2007.

CELLA, N.; CONTRERAS, A.; LATHA, K.; ROSEN, J. M.; ZHANG, M. Maspin is physically associated with [beta]1 integrin regulating cell adhesion in mammary epithelial cells. **FASEB J**, v. 20, n. 9, p. 1510-2, Jul 2006.

CHANG, C. W.; COUNAGO, R. M.; WILLIAMS, S. J.; BODEN, M.; KOBE, B. Distinctive conformation of minor site-specific nuclear localization signals bound to importin-alpha. **Traffic**, v. 14, n. 11, p. 1144-54, Nov 2013.

CHEN, C.; HUANG, H.; WU, C. H. Protein Bioinformatics Databases and Resources. **Methods Mol Biol**, v. 1558, p. 3-39, 2017.

CHOOK, Y. M.; BLOBEL, G. Karyopherins and nuclear import. **Curr Opin Struct Biol**, v. 11, n. 6, p. 703-15, Dec 2001.

CHOOK, Y. M.; SUEL, K. E. Nuclear import by karyopherin-betas: recognition and inhibition. **Biochim Biophys Acta**, v. 1813, n. 9, p. 1593-606, Sep 2011.

CHUANG, T. L.; SCHLEEF, R. R. Identification of a nuclear targeting domain in the insertion between helices C and D in protease inhibitor-10. **J Biol Chem**, v. 274, n. 16, p. 11194-8, Apr 16 1999.

CLARKE, P. R.; ZHANG, C. Spatial and temporal coordination of mitosis by Ran GTPase. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 6, p. 464-77, Jun 2008.

COHEN, S.; AU, S.; PANTE, N. Microinjection of *Xenopus laevis* oocytes. **J Vis Exp**, n. 24, Feb 23 2009.

CONTI, E.; UY, M.; LEIGHTON, L.; BLOBEL, G.; KURIYAN, J. Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha. **Cell**, v. 94, n. 2, p. 193-204, Jul 24 1998.

CRONSHAW, J. M.; KRUTCHINSKY, A. N.; ZHANG, W.; CHAIT, B. T.; MATUNIS, M. J. Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. **J Cell Biol**, v. 158, n. 5, p. 915-27, Sep 2 2002.

CROOKS, G. E.; HON, G.; CHANDONIA, J. M.; BRENNER, S. E. WebLogo: a sequence logo generator. **Genome Res**, v. 14, n. 6, p. 1188-90, Jun 2004.

DAWSON, D. W.; VOLPERT, O. V.; GILLIS, P.; CRAWFORD, S. E.; XU, H.; BENEDICT, W.; BOUCK, N. P. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. **Science**, v. 285, n. 5425, p. 245-8, Jul 9 1999.

DEAN, D. A.; STRONG, D. D.; ZIMMER, W. E. Nuclear entry of nonviral vectors. **Gene Ther**, v. 12, n. 11, p. 881-90, Jun 2005.

DEAN, I.; DZINIC, S. H.; BERNARDO, M. M.; ZOU, Y.; KIMLER, V.; LI, X.; KAPLUN, A.; GRANNEMAN, J.; MAO, G.; SHENG, S. The secretion and biological function of tumor suppressor maspin as an exosome cargo protein. **Oncotarget**, v. 8, n. 5, p. 8043-8056, Jan 31 2017.

DIETMAIER, W.; BETTSTETTER, M.; WILD, P. J.; WOENCKHAUS, M.; RUMMELE, P.; HARTMANN, A.; DECHANT, S.; BLASZYK, H.; PAUER, A.; KLINKHAMMER-SCHALKE, M.; HOFSTADTER, F. Nuclear Maspin expression is associated with response to adjuvant 5-

fluorouracil based chemotherapy in patients with stage III colon cancer. **Int J Cancer**, v. 118, n. 9, p. 2247-54, May 01 2006.

DINGWALL, C.; ROBBINS, J.; DILWORTH, S. M.; ROBERTS, B.; RICHARDSON, W. D. The nucleoplasmin nuclear location sequence is larger and more complex than that of SV-40 large T antigen. **J Cell Biol**, v. 107, n. 3, p. 841-9, Sep 1988.

DOMANN, F. E.; RICE, J. C.; HENDRIX, M. J.; FUTSCHER, B. W. Epigenetic silencing of maspin gene expression in human breast cancers. **Int J Cancer**, v. 85, n. 6, p. 805-10, Mar 15 2000.

DUAN, H.; ZHANG, H. J.; YANG, J. Q.; OBERLEY, L. W.; FUTSCHER, B. W.; DOMANN, F. E. MnSOD up-regulates maspin tumor suppressor gene expression in human breast and prostate cancer cells. **Antioxid Redox Signal**, v. 5, n. 5, p. 677-88, Oct 2003.

DUVERGER, E.; ROCHE, A. C.; MONSIGNY, M. N-acetylglucosamine-dependent nuclear import of neoglycoproteins. **Glycobiology**, v. 6, n. 4, p. 381-6, Jun 1996.

DZINIC, S. H.; BERNARDO, M. M.; LI, X.; FERNANDEZ-VALDIVIA, R.; HO, Y. S.; MI, Q. S.; BANDYOPADHYAY, S.; LONARDO, F.; VRANIC, S.; OLIVEIRA, D. S.; BONFIL, R. D.; DYSON, G.; CHEN, K.; OMEROVIC, A.; SHENG, X.; HAN, X.; WU, D.; BI, X.; CABARAVDIC, D.; JAKUPOVIC, U.; WAHBA, M.; PANG, A.; HARAJLI, D.; SAKR, W. A.; SHENG, S. An Essential Role of Maspin in Embryogenesis and Tumor Suppression. **Cancer Res**, v. 77, n. 4, p. 886-896, Feb 15 2017.

DZINIC, S. H.; KAPLUN, A.; LI, X.; BERNARDO, M.; MENG, Y.; DEAN, I.; KRASS, D.; STEMMER, P.; SHIN, N.; LONARDO, F.; SHENG, S. Identification of an intrinsic determinant critical for maspin subcellular localization and function. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e74502, 2013.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Res**, v. 32, n. 5, p. 1792-7, 2004.

EITEL, J. A.; BIJANGI-VISHEHSARAEI, K.; SAADATZADEH, M. R.; BHAVSAR, J. R.; MURPHY, M. P.; POLLOK, K. E.; MAYO, L. D. PTEN and p53 are required for hypoxia induced expression of maspin in glioblastoma cells. **Cell Cycle**, v. 8, n. 6, p. 896-901, Mar 15 2009.

ENDSLEY, M. P.; HU, Y.; DENG, Y.; HE, X.; WAREJCKA, D. J.; TWINING, S. S.; GONIAS, S. L.; ZHANG, M. Maspin, the molecular bridge between the plasminogen activator system and beta1 integrin that facilitates cell adhesion. **J Biol Chem**, v. 286, n. 28, p. 24599-607, Jul 15 2011.

FELDMAN, R. J.; SEMENTCHENKO, V. I.; GAYED, M.; FRAIG, M. M.; WATSON, D. K. Pdef expression in human breast cancer is correlated with invasive potential and altered gene expression. **Cancer Res**, v. 63, n. 15, p. 4626-31, Aug 1 2003.

FISCHER, U.; SUMPTER, V.; SEKINE, M.; SATOH, T.; LUHRMANN, R. Nucleo-cytoplasmic transport of U snRNPs: definition of a nuclear location signal in the Sm core domain that binds a transport receptor independently of the m3G cap. **EMBO J**, v. 12, n. 2, p. 573-83, Feb 1993.

FITZPATRICK, P. A.; WONG, D. T.; BARR, P. J.; PEMBERTON, P. A. Functional implications of the modeled structure of maspin. **Protein Eng**, v. 9, n. 7, p. 585-9, Jul 1996.

FORBES, S. A.; BEARE, D.; BOUTSELAKIS, H.; BAMFORD, S.; BINDAL, N.; TATE, J.; COLE, C. G.; WARD, S.; DAWSON, E.; PONTING, L.; STEFANCSIK, R.; HARSHA, B.; KOK, C. Y.; JIA, M.; JUBB, H.; SONDKA, Z.; THOMPSON, S.; DE, T.; CAMPBELL, P. J. COSMIC: somatic cancer genetics at high-resolution. **Nucleic Acids Res**, v. 45, n. D1, p. D777-D783, Jan 4 2017.

FORNEROD, M.; OHNO, M.; YOSHIDA, M.; MATTAJ, I. W. CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. **Cell**, v. 90, n. 6, p. 1051-60, Sep 19 1997.

FREY, A.; SOUBANI, A. O.; ADAM, A. K.; SHENG, S.; PASS, H. I.; LONARDO, F. Nuclear, compared with combined nuclear and cytoplasmic expression of maspin, is linked in lung adenocarcinoma to reduced VEGF-A levels and in Stage I, improved survival. **Histopathology**, v. 54, n. 5, p. 590-7, Apr 2009.

FRIES, T.; BETZ, C.; SOHN, K.; CAESAR, S.; SCHLENSTEDT, G.; BAILER, S. M. A novel conserved nuclear localization signal is recognized by a group of yeast importins. **J Biol Chem**, v. 282, n. 27, p. 19292-301, Jul 6 2007.

FUNG, C. L.; CHAN, C.; JANKOVA, L.; DENT, O. F.; ROBERTSON, G.; MOLLOY, M.; BOKEY, L.; CHAPUIS, P. H.; LIN, B. P.; CLARKE, S. J. Clinicopathological correlates and prognostic significance of maspin expression in 450 patients after potentially curative resection of node-positive colonic cancer. **Histopathology**, v. 56, n. 3, p. 319-30, Feb 2010.

FUTSCHER, B. W.; OSHIRO, M. M.; WOZNIAK, R. J.; HOLTAN, N.; HANIGAN, C. L.; DUAN, H.; DOMANN, F. E. Role for DNA methylation in the control of cell type specific maspin expression. **Nat Genet**, v. 31, n. 2, p. 175-9, Jun 2002.

GAO, F.; SHI, H. Y.; DAUGHTY, C.; CELLA, N.; ZHANG, M. Maspin plays an essential role in early embryonic development. **Development**, v. 131, n. 7, p. 1479-89, Apr 2004.

GASTEIGER, E.; GATTIKER, A.; HOOGLAND, C.; IVANYI, I.; APPEL, R. D.; BAIROCH, A. ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. **Nucleic Acids Res**, v. 31, n. 13, p. 3784-8, Jul 1 2003.

GOLDFARB, D. S.; CORBETT, A. H.; MASON, D. A.; HARREMAN, M. T.; ADAM, S. A. Importin alpha: a multipurpose nuclear-transport receptor. **Trends Cell Biol**, v. 14, n. 9, p. 505-14, Sep 2004.

GOLEY, E. D.; OHKAWA, T.; MANCUSO, J.; WOODRUFF, J. B.; D'ALESSIO, J. A.; CANDE, W. Z.; VOLKMAN, L. E.; WELCH, M. D. Dynamic nuclear actin assembly by Arp2/3 complex and a baculovirus WASP-like protein. **Science**, v. 314, n. 5798, p. 464-7, Oct 20 2006.

