UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

PAULT YEISON MINAYA FERRUZO

**Estudos funcionais e biológicos associados à
interação de DUSP3 com a proteína HNRNPC1/C2**

Versão corrigida da Dissertação conforme Resolução CoPGr 5890

O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do depósito na SGP

11/09/2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

F398e Ferruzo, Pault Minaya Ferruzo
Estudos funcionais e biológicos associados à interação de DUSP3 com a proteína HNRNPC1/C2 / Pault Minaya Ferruzo Ferruzo. - São Paulo, 2019.
133 p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.

Orientador: Forti, Fábio Luis Forti

1. Interação de proteínas. 2. Fosfatase aDUSP DUSP3. 3. Funções da proteína HNRNPC. 4. Fosforilação/Desfosforilação. 5. c-myc e xiap contendo sequências IRES. I. T. II. Forti, Fábio Luis Forti, orientador.

PAULT YEISON MINAYA FERRUZO

**Estudos funcionais e biológicos associados à
interação de DUSP3 com a proteína HNRNPC1/C2**

*Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em Ciências (Bioquímica)*

Orientador: Prof. Dr. Fábio Luís Forti

São Paulo

2019

À minha família.

AGRADECIMENTO(S)

Ao Prof. Dr. Fábio Luis Forti, pela orientação e por ter me recebido em seu laboratório.

À minha mãe Yolanda e toda família pelo apoio incondicional e por acreditarem em mim.

À Profa. Dra. Carla Columbano de Oliveira e seus alunos, por nos auxiliarem e cederem a utilização dos equipamentos para a realização do fracionamento de polissomos.

Ao Prof. Dr. Eduardo Moraes Rego Reis e seus alunos, por nos auxiliarem e cederem a utilização do Termociclador para PCR em tempo real.

À técnica Bianca Dazzani Marcolino pelo apoio nos experimentos.

À Profa. Dra. Bianca Silvana Zingales, por nos cederem a utilização do espaço e diversos reagentes.

Ao Prof. Dr. Sérgio Verjovski e ao aluno Gilbert do Instituto Butantan, por nos auxiliarem e cederem utilização do Bioanalyzer e os reagentes do Qubit.

À Profa. Dra. Maria Júlia Pinheiro e à aluna Francisca Nathália, por nos cederem reagentes para os ensaios.

À Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar, por nos auxiliarem e cederem reagentes para os ensaios.

Ao técnico Marcelo Nunes pelos seus conselhos e apoio.

À Nadia pelo carinho, paciência, compreensão, apoio e por todos os ótimos momentos que passamos.

A todos os integrantes do laboratório LSSB e também aos que passaram por ele (Msc. Lucas, Msc. Luiz, Dr. Arthur, Yuli, Dra. Lilian, Jessica, Ana) pelos auxílios nos experimentos.

Às técnicas Bere, Juliana que contribuíram muito para o desenvolvimento da tese.

A todos aqueles que de uma forma ou de outra contribuíram para o desenvolvimento desta tese.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro; processos No 88887.136364/2017-00 e processo "PROEX 1888/2016".

“Todo es hermoso y constante,
Todo es música y razón,
Y todo, como el diamante,
Antes que luz es carbón.”

Jose Marti

RESUMO

Ferruzo, P. Y. M. **Estudos funcionais e biológicos associados a interação de DUSP3 com a proteína HNRNPC1/C2**. 2019. 147p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A regulação da fosforilação/desfosforilação das proteínas é o eixo central de muitas cascatas de sinalização. A fosfatase DUSP3, constituída apenas por um único domínio catalítico, desempenha papéis fundamentais na proliferação e senescência celular. Nas células HeLa, submetidas ao estresse genotóxico, o DUSP3 interage fisicamente com as proteínas HNRNPC, mas o efeito dessa função molecular ainda é desconhecido. Aqui demonstramos que a ausência de DUSP3 mantém a proteína HNRNPC1/C2 num estado hiperfosforilado. Para entender melhor o envolvimento da interação DUSP3-HNRNPC nas funções biológicas da HNRNPC1/C2, foram estudadas células de fibroblasto deficientes de DUSP3. Foi analisado o efeito da deficiência de DUSP3 na biogênese dos ribossomos através do ensaio de perfil de polirribossomos e quantificação dos rRNAs com RT-qPCR. Os resultados mostraram que a deficiência de DUSP3 não afeta a maturação das subunidades ribossômicas, mas teria um impacto na transcrição dos pré-rRNAs e no acúmulo das espécies 47S/45S. A expressão de genes contendo sequências IRES foi analisada através do RT-qPCR e sua tradução ao longo do ciclo e em condições de estresse. Da expressão, não existe nenhuma diferença nos níveis de transcrição dos genes c-myc e xiap nas células normais e deficientes de DUSP3 em condições basais. Embora a síntese destas proteínas é maior nas células deficientes, mantendo um nível maior de tradução ao longo de todo o ciclo. Sob condições de estresse, estas duas proteínas sempre mantêm uma maior expressão nas células Knockdown para DUSP3. Neste trabalho também foi estabelecido a presença de DUSP3 nos complexos da subunidade 40S, através da análise das frações obtidas do ensaio de polirribossomos e interação *in vitro* (Co-IP). A presença de DUSP3 nas subunidades 40S, os monossomos 80S e polissomos poderia ser através da interação direta com proteínas que possuem um domínio RRM e seria dependente dos complexos formados pelas proteínas e seus RNAs alvos. Aqui mostramos a interação *in vitro* de DUSP3 com a proteína PABP (com quatro domínios RRM), proteína que tem um papel importante na manutenção da taxa global de tradução, esta interação é enfraquecida na ausência de RNAs. A deficiência de DUSP3 também teria um impacto na interação das proteínas HNRNPC1/C2 e P53 *in vitro*. A ausência de DUSP3 diminui a interação HNRNPC-P53 através da hiperfosforilação da proteína HNRNPC1/C2. A perda desta interação, aumentaria os níveis da proteína P53 na célula deficiente de DUSP3 e poderia gerar parada no ciclo celular. Através de ensaios de imunofluorescência, se observou uma maior taxa de transcrição global na célula deficiente de DUSP3. Por fim, aqui demonstramos que a interação direta de DUSP3 e HNRNPC1/C2 vai permitir a regulação das funções biológicas desta proteína, e a ausência de DUSP3 vai ter efeitos pleiotrópicos na homeostase da célula.

Palavras-chave: DUSP3, HNRNPC1/C2, Biogênese Ribossômica, IRES, ITAF, c-MYC

ABSTRACT

Ferruzo, P. Y. M. **Functional and biological studies associated to DUSP3 and HNRNPC1/C2 protein interactions.** 2019. 147. Master's Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Protein phosphorylation/dephosphorylation regulation is a central axis of many signaling cascades. DUSP3 phosphatase, consisting only of a single catalytic domain, plays key roles in cell proliferation and senescence. In HeLa cells subjected to genotoxic stress, DUSP3 physically interacts with HNRNPC proteins, but the effect of this molecular function is still unknown. Here we demonstrate that the absence of DUSP3 keeps the HNRNPC1/C2 proteins in a hyperphosphorylated state. To better understand the involvement of DUSP3-HNRNPC interaction on the biological functions of HNRNPC1/C2, DUSP3 deficient fibroblast cells were studied. The effect of DUSP3 deficiency on ribosome biogenesis was analyzed by polyribosome profile assay and RT-qPCR for rRNA quantification. The results showed that DUSP3 deficiency does not affect ribosomal subunit maturation, but would have an impact on transcription of pre-rRNAs and accumulation of 47S / 45S species. The expression of genes containing IRES sequences was analyzed by RT-qPCR and their translation throughout the cycle and under stress conditions. From expression, there is no difference in transcriptional levels of c-myc and xiap genes in normal and DUSP3 deficient cells under basal conditions. Although, the synthesis of these proteins is higher in deficient cells and these maintain a higher level of translation throughout the cell cycle. Under stress conditions, these two proteins always maintain higher expression in Knockdown cells for DUSP3. In this work, the presence of DUSP3 in the 40S ribosomal subunit complexes was also established by analyzing the fractions obtained from the polyribosome assay and in vitro interaction (Co-IP). The presence of DUSP3 in the 40S subunits, 80S monosomes and polysomes could be through direct interaction with proteins that have an RRM domain and would be dependent on the complexes formed by the proteins and their target RNAs. Here we show the in vitro interaction of DUSP3 with PABP protein (with four RRM domains), a protein that plays an important role in maintaining the overall translation rate, this interaction is weakened in the absence of RNAs. DUSP3 deficiency would also have an impact on the interaction of HNRNPC1/C2 and P53 proteins in vitro. The absence of DUSP3 decreases HNRNPC-P53 interaction through hyperphosphorylation of the HNRNPC1/C2 proteins. Loss of this interaction would increase P53 protein levels in the DUSP3 deficient cell and could lead to cell cycle arrest. Through immunofluorescence assays, a higher overall transcription rate is observed in the DUSP3 deficient cell. Finally, we demonstrate that the direct interaction of DUSP3 and HNRNPC1/C2 will allow the regulation of the biological functions of this protein, and the absence of DUSP3 will have pleiotropic effects on cell homeostasis.