GORLICH, D.; PANTE, N.; KUTAY, U.; AEBI, U.; BISCHOFF, F. R. Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. **EMBO J**, v. 15, n. 20, p. 5584-94, Oct 15 1996.

GORLICH, D.; PREHN, S.; LASKEY, R. A.; HARTMANN, E. Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import. **Cell**, v. 79, n. 5, p. 767-78, Dec 2 1994.

GOULET, B.; CHAN, G.; CHAMBERS, A. F.; LEWIS, J. D. An emerging role for the nuclear localization of maspin in the suppression of tumor progression and metastasis. **Biochem Cell Biol**, v. 90, n. 1, p. 22-38, Feb 2012.

GOULET, B.; KENNETTE, W.; ABLACK, A.; POSTENKA, C. O.; HAGUE, M. N.; MYMRYK, J. S.; TUCK, A. B.; GIGUERE, V.; CHAMBERS, A. F.; LEWIS, J. D. Nuclear localization of maspin is essential for its inhibition of tumor growth and metastasis. **Lab Invest**, v. 91, n. 8, p. 1181-7, Aug 2011.

GROSSMAN, E.; MEDALIA, O.; ZWERGER, M. Functional architecture of the nuclear pore complex. **Annu Rev Biophys**, v. 41, p. 557-84, 2012.

GU, L.; TSUJI, T.; JARBOUI, M. A.; YEO, G. P.; SHEEHY, N.; HALL, W. W.; GAUTIER, V. W. Intermolecular masking of the HIV-1 Rev NLS by the cellular protein HIC: novel insights into the regulation of Rev nuclear import. **Retrovirology**, v. 8, p. 17, Mar 14 2011.

HANOVER, J. A.; LOVE, D. C.; PRINZ, W. A. Calmodulin-driven nuclear entry: trigger for sex determination and terminal differentiation. **J Biol Chem**, v. 284, n. 19, p. 12593-7, May 8 2009.

HE, Y.; ZHANG, L.; LI, Y. J.; YE, F.; JIANG, Y.; JIN, X. M. [Expression of maspin protein and correlation between maspin and P53 proteins in gastric carcinoma]. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**, v. 87, n. 13, p. 909-12, Apr 3 2007.

HOJO, T.; AKIYAMA, Y.; NAGASAKI, K.; MARUYAMA, K.; KIKUCHI, K.; IKEDA, T.; KITAJIMA, M.; YAMAGUCHI, K. Association of maspin expression with the malignancy grade and tumor vascularization in breast cancer tissues. **Cancer Lett**, v. 171, n. 1, p. 103-10, Sep 28 2001.

HOOD, J. K.; SILVER, P. A. In or out? Regulating nuclear transport. **Curr Opin Cell Biol**, v. 11, n. 2, p. 241-7, Apr 1999.

HOPKINS, P. C.; WHISSTOCK, J. Function of maspin. **Science**, v. 265, n. 5180, p. 1893-4, Sep 23 1994.

HORNBECK, P. V.; ZHANG, B.; MURRAY, B.; KORNHAUSER, J. M.; LATHAM, V.; SKRZYPEK, E. PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations. **Nucleic Acids Res**, v. 43, n. Database issue, p. D512-20, Jan 2015.

HU, J.; WANG, F.; YUAN, Y.; ZHU, X.; WANG, Y.; ZHANG, Y.; KOU, Z.; WANG, S.; GAO, S. Novel importin- α family member Kpna7 is required for normal fertility and fecundity in the mouse. **J Biol Chem**, v. 285, n. 43, p. 33113-22, Oct 22 2010.

HUANG DA, W.; SHERMAN, B. T.; LEMPICKI, R. A. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. **Nucleic Acids Res**, v. 37, n. 1, p. 1-13, Jan 2009a.

_____. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. **Nat Protoc**, v. 4, n. 1, p. 44-57, 2009b.

HUANG, H.; HAAR PETERSEN, M.; IBANEZ-VEA, M.; LASSEN, P. S.; LARSEN, M. R.; PALMISANO, G. Simultaneous Enrichment of Cysteine-containing Peptides and Phosphopeptides Using a Cysteine-specific Phosphonate Adaptable Tag (CysPAT) in Combination with titanium dioxide (TiO₂) Chromatography. **Mol Cell Proteomics**, v. 15, n. 10, p. 3282-3296, Oct 2016.

HUBER, J.; CRONSHAGEN, U.; KADOKURA, M.; MARSHALLSAY, C.; WADA, T.; SEKINE, M.; LUHRMANN, R. Snurportin1, an m3G-cap-specific nuclear import receptor with a novel domain structure. **EMBO J**, v. 17, n. 14, p. 4114-26, Jul 15 1998.

HUBER, O.; KORN, R.; MCLAUGHLIN, J.; OHSUGI, M.; HERRMANN, B. G.; KEMLER, R. Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. **Mech Dev**, v. 59, n. 1, p. 3-10, Sep 1996.

ITO, R.; NAKAYAMA, H.; YOSHIDA, K.; ODA, N.; YASUI, W. Loss of maspin expression is associated with development and progression of gastric carcinoma with p53 abnormality. **Oncol Rep**, v. 12, n. 5, p. 985-90, Nov 2004.

ITO, Y.; YOSHIDA, H.; TOMODA, C.; URUNO, T.; TAKAMURA, Y.; MIYA, A.; KOBAYASHI, K.; MATSUZUKA, F.; MATSUURA, N.; KUMA, K.; MIYAUCHI, A. Maspin expression is directly associated with biological aggressiveness of thyroid carcinoma. **Thyroid**, v. 14, n. 1, p. 13-8, Jan 2004.

JIANG, N.; MENG, Y.; ZHANG, S.; MENSAH-OSMAN, E.; SHENG, S. Maspin sensitizes breast carcinoma cells to induced apoptosis. **Oncogene**, v. 21, n. 26, p. 4089-98, Jun 13 2002.

JIANG, W. G.; HISCOX, S.; HORROBIN, D. F.; BRYCE, R. P.; MANSEL, R. E. Gamma linolenic acid regulates expression of maspin and the motility of cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 237, n. 3, p. 639-44, Aug 28 1997.

KALDERON, D.; ROBERTS, B. L.; RICHARDSON, W. D.; SMITH, A. E. A short amino acid sequence able to specify nuclear location. **Cell**, v. 39, n. 3 Pt 2, p. 499-509, Dec 1984.

KAMEI, Y.; YUBA, S.; NAKAYAMA, T.; YONEDA, Y. Three distinct classes of the alpha-subunit of the nuclear pore-targeting complex (importin-alpha) are differentially expressed in adult mouse tissues. **J Histochem Cytochem**, v. 47, n. 3, p. 363-72, Mar 1999.

KAPLUN, A.; DZINIC, S.; BERNARDO, M.; SHENG, S. Tumor suppressor maspin as a rheostat in HDAC regulation to achieve the fine-tuning of epithelial homeostasis. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr**, v. 22, n. 3, p. 249-58, 2012.

KATAGIRI, C.; NAKANISHI, J.; KADOYA, K.; HIBINO, T. Serpin squamous cell carcinoma antigen inhibits UV-induced apoptosis via suppression of c-JUN NH2-terminal kinase. **J Cell Biol**, v. 172, n. 7, p. 983-90, Mar 27 2006.

KELLEY, J. B.; TALLEY, A. M.; SPENCER, A.; GIOELI, D.; PASCHAL, B. M. Karyopherin alpha7 (KPNA7), a divergent member of the importin alpha family of nuclear import receptors. **BMC Cell Biol**, v. 11, p. 63, Aug 11 2010.

KHALKHALI-ELLIS, Z.; CHRISTIAN, A. L.; KIRSCHMANN, D. A.; EDWARDS, E. M.; REZAIE-THOMPSON, M.; VASEF, M. A.; GRUMAN, L. M.; SEFTOR, R. E.; NORWOOD, L. E.; HENDRIX, M. J. Regulating the tumor suppressor gene maspin in breast cancer cells: a potential mechanism for the anticancer properties of tamoxifen. **Clin Cancer Res**, v. 10, n. 2, p. 449-54, Jan 15 2004.

KHALKHALI-ELLIS, Z.; HENDRIX, M. J. Nitric oxide regulation of maspin expression in normal mammary epithelial and breast cancer cells. **Am J Pathol**, v. 162, n. 5, p. 1411-7, May 2003.

_____. Elucidating the function of secreted maspin: inhibiting cathepsin D-mediated matrix degradation. **Cancer Res**, v. 67, n. 8, p. 3535-9, Apr 15 2007.

KIM, D. H.; YOON, D. S.; DOOLEY, W. C.; NAM, E. S.; RYU, J. W.; JUNG, K. C.; PARK, H. R.; SOHN, J. H.; SHIN, H. S.; PARK, Y. E. Association of maspin expression with the high histological grade and lymphocyte-rich stroma in early-stage breast cancer. **Histopathology**, v. 42, n. 1, p. 37-42, Jan 2003.

KIM, K.; HAY, E. D. New evidence that nuclear import of endogenous beta-catenin is LEF-1 dependent, while LEF-1 independent import of exogenous beta-catenin leads to nuclear abnormalities. **Cell Biol Int**, v. 25, n. 11, p. 1149-61, 2001.

KIM, S.; HAN, J.; KIM, J.; PARK, C. Maspin expression is transactivated by p63 and is critical for the modulation of lung cancer progression. **Cancer Res**, v. 64, n. 19, p. 6900-5, Oct 1 2004.

KIM, S. M.; CHO, S. J.; JANG, W. Y.; KIM, D. H.; SHIN, H. S.; JANG, M. K.; KIM, H. Y.; NAM, E. S. Expression of maspin is associated with the intestinal type of gastric adenocarcinoma. **Cancer Res Treat**, v. 37, n. 4, p. 228-32, Aug 2005.

KIMURA, M.; IMAMOTO, N. Biological significance of the importin-beta family-dependent nucleocytoplasmic transport pathways. **Traffic**, v. 15, n. 7, p. 727-48, Jul 2014.

KIMURA, M.; KOSE, S.; OKUMURA, N.; IMAI, K.; FURUTA, M.; SAKIYAMA, N.; TOMII, K.; HORTON, P.; TAKAO, T.; IMAMOTO, N. Identification of cargo proteins specific for the nucleocytoplasmic transport carrier transportin by combination of an in vitro transport system and stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC)-based quantitative proteomics. **Mol Cell Proteomics**, v. 12, n. 1, p. 145-57, Jan 2013.

KISKER, O.; ONIZUKA, S.; BANYARD, J.; KOMIYAMA, T.; BECKER, C. M.; ACHILLES, E. G.; BARNES, C. M.; O'REILLY, M. S.; FOLKMAN, J.; PIRIE-SHEPHERD, S. R. Generation of multiple angiogenesis inhibitors by human pancreatic cancer. **Cancer Res**, v. 61, n. 19, p. 7298-304, Oct 1 2001.

KOBE, B. Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin alpha. **Nat Struct Biol**, v. 6, n. 4, p. 388-97, Apr 1999.

KOHLER, M.; FIEBELER, A.; HARTWIG, M.; THIEL, S.; PREHN, S.; KETTRITZ, R.; LUFT, F. C.; HARTMANN, E. Differential expression of classical nuclear transport factors during cellular proliferation and differentiation. **Cell Physiol Biochem**, v. 12, n. 5-6, p. 335-44, 2002.

KOHLER, M.; SPECK, C.; CHRISTIANSEN, M.; BISCHOFF, F. R.; PREHN, S.; HALLER, H.; GORLICH, D.; HARTMANN, E. Evidence for distinct substrate specificities of importin alpha family members in nuclear protein import. **Mol Cell Biol**, v. 19, n. 11, p. 7782-91, Nov 1999.

KOSUGI, S.; HASEBE, M.; TOMITA, M.; YANAGAWA, H. Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 25, p. 10171-6, Jun 23 2009.

KREBS, J.; MUELLER-ROEBER, B.; RUZICIC, S. A novel bipartite nuclear localization signal with an atypically long linker in DOF transcription factors. **J Plant Physiol**, v. 167, n. 7, p. 583-6, May 1 2010.

KUBLUN, I.; EHM, P.; BREHM, M. A.; NALASKOWSKI, M. M. Efficacious inhibition of Importin alpha/beta-mediated nuclear import of human inositol phosphate multikinase. **Biochimie**, v. 102, p. 117-23, Jul 2014.

KUTAY, U.; GUTTINGER, S. Leucine-rich nuclear-export signals: born to be weak. **Trends Cell Biol**, v. 15, n. 3, p. 121-4, Mar 2005.

LAM, Y. W.; YUAN, Y.; ISAAC, J.; BABU, C. V.; MELLER, J.; HO, S. M. Comprehensive identification and modified-site mapping of S-nitrosylated targets in prostate epithelial cells. **PLoS One**, v. 5, n. 2, p. e9075, Feb 5 2010.

LANGE, A.; MCLANE, L. M.; MILLS, R. E.; DEVINE, S. E.; CORBETT, A. H. Expanding the definition of the classical bipartite nuclear localization signal. **Traffic**, v. 11, n. 3, p. 311-23, Mar 2010.

LATHA, K.; ZHANG, W.; CELLA, N.; SHI, H. Y.; ZHANG, M. Maspin mediates increased tumor cell apoptosis upon induction of the mitochondrial permeability transition. **Mol Cell Biol**, v. 25, n. 5, p. 1737-48, Mar 2005.

LAW, R. H.; IRVING, J. A.; BUCKLE, A. M.; RUZYLA, K.; BUZZA, M.; BASHTANNYK-PUHALOVICH, T. A.; BEDDOE, T. C.; NGUYEN, K.; WORRALL, D. M.; BOTTOMLEY, S. P.; BIRD, P. I.; ROSSJOHN, J.; WHISSTOCK, J. C. The high resolution crystal structure of the human tumor suppressor maspin reveals a novel conformational switch in the G-helix. **J Biol Chem**, v. 280, n. 23, p. 22356-64, Jun 10 2005.

LEE, B. J.; CANSIZOGLU, A. E.; SUEL, K. E.; LOUIS, T. H.; ZHANG, Z.; CHOOK, Y. M. Rules for nuclear localization sequence recognition by karyopherin beta 2. **Cell**, v. 126, n. 3, p. 543-58, Aug 11 2006.

LEE, M. J.; SUH, C. H.; LI, Z. H. Clinicopathological significance of maspin expression in breast cancer. **J Korean Med Sci**, v. 21, n. 2, p. 309-14, Apr 2006.

LI, J. J.; COLBURN, N. H.; OBERLEY, L. W. Maspin gene expression in tumor suppression induced by overexpressing manganese-containing superoxide dismutase cDNA in human breast cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 19, n. 5, p. 833-9, May 1998.

LI, X.; YIN, S.; MENG, Y.; SAKR, W.; SHENG, S. Endogenous inhibition of histone deacetylase 1 by tumor-suppressive maspin. **Cancer Res**, v. 66, n. 18, p. 9323-9, Sep 15 2006.

LIU, H.; NAISMITH, J. H. An efficient one-step site-directed deletion, insertion, single and multiple-site plasmid mutagenesis protocol. **BMC Biotechnol**, v. 8, p. 91, Dec 4 2008.

LIU, Z.; SHI, H. Y.; NAWAZ, Z.; ZHANG, M. Tamoxifen induces the expression of maspin through estrogen receptor-alpha. **Cancer Lett**, v. 209, n. 1, p. 55-65, Jun 8 2004.

LOCKETT, J.; YIN, S.; LI, X.; MENG, Y.; SHENG, S. Tumor suppressive maspin and epithelial homeostasis. **J Cell Biochem**, v. 97, n. 4, p. 651-60, Mar 1 2006.

LONARDO, F.; LI, X.; SIDDIQ, F.; SINGH, R.; AL-ABBADI, M.; PASS, H. I.; SHENG, S. Maspin nuclear localization is linked to favorable morphological features in pulmonary adenocarcinoma. **Lung Cancer**, v. 51, n. 1, p. 31-9, Jan 2006.

LOTT, K.; BHARDWAJ, A.; SIMS, P. J.; CINGOLANI, G. A minimal nuclear localization signal (NLS) in human phospholipid scramblase 4 that binds only the minor NLS-binding site of importin alpha1. **J Biol Chem**, v. 286, n. 32, p. 28160-9, Aug 12 2011.

LU, M.; ZAK, J.; CHEN, S.; SANCHEZ-PULIDO, L.; SEVERSON, D. T.; ENDICOTT, J.; PONTING, C. P.; SCHOFIELD, C. J.; LU, X. A code for RanGDP binding in ankyrin repeats defines a nuclear import pathway. **Cell**, v. 157, n. 5, p. 1130-45, May 22 2014.

LUMPKIN, R. J.; GU, H.; ZHU, Y.; LEONARD, M.; AHMAD, A. S.; CLAUSER, K. R.; MEYER, J. G.; BENNETT, E. J.; KOMIVES, E. A. Site-specific identification and quantitation of endogenous SUMO modifications under native conditions. **Nat Commun**, v. 8, n. 1, p. 1171, Oct 27 2017.

LUNDBY, A.; LAGE, K.; WEINERT, B. T.; BEKKER-JENSEN, D. B.; SECHER, A.; SKOVGAARD, T.; KELSTRUP, C. D.; DMYTRIYEV, A.; CHOUDHARY, C.; LUNDBY, C.; OLSEN, J. V. Proteomic analysis of lysine acetylation sites in rat tissues reveals organ specificity and subcellular patterns. **Cell Rep**, v. 2, n. 2, p. 419-31, Aug 30 2012.

LUO, J. L.; TAN, W.; RICONO, J. M.; KORCHYNSKYI, O.; ZHANG, M.; GONIAS, S. L.; CHERESH, D. A.; KARIN, M. Nuclear cytokine-activated IKKalpha controls prostate cancer metastasis by repressing Maspin. **Nature**, v. 446, n. 7136, p. 690-4, Apr 5 2007.

MAASS, N.; BIALLEK, M.; ROSEL, F.; SCHEM, C.; OHIKE, N.; ZHANG, M.; JONAT, W.; NAGASAKI, K. Hypermethylation and histone deacetylation lead to silencing of the maspin gene in human breast cancer. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 297, n. 1, p. 125-8, Sep 13 2002.

MAASS, N.; NAGASAKI, K.; ZIEBART, M.; MUNDHENKE, C.; JONAT, W. Expression and regulation of tumor suppressor gene maspin in breast cancer. **Clin Breast Cancer**, v. 3, n. 4, p. 281-7, Oct 2002.

MAASS, N.; TEFFNER, M.; ROSEL, F.; PAWARESCH, R.; JONAT, W.; NAGASAKI, K.; RUDOLPH, P. Decline in the expression of the serine proteinase inhibitor maspin is associated with tumour progression in ductal carcinomas of the breast. **J Pathol**, v. 195, n. 3, p. 321-6, Oct 2001.

MACHOWSKA, M.; WACHOWICZ, K.; SOPEL, M.; RZEPECKI, R. Nuclear location of tumor suppressor protein maspin inhibits proliferation of breast cancer cells without affecting proliferation of normal epithelial cells. **BMC Cancer**, v. 14, p. 142, Feb 28 2014.

MACHTENS, S.; KUCZYK, M.; SERTH, J.; JONAS, U. P53 regulated maspin protein expression determines recurrence-free survival of patients with localised prostate cancer. **Prostate Cancer Prostatic Dis**, v. 3, n. S1, p. S27, Dec 2000.

MAEKAWA, T.; SANO, Y.; SHINAGAWA, T.; RAHMAN, Z.; SAKUMA, T.; NOMURA, S.; LICHT, J. D.; ISHII, S. ATF-2 controls transcription of Maspin and GADD45 alpha genes independently from p53 to suppress mammary tumors. **Oncogene**, v. 27, n. 8, p. 1045-54, Feb 14 2008.

MAERTENS, G. N.; COOK, N. J.; WANG, W.; HARE, S.; GUPTA, S. S.; OZTOP, I.; LEE, K.; PYE, V. E.; COSNEFROY, O.; SNIJDERS, A. P.; KEWALRAMANI, V. N.; FASSATI, A.;

ENGELMAN, A.; CHEREPANOV, P. Structural basis for nuclear import of splicing factors by human Transportin 3. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 7, p. 2728-33, Feb 18 2014.

MAHAJAN, N.; SHI, H. Y.; LUKAS, T. J.; ZHANG, M. Tumor-suppressive maspin functions as a reactive oxygen species scavenger: importance of cysteine residues. **J Biol Chem**, v. 288, n. 16, p. 11611-20, Apr 19 2013.

MARFORI, M.; MYNOTT, A.; ELLIS, J. J.; MEHDI, A. M.; SAUNDERS, N. F.; CURMI, P. M.; FORWOOD, J. K.; BODEN, M.; KOBE, B. Molecular basis for specificity of nuclear import and prediction of nuclear localization. **Biochim Biophys Acta**, v. 1813, n. 9, p. 1562-77, Sep 2011.

MARG, A.; SHAN, Y.; MEYER, T.; MEISSNER, T.; BRANDENBURG, M.; VINKEMEIER, U. Nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins Nup153 and Nup214 and CRM1-dependent nuclear export control the subcellular distribution of latent Stat1. **J Cell Biol**, v. 165, n. 6, p. 823-33, Jun 21 2004.