Keywords: DUSP3, HNRNPC1/C2, Ribosome Biogenesis, IRES, ITAF, c-MYC

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Relação quinases/fosfatases de diferentes organismos.

Figura 2 – Relações filogenéticas de proteínas fosfatases humanas.

Figura 3 - Substratos de DUSP3

Figura 4 – Modelo atual de maturação e exportação de subunidades ribossômicas 40S e 60S.

Figura 5 – Níveis de fosforilação da proteína HNRNPC1/C2 após tratamento com 6J/m² UVC pelo ensaio de imunoprecipitação

Figura 6 – Relação pY/PT em células normais e deficientes de DUSP3

Figura 7 – Expressão genica das espécies ribossomais 5.8S, 18S, 28S e 45S determinada por RT-qPCR para células normais e deficientes de DUSP3

Figura 8 – Traço representativo do extrato de ribossomo preparado a partir de células normais e deficientes de DUSP3 em presença de cicloheximida.

Figura 9 – Análise do perfil de polirribossomos das células normais e deficientes de DUSP3.

Figura 10 – Presença de DUSP3 nas subunidades ribossômica e nos polissomos.

Figura 11 - Presença de HNRNPC e PABP nas subunidades ribossômica e nos polissomos.

Figura 12 – Traço representativo do extrato de ribossomo preparado a partir de células normais e deficientes de DUSP3 em presença de EDTA.

Figura 13 - Presença de HNRNPC e DUSP3 nas subunidades 40S e 60S dos lisados tratados com EDTA.

Figura 14 - Co-imunoprecipitação de DUSP3 com proteínas ribossomais RPS6 e RPL26 nas condições controle e sob estresse UVC, e em condições restritivas

Figura 15 – Sincronização de células deficientes de DUSP3 e normais nas fases G₀/G₁, G₁/S e G₂/M

Figura 15.1 – Sincronização de células deficientes de DUSP3 e normais nas fases G₀/G₁, G₁/S e G₂/M.

Figura 16 – Expressão das proteínas c-MYC, XIAP e CDK11 em células deficientes de DUSP3 e normais sob estresse genotóxico.

Figura 16.1 – Expressão das proteínas c-MYC, XIAP e CDK11 em células deficientes de DUSP3 e normais sob estresse genotóxico.

Figura 17 – Ensaios de imunofluorescência com sonda marcada no nucleotídeo modificado EU para quantificação do estado de transcrição global de células deficientes de DUSP3 e normais.

Figura 18 – Quantificação da transcrição global entre células deficientes de DUSP3 e normais

Figura 19 – Quantificação da transcrição global entre células deficientes de DUSP3 e normais.

Figura 20 – Quantificação dos centros de alta expressão (CAE) com o nucleotídeo modificado e a sonda fluorescente

Figura 21 – Quantificação do número dos centros de alta expressão em células deficientes de DUSP3 e normais

Figura 22 – Co-imunoprecipitação de DUSP3 com a proteína p53 nas condições controle em presença de heparina ou RNases.

Figura 23 – Co-imunoprecipitação de DUSP3 com a proteína p53 na presença de Heparina e RNases

Figura 24 - Co-imunoprecipitação de DUSP3 com a proteína PABP na presença de Heparina e RNases

Figura 25 – Inibição da tradução global com cicloheximida de células normais e deficientes de DUSP3.