MARIONI, G.; BLANDAMURA, S.; GIACOMELLI, L.; CALGARO, N.; SEGATO, P.; LEO, G.; FISCHETTO, D.; STAFFIERI, A.; DE FILIPPIS, C. Nuclear expression of maspin is associated with a lower recurrence rate and a longer disease-free interval after surgery for squamous cell carcinoma of the larynx. **Histopathology**, v. 46, n. 5, p. 576-82, May 2005.

MARIONI, G.; BLANDAMURA, S.; LIONELLO, M.; GIACOMELLI, L.; STAFFIERI, C.; FASANARO, E.; MANZATO, E.; STAFFIERI, A. Nuclear MASPIN expression relates to a better prognosis in elderly patients with laryngeal carcinoma. **Acta Otolaryngol**, v. 131, n. 11, p. 1220-5, Nov 2011.

MARIONI, G.; D'ALESSANDRO, E.; GIACOMELLI, L.; DE FILIPPIS, C.; CALGARO, N.; SARI, M.; STAFFIERI, A.; BLANDAMURA, S. Maspin nuclear localization is related to reduced density of tumour-associated micro-vessels in laryngeal carcinoma. **Anticancer Res**, v. 26, n. 6c, p. 4927-32, Nov-Dec 2006.

MARIONI, G.; GIACOMELLI, L.; D'ALESSANDRO, E.; MARCHESE-RAGONA, R.; STAFFIERI, C.; FERRARO, S. M.; STAFFIERI, A.; BLANDAMURA, S. Nuclear localization of mammary serine protease inhibitor (MASPIN): is its impact on the prognosis in laryngeal carcinoma due to a proapoptotic effect? **Am J Otolaryngol**, v. 29, n. 3, p. 156-62, May-Jun 2008.

MARIONI, G.; STAFFIERI, A.; BERTOLIN, A.; GIACOMELLI, L.; D'ALESSANDRO, E.; OTTAVIANO, G.; ACCORDI, D.; STRAMARE, R.; DE FILIPPIS, C.; BLANDAMURA, S. Laryngeal carcinoma lymph node metastasis and disease-free survival correlate with MASPIN nuclear expression but not with EGFR expression: a series of 108 cases. **Eur Arch Otorhinolaryngol**, v. 267, n. 7, p. 1103-10, Jul 2010.

MARIONI, G.; STAFFIERI, C.; STAFFIERI, A.; DE FILIPPIS, C.; BLANDAMURA, S. MASPIN tumour-suppressing activity in head and neck squamous cell carcinoma: emerging evidence and therapeutic perspectives. **Acta Otolaryngol**, v. 129, n. 5, p. 476-80, May 2009.

MARKL, B.; ARNHOLDT, H. M.; JAHNIG, H.; SCHENKIRSCH, G.; HERRMANN, R. A.; HAUDE, K.; SPATZ, H.; ANTHUBER, M.; SCHLIMOK, G.; ORUZIO, D. Shift from cytoplasmic to nuclear maspin expression correlates with shorter overall survival in node-negative colorectal cancer. **Hum Pathol**, v. 41, n. 7, p. 1024-33, Jul 2010.

MARTINOLI, C.; GANDINI, S.; LUISE, C.; MAZZAROL, G.; CONFALONIERI, S.; GIUSEPPE PELICCI, P.; TESTORI, A.; FERRUCCI, P. F. Maspin expression and melanoma progression: a matter of sub-cellular localization. **Mod Pathol**, v. 27, n. 3, p. 412-9, Mar 2014.

MATSUURA, Y.; STEWART, M. Structural basis for the assembly of a nuclear export complex. **Nature**, v. 432, n. 7019, p. 872-7, Dec 16 2004.

MERTINS, P.; YANG, F.; LIU, T.; MANI, D. R.; PETYUK, V. A.; GILLETTE, M. A.; CLAUSER, K. R.; QIAO, J. W.; GRITSENKO, M. A.; MOORE, R. J.; LEVINE, D. A.; TOWNSEND, R.; ERDMANN-GILMORE, P.; SNIDER, J. E.; DAVIES, S. R.; RUGGLES, K. V.; FENYO, D.; KITCHENS, R. T.; LI, S.; OLVERA, N.; DAO, F.; RODRIGUEZ, H.; CHAN, D. W.; LIEBLER, D.; WHITE, F.; RODLAND, K. D.; MILLS, G. B.; SMITH, R. D.; PAULOVICH, A. G.; ELLIS, M.; CARR, S. A. Ischemia in tumors induces early and sustained phosphorylation changes in stress kinase pathways but does not affect global protein levels. **Mol Cell Proteomics**, v. 13, n. 7, p. 1690-704, Jul 2014.

MIKUS, P.; URANO, T.; LILJESTROM, P.; NY, T. Plasminogen-activator inhibitor type 2 (PAI-2) is a spontaneously polymerising SERPIN. Biochemical characterisation of the recombinant intracellular and extracellular forms. **Eur J Biochem**, v. 218, n. 3, p. 1071-82, Dec 15 1993.

MIYAMOTO, Y.; YAMADA, K.; YONEDA, Y. Importin alpha: a key molecule in nuclear transport and non-transport functions. **J Biochem**, v. 160, n. 2, p. 69-75, Aug 2016.

MOHSIN, S. K.; ZHANG, M.; CLARK, G. M.; CRAIG ALLRED, D. Maspin expression in invasive breast cancer: association with other prognostic factors. **J Pathol**, v. 199, n. 4, p. 432-5, Apr 2003.

MONSIGNY, M.; RONDANINO, C.; DUVERGER, E.; FAJAC, I.; ROCHE, A. C. Glyco-dependent nuclear import of glycoproteins, glycoplexes and glycosylated plasmids. **Biochim Biophys Acta**, v. 1673, n. 1-2, p. 94-103, Jul 6 2004.

MOROIANU, J.; BLOBEL, G.; RADU, A. The binding site of karyopherin alpha for karyopherin beta overlaps with a nuclear localization sequence. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 13, p. 6572-6, Jun 25 1996a.

_____. Nuclear protein import: Ran-GTP dissociates the karyopherin alphabeta heterodimer by displacing alpha from an overlapping binding site on beta. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 14, p. 7059-62, Jul 9 1996b.

NAKASHIMA, T.; PAK, S. C.; SILVERMAN, G. A.; SPRING, P. M.; FREDERICK, M. J.; CLAYMAN, G. L. Genomic cloning, mapping, structure and promoter analysis of HEADPIN, a serpin which is down-regulated in head and neck cancer cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 1492, n. 2-3, p. 441-6, Jul 24 2000.

NARAYAN, M.; MIRZA, S. P.; TWINING, S. S. Identification of phosphorylation sites on extracellular corneal epithelial cell maspin. **Proteomics**, v. 11, n. 8, p. 1382-90, Apr 2011.

NARAYAN, M.; TWINING, S. Focus on molecules: maspin. **Exp Eye Res**, v. 90, n. 1, p. 2-3, Jan 2010.

NAWATA, S.; SHI, H. Y.; SUGINO, N.; ZHANG, M. Evidence of post-translational modification of the tumor suppressor maspin under oxidative stress. **Int J Mol Med**, v. 27, n. 2, p. 249-54, Feb 2011.

NGAMKITIDECHAKUL, C.; BURKE, J. M.; O'BRIEN, W. J.; TWINING, S. S. Maspin: synthesis by human cornea and regulation of in vitro stromal cell adhesion to extracellular matrix. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 42, n. 13, p. 3135-41, Dec 2001.

NGAMKITIDECHAKUL, C.; WAREJCKA, D. J.; BURKE, J. M.; O'BRIEN, W. J.; TWINING, S. S. Sufficiency of the reactive site loop of maspin for induction of cell-matrix adhesion and inhibition of cell invasion. Conversion of ovalbumin to a maspin-like molecule. **J Biol Chem**, v. 278, n. 34, p. 31796-806, Aug 22 2003.

NIKOLAEV, A. Y.; LI, M.; PUSKAS, N.; QIN, J.; GU, W. Parc: a cytoplasmic anchor for p53. **Cell**, v. 112, n. 1, p. 29-40, Jan 10 2003.

ODERO-MARAH, V. A.; KHALKHALI-ELLIS, Z.; SCHNEIDER, G. B.; SEFTOR, E. A.; SEFTOR, R. E.; KOLAND, J. G.; HENDRIX, M. J. Tyrosine phosphorylation of maspin in normal mammary epithelia and breast cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 295, n. 4, p. 800-5, Jul 26 2002.

OHKAWA, T.; VOLKMAN, L. E.; WELCH, M. D. Actin-based motility drives baculovirus transit to the nucleus and cell surface. **J Cell Biol**, v. 190, n. 2, p. 187-95, Jul 26 2010.

OLSEN, J. V.; VERMEULEN, M.; SANTAMARIA, A.; KUMAR, C.; MILLER, M. L.; JENSEN, L. J.; GNAD, F.; COX, J.; JENSEN, T. S.; NIGG, E. A.; BRUNAK, S.; MANN, M. Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis. **Sci Signal**, v. 3, n. 104, p. ra3, Jan 12 2010.

ONISCHENKO, E.; WEIS, K. Nuclear pore complex-a coat specifically tailored for the nuclear envelope. **Curr Opin Cell Biol**, v. 23, n. 3, p. 293-301, Jun 2011.

OSHIRO, M. M.; WATTS, G. S.; WOZNIAK, R. J.; JUNK, D. J.; MUNOZ-RODRIGUEZ, J. L.; DOMANN, F. E.; FUTSCHER, B. W. Mutant p53 and aberrant cytosine methylation cooperate to silence gene expression. **Oncogene**, v. 22, n. 23, p. 3624-34, Jun 5 2003.

PAINE, P. L.; FELDHERR, C. M. Nucleocytoplasmic exchange of macromolecules. **Exp Cell Res**, v. 74, n. 1, p. 81-98, Sep 1972.

PAINE, P. L.; MOORE, L. C.; HOROWITZ, S. B. Nuclear envelope permeability. **Nature**, v. 254, n. 5496, p. 109-14, Mar 13 1975.

PANTÉ, N. Use of Intact Xenopus Oocytes in Nucleocytoplasmic Transport Studies. p. 301-314, 2006.

PANTE, N.; KANN, M. Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm. **Mol Biol Cell**, v. 13, n. 2, p. 425-34, Feb 2002.

PATEL, V. P.; CHU, C. T. Nuclear transport, oxidative stress, and neurodegeneration. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 4, n. 3, p. 215-29, Mar 2011.

PEMBERTON, P. A.; TIPTON, A. R.; PAVLOFF, N.; SMITH, J.; ERICKSON, J. R.; MOUCHABECK, Z. M.; KIEFER, M. C. Maspin is an intracellular serpin that partitions into secretory vesicles and is present at the cell surface. **J Histochem Cytochem**, v. 45, n. 12, p. 1697-706, Dec 1997.

PEMBERTON, P. A.; WONG, D. T.; GIBSON, H. L.; KIEFER, M. C.; FITZPATRICK, P. A.; SAGER, R.; BARR, P. J. The tumor suppressor maspin does not undergo the stressed to relaxed transition or inhibit trypsin-like serine proteases. Evidence that maspin is not a protease inhibitory serpin. **J Biol Chem**, v. 270, n. 26, p. 15832-7, Jun 30 1995.

PERRY, R. B.; DORON-MANDEL, E.; IAVNILOVITCH, E.; RISHAL, I.; DAGAN, S. Y.; TSOORY, M.; COPPOLA, G.; MCDONALD, M. K.; GOMES, C.; GESCHWIND, D. H.; TWISS, J. L.; YARON, A.; FAENZILBER, M. Subcellular knockout of importin beta1 perturbs axonal retrograde signaling. **Neuron**, v. 75, n. 2, p. 294-305, Jul 26 2012.

PUMROY, R. A.; NARDOZZI, J. D.; HART, D. J.; ROOT, M. J.; CINGOLANI, G. Nucleoporin Nup50 stabilizes closed conformation of armadillo repeat 10 in importin alpha5. **J Biol Chem**, v. 287, n. 3, p. 2022-31, Jan 13 2012.

QIN, L.; ZHANG, M. Maspin regulates endothelial cell adhesion and migration through an integrin signaling pathway. **J Biol Chem**, v. 285, n. 42, p. 32360-9, Oct 15 2010.

QUENSEL, C.; FRIEDRICH, B.; SOMMER, T.; HARTMANN, E.; KOHLER, M. In vivo analysis of importin alpha proteins reveals cellular proliferation inhibition and substrate specificity. **Mol Cell Biol**, v. 24, n. 23, p. 10246-55, Dec 2004.

RADU, A.; MOORE, M. S.; BLOBEL, G. The peptide repeat domain of nucleoporin Nup98 functions as a docking site in transport across the nuclear pore complex. **Cell**, v. 81, n. 2, p. 215-22, Apr 21 1995.

REICHELT, R.; HOLZENBURG, A.; BUHLE, E. L., JR.; JARNIK, M.; ENGEL, A.; AEBI, U. Correlation between structure and mass distribution of the nuclear pore complex and of distinct pore complex components. **J Cell Biol**, v. 110, n. 4, p. 883-94, Apr 1990.

RONDANINO, C.; BOUSSER, M. T.; MONSIGNY, M.; ROCHE, A. C. Sugar-dependent nuclear import of glycosylated proteins in living cells. **Glycobiology**, v. 13, n. 7, p. 509-19, Jul 2003.

ROTH, D. M.; MOSELEY, G. W.; GLOVER, D.; POUTON, C. W.; JANS, D. A. A microtubule-facilitated nuclear import pathway for cancer regulatory proteins. **Traffic**, v. 8, n. 6, p. 673-86, Jun 2007.

ROTH, D. M.; MOSELEY, G. W.; POUTON, C. W.; JANS, D. A. Mechanism of microtubule-facilitated "fast track" nuclear import. **J Biol Chem**, v. 286, n. 16, p. 14335-51, Apr 22 2011.

SAGER, R.; SHENG, S.; ANISOWICZ, A.; SOTIROPOULOU, G.; ZOU, Z.; STENMAN, G.; SWISSHELM, K.; CHEN, Z.; HENDRIX, M. J.; PEMBERTON, P.; ET AL. RNA genetics of breast cancer: maspin as paradigm. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v. 59, p. 537-46, 1994.

SASAKI, Y.; HAGIWARA, K.; KAKISAKA, M.; YAMADA, K.; MURAKAMI, T.; AIDA, Y. Importin alpha3/Qip1 is involved in multiplication of mutant influenza virus with alanine mutation at amino acid 9 independently of nuclear transport function. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e55765, 2013.

SCHAEFER, J. S.; SABHERWAL, Y.; SHI, H. Y.; SRIRAMAN, V.; RICHARDS, J.; MINELLA, A.; TURNER, D. P.; WATSON, D. K.; ZHANG, M. Transcriptional regulation of p21/CIP1 cell cycle inhibitor by PDEF controls cell proliferation and mammary tumor progression. **J Biol Chem**, v. 285, n. 15, p. 11258-69, Apr 9 2010.

SCOTT, F. L.; EYRE, H. J.; LIOUMI, M.; RAGOISSIS, J.; IRVING, J. A.; SUTHERLAND, G. A.; BIRD, P. I. Human ovalbumin serpin evolution: phylogenetic analysis, gene organization, and identification of new PI8-related genes suggest that two interchromosomal and several intrachromosomal duplications generated the gene clusters at 18q21-q23 and 6p25. **Genomics**, v. 62, n. 3, p. 490-9, Dec 15 1999.

SEFTOR, R. E.; SEFTOR, E. A.; SHENG, S.; PEMBERTON, P. A.; SAGER, R.; HENDRIX, M. J. maspin suppresses the invasive phenotype of human breast carcinoma. **Cancer Res**, v. 58, n. 24, p. 5681-5, Dec 15 1998.

SHAO, Z. M.; RADZISZEWSKI, W. J.; BARSKY, S. H. Tamoxifen enhances myoepithelial cell suppression of human breast carcinoma progression in vitro by two different effector mechanisms. **Cancer Lett**, v. 157, n. 2, p. 133-44, Sep 1 2000.

SHARMA, G.; MIRZA, S.; PARSHAD, R.; SRIVASTAVA, A.; GUPTA, S. D.; PANDYA, P.; RALHAN, R. Clinical significance of Maspin promoter methylation and loss of its protein

expression in invasive ductal breast carcinoma: correlation with VEGF-A and MTA1 expression. **Tumour Biol**, v. 32, n. 1, p. 23-32, Feb 2011.

SHENG, S.; CAREY, J.; SEFTOR, E. A.; DIAS, L.; HENDRIX, M. J.; SAGER, R. Maspin acts at the cell membrane to inhibit invasion and motility of mammary and prostatic cancer cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 21, p. 11669-74, Oct 15 1996.

SHENG, S.; PEMBERTON, P. A.; SAGER, R. Production, purification, and characterization of recombinant maspin proteins. **J Biol Chem**, v. 269, n. 49, p. 30988-93, Dec 9 1994.

SHENG, S.; TRUONG, B.; FREDRICKSON, D.; WU, R.; PARDEE, A. B.; SAGER, R. Tissue-type plasminogen activator is a target of the tumor suppressor gene maspin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 2, p. 499-504, Jan 20 1998.

SHI, H. Y.; LIANG, R.; TEMPLETON, N. S.; ZHANG, M. Inhibition of breast tumor progression by systemic delivery of the maspin gene in a syngeneic tumor model. **Mol Ther**, v. 5, n. 6, p. 755-61, Jun 2002.

SHI, H. Y.; STAFFORD, L. J.; LIU, Z.; LIU, M.; ZHANG, M. Maspin controls mammary tumor cell migration through inhibiting Rac1 and Cdc42, but not the RhoA GTPase. **Cell Motil Cytoskeleton**, v. 64, n. 5, p. 338-46, May 2007.

SHI, H. Y.; ZHANG, J. S.; ZHANG, M. Maspin Is a Multifunctional Tumor-Suppressing Serpin. En: GEIGER, M.; WAHLMÜLLER, F., *et al* (Ed.). **The Serpin Family**. Suiça: Springer International, 2015. cap. 9, p.127-152.

SILVERMAN, G. A.; BARTUSKI, A. J.; CATALTEPE, S.; GORNSTEIN, E. R.; KAMACHI, Y.; SCHICK, C.; UEMURA, Y. SCCA1 and SCCA2 are proteinase inhibitors that map to the serpin cluster at 18q21.3. **Tumour Biol**, v. 19, n. 6, p. 480-7, 1998.

SILVERMAN, G. A.; WHISSTOCK, J. C.; ASKEW, D. J.; PAK, S. C.; LUKE, C. J.; CATALTEPE, S.; IRVING, J. A.; BIRD, P. I. Human clade B serpins (ov-serpins) belong to a cohort of evolutionarily dispersed intracellular proteinase inhibitor clades that protect cells from promiscuous proteolysis. **Cell Mol Life Sci**, v. 61, n. 3, p. 301-25, Feb 2004.

SODERHOLM, J. F.; BIRD, S. L.; KALAB, P.; SAMPATHKUMAR, Y.; HASEGAWA, K.; UEHARA-BINGEN, M.; WEIS, K.; HEALD, R. Importazole, a small molecule inhibitor of the transport receptor importin-beta. **ACS Chem Biol**, v. 6, n. 7, p. 700-8, Jul 15 2011.

SOLOMON, L. A.; MUNKARAH, A. R.; SCHIMP, V. L.; ARABI, M. H.; MORRIS, R. T.; NASSAR, H.; ALI-FEHMI, R. Maspin expression and localization impact on angiogenesis and prognosis in ovarian cancer. **Gynecol Oncol**, v. 101, n. 3, p. 385-9, Jun 2006.

SON, H. J.; SOHN, T. S.; SONG, S. Y.; LEE, J. H.; RHEE, J. C. Maspin expression in human gastric adenocarcinoma. **Pathol Int**, v. 52, n. 8, p. 508-13, Aug 2002.

SONG, S. Y.; LEE, S. K.; KIM, D. H.; SON, H. J.; KIM, H. J.; LIM, Y. J.; LEE, W. Y.; CHUN, H. K.; RHEE, J. C. Expression of maspin in colon cancers: its relationship with p53 expression and microvessel density. **Dig Dis Sci**, v. 47, n. 8, p. 1831-5, Aug 2002.

SONG, S. Y.; SON, H. J.; KIM, M. H.; NAM, E. S.; RHEE, J. C.; PARK, C. Prognostic significance of maspin expression in human gastric adenocarcinoma. **Hepatogastroenterology**, v. 54, n. 75, p. 973-6, Apr-May 2007.

SONIAT, M.; CHOOK, Y. M. Karyopherin-beta2 Recognition of a PY-NLS Variant that Lacks the Proline-Tyrosine Motif. **Structure**, v. 24, n. 10, p. 1802-1809, Oct 4 2016.

SOOD, A. K.; FLETCHER, M. S.; GRUMAN, L. M.; COFFIN, J. E.; JABBARI, S.; KHALKHALI-ELLIS, Z.; ARBOUR, N.; SEFTOR, E. A.; HENDRIX, M. J. The paradoxical expression of maspin in ovarian carcinoma. **Clin Cancer Res**, v. 8, n. 9, p. 2924-32, Sep 2002.

SOPEL, M.; KASPRZYK, I.; BERDOWSKA, I. Maspin and c-erbB-2 expression in correlation with microvessel density in invasive ductal breast cancer. **Folia Histochem Cytobiol**, v. 43, n. 2, p. 109-16, 2005.

STADE, K.; FORD, C. S.; GUTHRIE, C.; WEIS, K. Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. **Cell**, v. 90, n. 6, p. 1041-50, Sep 19 1997.

STARK, A. M.; SCHEM, C.; MAASS, N.; HUGO, H. H.; JONAT, W.; MEHDORN, H. M.; HELD-FEINDT, J. Expression of metastasis suppressor gene maspin is reduced in breast cancer brain metastases and correlates with the estrogen receptor status. **Neurol Res**, v. 32, n. 3, p. 303-8, Apr 2010.

STEWART, M. Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, n. 3, p. 195-208, Mar 2007.

STRAMBIO-DE-CASTILLIA, C.; NIEPEL, M.; ROUT, M. P. The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 11, n. 7, p. 490-501, Jul 2010.

STRIK, M. C.; BLADERGROEN, B. A.; WOUTERS, D.; KISIEL, W.; HOOIJBERG, J. H.; VERLAAN, A. R.; HORDIJK, P. L.; SCHNEIDER, P.; HACK, C. E.; KUMMER, J. A. Distribution of the human intracellular serpin protease inhibitor 8 in human tissues. **J Histochem Cytochem**, v. 50, n. 11, p. 1443-54, Nov 2002.

STROM, A. C.; WEIS, K. Importin-beta-like nuclear transport receptors. **Genome Biol**, v. 2, n. 6, p. REVIEWS3008, 2001.

SWEITZER, T. D.; HANOVER, J. A. Calmodulin activates nuclear protein import: a link between signal transduction and nuclear transport. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 25, p. 14574-9, Dec 10 1996.

TAKEI, Y.; YAMAMOTO, K.; TSUJIMOTO, G. Identification of the sequence responsible for the nuclear localization of human Cdc6. **FEBS Lett**, v. 447, n. 2-3, p. 292-6, Mar 26 1999.

TAMAZATO LONGHI, M.; CELLA, N. Tyrosine phosphorylation plays a role in increasing maspin protein levels and its cytoplasmic accumulation. **FEBS Open Bio**, v. 2, p. 93-7, 2012.

TAMAZATO LONGHI, M.; MAGALHAES, M.; REINA, J.; MORAIS FREITAS, V.; CELLA, N. EGFR Signaling Regulates Maspin/SerpinB5 Phosphorylation and Nuclear Localization in Mammary Epithelial Cells. **PLoS One**, v. 11, n. 7, p. e0159856, 2016.

TAN, S.; DING, K.; LI, R.; ZHANG, W.; LI, G.; KONG, X.; QIAN, P.; LOBIE, P. E.; ZHU, T. Identification of miR-26 as a key mediator of estrogen stimulated cell proliferation by targeting CHD1, GREB1 and KPNA2. **Breast Cancer Res**, v. 16, n. 2, p. R40, Apr 15 2014.

TEDESCO, M.; LA SALA, G.; BARBAGALLO, F.; DE FELICI, M.; FARINI, D. STRA8 shuttles between nucleus and cytoplasm and displays transcriptional activity. **J Biol Chem**, v. 284, n. 51, p. 35781-93, Dec 18 2009.

TEOH, S. S.; VIEUSSEUX, J.; PRAKASH, M.; BERKOWICZ, S.; LUU, J.; BIRD, C. H.; LAW, R. H.; ROSADO, C.; PRICE, J. T.; WHISSTOCK, J. C.; BIRD, P. I. Maspin is not required for embryonic development or tumour suppression. **Nat Commun**, v. 5, p. 3164, 2014.

TERASHIMA, M.; MAESAWA, C.; OYAMA, K.; OHTANI, S.; AKIYAMA, Y.; OGASAWARA, S.; TAKAGANE, A.; SAITO, K.; MASUDA, T.; KANZAKI, N.; MATSUYAMA, S.; HOSHINO, Y.; KOGURE, M.; GOTOH, M.; SHIRANE, M.; MORI, K. Gene expression profiles in human gastric cancer: expression of maspin correlates with lymph node metastasis. **Br J Cancer**, v. 92, n. 6, p. 1130-6, Mar 28 2005.

TIMNEY, B. L.; RAVEH, B.; MIRONSKA, R.; TRIVEDI, J. M.; KIM, S. J.; RUSSEL, D.; WENTE, S. R.; SALI, A.; ROUT, M. P. Simple rules for passive diffusion through the nuclear pore complex. **J Cell Biol**, v. 215, n. 1, p. 57-76, Oct 10 2016.

TRAN, E. J.; BOLGER, T. A.; WENTE, S. R. SnapShot: nuclear transport. **Cell**, v. 131, n. 2, p. 420, Oct 19 2007.

TSAI, C. F.; WANG, Y. T.; YEN, H. Y.; TSOU, C. C.; KU, W. C.; LIN, P. Y.; CHEN, H. Y.; NESVIZHSHKII, A. I.; ISHIHAMA, Y.; CHEN, Y. J. Large-scale determination of absolute phosphorylation stoichiometries in human cells by motif-targeting quantitative proteomics. **Nat Commun**, v. 6, p. 6622, Mar 27 2015.

TSAI, M. M.; HUANG, H. W.; WANG, C. S.; LEE, K. F.; TSAI, C. Y.; LU, P. H.; CHI, H. C.; LIN, Y. H.; KUO, L. M.; LIN, K. H. MicroRNA-26b inhibits tumor metastasis by targeting the KPNA2/c-jun pathway in human gastric cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 26, p. 39511-39526, Jun 28 2016.

TSOLI, E.; TSANTOULIS, P. K.; PAPALAMBROS, A.; PERUNOVIC, B.; ENGLAND, D.; RAWLANDS, D. A.; REYNOLDS, G. M.; VLACHODIMITROPOULOS, D.; MORGAN, S. L.;

- SPILIOPOULOU, C. A.; ATHANASIOU, T.; GORGOULIS, V. G. Simultaneous evaluation of maspin and CXCR4 in patients with breast cancer. **J Clin Pathol**, v. 60, n. 3, p. 261-6, Mar 2007.
- TWYFFELS, L.; GUEYDAN, C.; KRUYSS, V. Transportin-1 and Transportin-2: protein nuclear import and beyond. **FEBS Lett**, v. 588, n. 10, p. 1857-68, May 21 2014.
- UMEKITA, Y.; YOSHIDA, H. Expression of maspin is up-regulated during the progression of mammary ductal carcinoma. **Histopathology**, v. 42, n. 6, p. 541-5, Jun 2003.
- VACIK, J.; DEAN, B. S.; ZIMMER, W. E.; DEAN, D. A. Cell-specific nuclear import of plasmid DNA. **Gene Ther**, v. 6, n. 6, p. 1006-14, Jun 1999.
- WAGSTAFF, K. M.; JANS, D. A. Importins and beyond: non-conventional nuclear transport mechanisms. **Traffic**, v. 10, n. 9, p. 1188-98, Sep 2009.
- WANG, D.; LI, Y.; WU, C.; LIU, Y. PINCH1 is transcriptional regulator in podocytes that interacts with WT1 and represses podocalyxin expression. **PLoS One**, v. 6, n. 2, p. e17048, Feb 24 2011.
- WANG, M. C.; YANG, Y. M.; LI, X. H.; DONG, F.; LI, Y. Maspin expression and its clinicopathological significance in tumorigenesis and progression of gastric cancer. **World J Gastroenterol**, v. 10, n. 5, p. 634-7, Mar 1 2004.
- WANG, P.; PALESE, P.; O'NEILL, R. E. The NPI-1/NPI-3 (karyopherin alpha) binding site on the influenza A virus nucleoprotein NP is a nonconventional nuclear localization signal. **J Virol**, v. 71, n. 3, p. 1850-6, Mar 1997.
- WANG, R.; BRATTAIN, M. G. The maximal size of protein to diffuse through the nuclear pore is larger than 60kDa. **FEBS Lett**, v. 581, n. 17, p. 3164-70, Jul 10 2007.
- WANG, S. E.; NARASANNA, A.; WHITEELL, C. W.; WU, F. Y.; FRIEDMAN, D. B.; ARTEAGA, C. L. Convergence of p53 and transforming growth factor beta (TGFbeta) signaling on activating expression of the tumor suppressor gene maspin in mammary epithelial cells. **J Biol Chem**, v. 282, n. 8, p. 5661-9, Feb 23 2007.
- WEINERT, B. T.; SCHOLZ, C.; WAGNER, S. A.; IESMANTAVICIUS, V.; SU, D.; DANIEL, J. A.; CHOUDHARY, C. Lysine succinylation is a frequently occurring modification in prokaryotes and eukaryotes and extensively overlaps with acetylation. **Cell Rep**, v. 4, n. 4, p. 842-51, Aug 29 2013.
- WHISSTOCK, J. C.; BOTTOMLEY, S. P. Molecular gymnastics: serpin structure, folding and misfolding. **Curr Opin Struct Biol**, v. 16, n. 6, p. 761-8, Dec 2006.
- WHITEHURST, A. W.; WILSBACHER, J. L.; YOU, Y.; LUBY-PHELPS, K.; MOORE, M. S.; COBB, M. H. ERK2 enters the nucleus by a carrier-independent mechanism. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 11, p. 7496-501, May 28 2002.

WILSON, G. L.; DEAN, B. S.; WANG, G.; DEAN, D. A. Nuclear import of plasmid DNA in digitonin-permeabilized cells requires both cytoplasmic factors and specific DNA sequences. **J Biol Chem**, v. 274, n. 31, p. 22025-32, Jul 30 1999.

WOENCKHAUS, M.; BUBENDORF, L.; DALQUEN, P.; FOERSTER, J.; BLASZYK, H.; MIRLACHER, M.; SOLER, M.; DIETMAIER, W.; SAUTER, G.; HARTMANN, A.; WILD, P. J. Nuclear and cytoplasmic Maspin expression in primary non-small cell lung cancer. **J Clin Pathol**, v. 60, n. 5, p. 483-6, May 2007.

WOLF, I.; RUBINFELD, H.; YOON, S.; MARMOR, G.; HANOCH, T.; SEGER, R. Involvement of the activation loop of ERK in the detachment from cytosolic anchoring. **J Biol Chem**, v. 276, n. 27, p. 24490-7, Jul 6 2001.

WOODWARD, C. L.; PRAKOBWANAKIT, S.; MOSESSIAN, S.; CHOW, S. A. Integrase interacts with nucleoporin NUP153 to mediate the nuclear import of human immunodeficiency virus type 1. **J Virol**, v. 83, n. 13, p. 6522-33, Jul 2009.

WU, W. **Unveiling the neglected roles of nucleoprotein NLS2 and cellular vimentin during Influenza A virus infection**. 2014. 215p. Thesis (Doctor of Philosophy). Department of Zoology, The University of British Columbia, Vancouver, BC.

WU, W.; SANKHALA, R. S.; FLORIO, T. J.; ZHOU, L.; NGUYEN, N. L. T.; LOKAREDDY, R. K.; CINGOLANI, G.; PANTE, N. Synergy of two low-affinity NLSs determines the high avidity of influenza A virus nucleoprotein NP for human importin alpha isoforms. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 11381, Sep 12 2017.

WU, W. W.; SUN, Y. H.; PANTE, N. Nuclear import of influenza A viral ribonucleoprotein complexes is mediated by two nuclear localization sequences on viral nucleoprotein. **Virol J**, v. 4, p. 49, Jun 04 2007.

XU, D.; FARMER, A.; CHOOK, Y. M. Recognition of nuclear targeting signals by Karyopherin-beta proteins. **Curr Opin Struct Biol**, v. 20, n. 6, p. 782-90, Dec 2010.

YAMADA, N.; TAMAI, Y.; MIYAMOTO, H.; NOZAKI, M. Cloning and expression of the mouse Pse gene encoding a novel Ets family member. **Gene**, v. 241, n. 2, p. 267-74, Jan 11 2000.

YARBROUGH, M. L.; MATA, M. A.; SAKTHIVEL, R.; FONTOURA, B. M. Viral subversion of nucleocytoplasmic trafficking. **Traffic**, v. 15, n. 2, p. 127-40, Feb 2014.

YASUHARA, N.; OKA, M.; YONEDA, Y. The role of the nuclear transport system in cell differentiation. **Semin Cell Dev Biol**, v. 20, n. 5, p. 590-9, Jul 2009.

YATES, B.; BRASCHI, B.; GRAY, K. A.; SEAL, R. L.; TWEEDIE, S.; BRUFORD, E. A. Genenames.org: the HGNC and VGNC resources in 2017. **Nucleic Acids Res**, v. 45, n. D1, p. D619-D625, Jan 4 2017.

YIN, S.; LI, X.; MENG, Y.; FINLEY, R. L., JR.; SAKR, W.; YANG, H.; REDDY, N.; SHENG, S. Tumor-suppressive maspin regulates cell response to oxidative stress by direct interaction with glutathione S-transferase. **J Biol Chem**, v. 280, n. 41, p. 34985-96, Oct 14 2005.

YIN, S.; LOCKETT, J.; MENG, Y.; BILIRAN, H., JR.; BLOUSE, G. E.; LI, X.; REDDY, N.; ZHAO, Z.; LIN, X.; ANAGLI, J.; CHER, M. L.; SHENG, S. Maspin retards cell detachment via a novel interaction with the urokinase-type plasminogen activator/urokinase-type plasminogen activator receptor system. **Cancer Res**, v. 66, n. 8, p. 4173-81, Apr 15 2006.

YU, M.; ZHENG, H.; TSUNEYAMA, K.; TAKAHASHI, H.; NOMOTO, K.; XU, H.; TAKANO, Y. Paradoxical expression of maspin in gastric carcinomas: correlation with carcinogenesis and progression. **Hum Pathol**, v. 38, n. 8, p. 1248-55, Aug 2007.

YU, X.; HARRIS, S. L.; LEVINE, A. J. The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein. **Cancer Res**, v. 66, n. 9, p. 4795-801, May 1 2006.

ZERBINO, D. R.; ACHUTHAN, P.; AKANNI, W.; AMODE, M. R.; BARRELL, D.; BHAI, J.; BILLIS, K.; CUMMINS, C.; GALL, A.; GIRON, C. G.; GIL, L.; GORDON, L.; HAGGERTY, L.; HASKELL, E.; HOURLIER, T.; IZUOGU, O. G.; JANACEK, S. H.; JUETTEMANN, T.; TO, J. K.; LAIRD, M. R.; LAVIDAS, I.; LIU, Z.; LOVELAND, J. E.; MAUREL, T.; MCLAREN, W.; MOORE, B.; MUDGE, J.; MURPHY, D. N.; NEWMAN, V.; NUHN, M.; OGEH, D.; ONG, C. K.; PARKER, A.; PATRICIO, M.; RIAT, H. S.; SCHUILENBURG, H.; SHEPPARD, D.; SPARROW, H.; TAYLOR, K.; THORMANN, A.; VULLO, A.; WALTS, B.; ZADISSA, A.; FRANKISH, A.; HUNT, S. E.; KOSTADIMA, M.; LANGRIDGE, N.; MARTIN, F. J.; MUFFATO, M.; PERRY, E.; RUFFIER, M.; STAINES, D. M.; TREVANION, S. J.; AKEN, B. L.; CUNNINGHAM, F.; YATES, A.; FLICEK, P. Ensembl 2018. **Nucleic Acids Res**, v. 46, n. D1, p. D754-D761, Jan 4 2018.

ZHANG, M. PTEN in action: coordinating with p53 to regulate maspin gene expression. **Cell Cycle**, v. 8, n. 8, p. 1112-3, Apr 15 2009.

ZHANG, M.; HENDRIX, M. J. C.; PEMBERTON, P. A.; SAKR, W. A.; SHENG, S. An Essential Role of Maspin in Embryogenesis and Tumor Suppression-Response. **Cancer Res**, v. 77, n. 18, p. 5208-5210, Sep 15 2017.

ZHANG, M.; MAASS, N.; MAGIT, D.; SAGER, R. Transactivation through Ets and Ap1 transcription sites determines the expression of the tumor-suppressing gene maspin. **Cell Growth Differ**, v. 8, n. 2, p. 179-86, Feb 1997.

ZHANG, M.; MAGIT, D.; BOTTERI, F.; SHI, H. Y.; HE, K.; LI, M.; FURTH, P.; SAGER, R. Maspin plays an important role in mammary gland development. **Dev Biol**, v. 215, n. 2, p. 278-87, Nov 15 1999.

ZHANG, M.; MAGIT, D.; SAGER, R. Expression of maspin in prostate cells is regulated by a positive ets element and a negative hormonal responsive element site recognized by androgen receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 11, p. 5673-8, May 27 1997.

ZHANG, M.; VOLPERT, O.; SHI, Y. H.; BOUCK, N. Maspin is an angiogenesis inhibitor. **Nat Med**, v. 6, n. 2, p. 196-9, Feb 2000.

ZHANG, W.; SHI, H. Y.; ZHANG, M. Maspin overexpression modulates tumor cell apoptosis through the regulation of Bcl-2 family proteins. **BMC Cancer**, v. 5, p. 50, May 20 2005.

ZHENG, D.; CHEN, H.; DAVIDS, J.; BRYANT, M.; LUCAS, A. Serpins for diagnosis and therapy in cancer. **Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets**, v. 13, n. 2, p. 123-32, Aug 2013.

ZHENG, H.; TSUNEYAMA, K.; CHENG, C.; TAKAHASHI, H.; CUI, Z.; MURAI, Y.; NOMOTO, K.; TAKANO, Y. Maspin expression was involved in colorectal adenoma-adenocarcinoma sequence and liver metastasis of tumors. **Anticancer Res**, v. 27, n. 1a, p. 259-65, Jan-Feb 2007.

ZHENG, H. C.; WANG, M. C.; LI, J. Y.; YANG, X. F.; SUN, J. M.; XIN, Y. Expression of maspin and kail and their clinicopathological significance in carcinogenesis and progression of gastric cancer. **Chin Med Sci J**, v. 19, n. 3, p. 193-8, Sep 2004.

ZOU, Z.; ANISOWICZ, A.; HENDRIX, M. J.; THOR, A.; NEVEU, M.; SHENG, S.; RAFIDI, K.; SEFTOR, E.; SAGER, R. Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells. **Science**, v. 263, n. 5146, p. 526-9, Jan 28 1994.

ZOU, Z.; GAO, C.; NAGAICH, A. K.; CONNELL, T.; SAITO, S.; MOUL, J. W.; SETH, P.; APPELLA, E.; SRIVASTAVA, S. p53 regulates the expression of the tumor suppressor gene maspin. **J Biol Chem**, v. 275, n. 9, p. 6051-4, Mar 3 2000.

APÊNDICE

APÊNDICE A. Lista de Proteínas que co-imunoprecipitam com maspina em células MCF10A tratadas com importazole.

Importazole	DMSO	Importazole - DMSO
40S ribosomal protein S17	actin, beta like 2(ACTBL2) Homo sapiens	40S ribosomal protein S17
annexin A1(ANXA1) Homo sapiens	Aly/REF export factor(ALYREF) Homo sapiens	annexin A1(ANXA1) Homo sapiens
chromatin target of PRMT1(HTOP) Homo sapiens	calumenin(CALU) Homo sapiens	chromatin target of PRMT1(HTOP) Homo sapiens
cortactin(CTTN) Homo sapiens	chromodomain helicase DNA binding protein 3(CHD3) Homo sapiens	cystatin B(CSTB) Homo sapiens
cystatin B(CSTB) Homo sapiens	cortactin(CTTN) Homo sapiens	DEAD-box helicase 17(DDX17) Homo sapiens
DEAD-box helicase 17(DDX17) Homo sapiens	desmoplakin(DSP) Homo sapiens	dermcidin(DCD) Homo sapiens
dermcidin(DCD) Homo sapiens	eukaryotic translation elongation factor 1 delta(EEF1D) Homo sapiens	drebrin like(DBNL) Homo sapiens
drebrin like(DBNL) Homo sapiens	eukaryotic translation elongation factor 1 gamma(EEF1G) Homo sapiens	eukaryotic translation initiation factor 2 subunit alpha(EIF2S1) Homo sapiens
eukaryotic translation initiation factor 1A, X-chromosomal(LOC107984923) Homo sapiens	eukaryotic translation elongation factor 2(EEF2) Homo sapiens	family with sequence similarity 109 member A(FAM109A) Homo sapiens
eukaryotic translation initiation factor 2 subunit alpha(EIF2S1) Homo sapiens	eukaryotic translation initiation factor 1A, X-chromosomal(LOC107984923) Homo sapiens	family with sequence similarity 127 member A(FAM127A) Homo sapiens
family with sequence similarity 109 member A(FAM109A) Homo sapiens	family with sequence similarity 200 member B(FAM200B) Homo sapiens	filaggrin(FLG) Homo sapiens
family with sequence similarity 127 member A(FAM127A) Homo sapiens	far upstream element binding protein 1(FUBP1) Homo sapiens	glutathione S-transferase pi 1(GSTP1) Homo sapiens
filaggrin(FLG) Homo sapiens	FUS RNA binding protein(FUS) Homo sapiens	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D like(HNRNPDL) Homo sapiens
glutathione S-transferase pi 1(GSTP1) Homo sapiens	GAR1 ribonucleoprotein(GAR1) Homo sapiens	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K(HNRNPK) Homo sapiens

heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D like(HNRNPDL) Homo sapiens	H1 histone family member X(H1FX) Homo sapiens	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R(HNRNPR) Homo sapiens
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K(HNRNPK) Homo sapiens	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U(HNRNPU) Homo sapiens	high mobility group nucleosome binding domain 1(HMGN1) Homo sapiens
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R(HNRNPR) Homo sapiens	high mobility group AT-hook 1(HMGA1) Homo sapiens	histidyl-tRNA synthetase(HARS) Homo sapiens
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U(HNRNPU) Homo sapiens	high mobility group nucleosomal binding domain 4(HMGN4) Homo sapiens	histone cluster 1 H1 family member c(HIST1H1C) Homo sapiens
high mobility group AT-hook 1(HMGA1) Homo sapiens	histone cluster 1 H1 family member d(HIST1H1D) Homo sapiens	histone cluster 1 H2A family member d(HIST1H2AD) Homo sapiens
high mobility group nucleosome binding domain 1(HMGN1) Homo sapiens	histone cluster 1 H2B family member l(HIST1H2BL) Homo sapiens	inosine monophosphate dehydrogenase 2(IMPDH2) Homo sapiens
histidyl-tRNA synthetase(HARS) Homo sapiens	histone cluster 3 H3(HIST3H3) Homo sapiens	lactate dehydrogenase A(LDHA) Homo sapiens
histone cluster 1 H1 family member c(HIST1H1C) Homo sapiens	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 13(MAP3K13) Homo sapiens	leucine rich repeat and sterile alpha motif containing 1(LRSAM1) Homo sapiens
histone cluster 1 H2A family member d(HIST1H2AD) Homo sapiens	myristoylated alanine rich protein kinase C substrate(MARCKS) Homo sapiens	leucine rich repeat containing 9(LRRC9) Homo sapiens
inosine monophosphate dehydrogenase 2(IMPDH2) Homo sapiens	nucleolin(NCL) Homo sapiens	LUC7 like(LUC7L) Homo sapiens
lactate dehydrogenase A(LDHA) Homo sapiens	PDS5 cohesin associated factor B(PDS5B) Homo sapiens	lysyl-tRNA synthetase(KARS) Homo sapiens
leucine rich repeat and sterile alpha motif containing 1(LRSAM1) Homo sapiens	peptidylprolyl isomerase A(PPIA) Homo sapiens	metadherin(MTDH) Homo sapiens
leucine rich repeat containing 9(LRRC9) Homo sapiens	peroxiredoxin 4(PRDX4) Homo sapiens	mitochondrial ribosomal protein S28(MRPS28) Homo sapiens
LUC7 like(LUC7L) Homo sapiens	protease, serine 46(PRSS46) Homo sapiens	myosin heavy chain 10(MYH10) Homo sapiens
lysyl-tRNA synthetase(KARS) Homo sapiens	ribosomal protein L11(RPL11) Homo sapiens	myosin light chain 6B(MYL6B) Homo sapiens
metadherin(MTDH) Homo sapiens	ribosomal protein L18(RPL18) Homo sapiens	nascent polypeptide-associated complex alpha subunit(NACA) Homo sapiens

mitochondrial ribosomal protein S28(MRPS28) Homo sapiens	ribosomal protein L19(RPL19) Homo sapiens	neuropeptide FF receptor 2(NPFFR2) Homo sapiens
myosin heavy chain 10(MYH10) Homo sapiens	ribosomal protein L22(RPL22) Homo sapiens	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha(PIK3CA) Homo sapiens
myosin light chain 6B(MYL6B) Homo sapiens	ribosomal protein L23(RPL23) Homo sapiens	profilin 1(PFN1) Homo sapiens
nascent polypeptide-associated complex alpha subunit(NACA) Homo sapiens	ribosomal protein L26(RPL26) Homo sapiens	proteasome 26S subunit, ATPase 1(PSMC1) Homo sapiens
neuropeptide FF receptor 2(NPFFR2) Homo sapiens	ribosomal protein L30(RPL30) Homo sapiens	protein phosphatase 2 regulatory subunit Bdelta(PPP2R2D) Homo sapiens
peroxiredoxin 4(PRDX4) Homo sapiens	ribosomal protein L31(RPL31) Homo sapiens	reticulocalbin 1(RCN1) Homo sapiens
phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha(PIK3CA) Homo sapiens	ribosomal protein L32(RPL32) Homo sapiens	ribosomal protein L13a(RPL13A) Homo sapiens
profilin 1(PFN1) Homo sapiens	ribosomal protein L34(RPL34) Homo sapiens	ribosomal protein L17(RPL17) Homo sapiens
proteasome 26S subunit, ATPase 1(PSMC1) Homo sapiens	ribosomal protein L35(RPL35) Homo sapiens	ribosomal protein L24(RPL24) Homo sapiens
protein phosphatase 2 regulatory subunit Bdelta(PPP2R2D) Homo sapiens	ribosomal protein L36(RPL36) Homo sapiens	ribosomal protein L27(RPL27) Homo sapiens
reticulocalbin 1(RCN1) Homo sapiens	ribosomal protein L36a like(RPL36AL) Homo sapiens	ribosomal protein L9(RPL9) Homo sapiens
ribosomal protein L13a(RPL13A) Homo sapiens	ribosomal protein L36a(RPL36A) Homo sapiens	ribosomal protein lateral stalk subunit P0 pseudogene 6(RPLP0P6) Homo sapiens
ribosomal protein L17(RPL17) Homo sapiens	ribosomal protein L37(RPL37) Homo sapiens	ribosomal protein lateral stalk subunit P2(RPLP2) Homo sapiens
ribosomal protein L19(RPL19) Homo sapiens	ribosomal protein L5(RPL5) Homo sapiens	ribosomal protein S15(RPS15) Homo sapiens
ribosomal protein L22(RPL22) Homo sapiens	ribosomal protein L6(RPL6) Homo sapiens	ribosomal protein S16(RPS16) Homo sapiens
ribosomal protein L24(RPL24) Homo sapiens	ribosomal protein L7a(RPL7A) Homo sapiens	ribosomal protein S2(RPS2) Homo sapiens
ribosomal protein L27(RPL27) Homo sapiens	ribosomal protein S18(RPS18) Homo sapiens	ribosomal protein S23(RPS23) Homo sapiens
ribosomal protein L35(RPL35) Homo sapiens	ribosomal protein S20(RPS20) Homo sapiens	ribosomal protein S27 like(RPS27L) Homo sapiens
ribosomal protein L36(RPL36) Homo sapiens	ribosomal protein S27a(RPS27A) Homo sapiens	RNA binding motif protein, X-linked(RBMX) Homo sapiens

ribosomal protein L36a(RPL36A) Homo sapiens	ribosomal protein SA(RPSA) Homo sapiens	S100 calcium binding protein A9(S100A9) Homo sapiens
ribosomal protein L37(RPL37) Homo sapiens	sarcalumenin(SRL) Homo sapiens	sepiapterin reductase (7,8- dihydrobiopterin:NADP+ oxidoreductase)(SPR) Homo sapiens
ribosomal protein L9(RPL9) Homo sapiens	secretory leukocyte peptidase inhibitor(SLPI) Homo sapiens	serine and arginine rich splicing factor 1(SRSF1) Homo sapiens
ribosomal protein lateral stalk subunit P0 pseudogene 6(RPLP0P6) Homo sapiens	SERPINE1 mRNA binding protein 1(SERBP1) Homo sapiens	serine and arginine rich splicing factor 3(SRSF3) Homo sapiens
ribosomal protein lateral stalk subunit P2(RPLP2) Homo sapiens	sine oculis binding protein homolog(SOBP) Homo sapiens	serine and arginine rich splicing factor 4(SRSF4) Homo sapiens
ribosomal protein S15(RPS15) Homo sapiens	single stranded DNA binding protein 1(SSBP1) Homo sapiens	serine and arginine rich splicing factor 6(SRSF6) Homo sapiens
ribosomal protein S16(RPS16) Homo sapiens	small nuclear ribonucleoprotein D2 polypeptide(SNRPD2) Homo sapiens	serine/threonine kinase 36(STK36) Homo sapiens
ribosomal protein S2(RPS2) Homo sapiens	SNU13 homolog, small nuclear ribonucleoprotein (U4/U6.U5)(SNU13) Homo sapiens	signal recognition particle 68(SRP68) Homo sapiens
ribosomal protein S20(RPS20) Homo sapiens	solute carrier family 25 member 41(SLC25A41) Homo sapiens	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A'(SNRPA1) Homo sapiens
ribosomal protein S23(RPS23) Homo sapiens	sorcin(SRI) Homo sapiens	splicing factor 3b subunit 2(SF3B2) Homo sapiens
ribosomal protein S27 like(RPS27L) Homo sapiens	testis expressed 15(TEX15) Homo sapiens	SRA stem-loop interacting RNA binding protein(SLIRP) Homo sapiens
RNA binding motif protein, X- linked(RBMX) Homo sapiens	transient receptor potential cation channel subfamily C member 4 associated protein(TRPC4AP) Homo sapiens	sushi, nidogen and EGF like domains 1(SNED1) Homo sapiens
S100 calcium binding protein A9(S100A9) Homo sapiens	tubulin alpha 1a(TUBA1A) Homo sapiens	thrombospondin type 1 domain containing 7B(THSD7B) Homo sapiens
sarcalumenin(SRL) Homo sapiens	tubulin beta class I(TUBB) Homo sapiens	titin(TTN) Homo sapiens
sepiapterin reductase (7,8- dihydrobiopterin:NADP+ oxidoreductase)(SPR) Homo sapiens	tyrosine 3- monooxygenase/tryptophan 5- monooxygenase activation protein zeta(YWHAZ) Homo sapiens	tyrosine 3- monooxygenase/tryptophan 5- monooxygenase activation protein gamma(YWHAG) Homo sapiens
serine and arginine rich splicing factor 1(SRSF1) Homo sapiens	ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1(UBA52) Homo sapiens	v-mos Moloney murine sarcoma viral oncogene homolog(MOS) Homo sapiens
serine and arginine rich splicing factor 3(SRSF3) Homo sapiens	valosin containing protein(VCP) Homo sapiens	zinc finger protein 605(ZNF605) Homo sapiens

serine and arginine rich splicing factor 4(SRSF4) Homo sapiens	xyloside xylosyltransferase 1(XXYLT1) Homo sapiens	Immunoglobulin kappa variable 2D-40
serine and arginine rich splicing factor 6(SRSF6) Homo sapiens	zinc finger protein 462(ZNF462) Homo sapiens	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3
serine/threonine kinase 36(STK36) Homo sapiens	Y-box-binding protein 3	
SERPINE1 mRNA binding protein 1(SERBP1) Homo sapiens		
signal recognition particle 68(SRP68) Homo sapiens		
small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A'(SNRPA1) Homo sapiens		
splicing factor 3b subunit 2(SF3B2) Homo sapiens		
SRA stem-loop interacting RNA binding protein(SLIRP) Homo sapiens		
sushi, nidogen and EGF like domains 1(SNED1) Homo sapiens		
thrombospondin type 1 domain containing 7B(THSD7B) Homo sapiens		
titin(TTN) Homo sapiens		
tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein gamma(YWHAG) Homo sapiens		
tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta(YWHAZ) Homo sapiens		
v-mos Moloney murine sarcoma viral oncogene homolog(MOS) Homo sapiens		
xyloside xylosyltransferase 1(XXYLT1) Homo sapiens		
zinc finger protein 605(ZNF605) Homo sapiens		
Immunoglobulin kappa variable 2D-40		
NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3		