Figura 26 – Possível mecanismo de interação de DUSP3 com a proteína HNRNPC1/C2

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aDUSP: Atypical dual-specificity phosphatase

DUSP3: Dual specificity protein phosphatase 3

VH1: Vaccinia H1

VHR: VH1- Related

MAPKs: Mitogen-activated protein kinases

PTP: Protein Tyrosine Phosphatase

LMWPTP: Low Molecular Weight Protein Tyr Phosphatase

MKPs: MAPK phosphatases

EGFR: Epidermal growth factor receptor

STAT5: Signal transducer and activator of transcription 5

ERBB: Erythroblastic oncogene B

HER2: Human epidermal growth factor receptor 2

NPM: Nucleophosmin

HNRNPC1/C2: Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2

NUCL: Nucleolin

hnRNPs: Heterogeneous ribonucleoprotein particle

bZLM: Basic leucine zipper-like motif

CLZ: HNRNP C leucine zipper-like oligomerization domain

U snRNA: Uridine-rich small nuclear RNA

CBC: Cap-binding complex

RNPs: Ribonucleoproteins

hTR: Human telomerase RNA

hTERT: Human telomerase reverse transcriptase

YTH: YT521-B homology domain

m6A: N6-Methyladenosine

IRES: Internal ribosome entry site

U2AF65: U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor (65kD)

TIF-IA: translation initiation factor I A

SL1: Selective factor 1

UBF: Upstream binding factor

TTF-I: Transcription termination factor 1

PTRF: Polymerase I and transcript release factor

RP: Ribosomal protein

RPLs: Large subunit ribosomal proteins

RPSs: Small subunit ribosomal proteins

uORFs: Upstream open reading frames

ITAF: IRES trans-acting factors

DDR: DNA damage response

PTB: Polypyrimidine tract-binding protein

Unr: N-ras upstream gene protein

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

SUMÁRIO

1 Introdução.....	17
1.1 Fosfatases.....	17
1.1.1 Fosfatase de Especificidade Dual (DUSP).....	18
1.1.2 Fosfatases de Especificidade Dual atípicas (aDUSP).....	20
1.1.3 DUSP3.....	20
1.1.4 O papel da fosfatase DUSP3 nos processos biológicos.....	21
1.2 HNRNPC.....	24
1.2.1 O papel da proteína HNRNPC1/C2 nos processos biológicos.....	25
1.3 Biogênese de ribossomos.....	31
1.4 Síntese de proteínas.....	33
1.5 Tradução dependente de IRES.....	36
2. Objetivos	40
2.1 Objetivo geral.....	40
2.2 Objetivos específicos.....	40
3. MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1 Cultura de células.....	41
3.2 Sincronização de células G ₀ /G ₁ , G ₁ /S e G ₂ /M.....	41
3.3 Irradiação das linhagens celulares.....	42
3.4 Ensaio de inibição da síntese proteica.....	42
3.5 Preparação dos lisados celulares totais e quantificação.....	43
3.6 Eletroforese desnaturante de proteínas (SDS-PAGE).....	44
3.7 Western Blot e Immunoblotting.....	44
3.8 Co-Imunoprecipitação.....	45
3.9 Imunofluorescência.....	46
3.10 Ensaio de quantificação da transcrição global.....	46
3.11 Perfil de polissomos.....	47
3.12 Extração e quantificação de RNA.....	48

3.13 Síntese de cDNA.....	49
3.14 Análise da expressão genica por RT-qPCR.....	50
3.15 Determinação da concentração e eficiência de primers.....	52
3.16 Análises estatísticas.....	52
4. RESULTADOS.....	53
4.1 Nível de fosforilação da proteína HNRNPC em células normais e deficientes de DUSP3.....	53
4.2 Expressão gênica do pré-rRNA 45S e os rRNA 28S, 18S e 5.8S maduros em células normais e deficientes de DUSP3.....	56
4.3 Tradução global nas células normais e deficientes de DUSP3.....	58
4.3.1 Análise do status da tradução através do perfil de polirribossomos.....	58
4.3.2 Análise da presença das proteínas DUSP3 e HNRNPC1/C2 nas subunidades ribossômicas, monossomas e polissomos.....	61
4.3.3 Análise da presença de DUSP3 e HNRNPC1/C2 nas subunidades 40S e 60S após tratamento como EDTA.....	64
4.3.4 Interação de DUSP3 com complexos proteicos das subunidades 40S e 60S.....	66
4.4 Expressão de mRNA que contém sequência IRES reguladas por HNRNPC1/C2.....	69
4.4.1 Expressão de proteínas em células sincronizadas.....	69
4.4.2 Expressão de proteínas em células sob estresse.....	72
4.4.3 Expressão gênica do c-myc e xiap em células normais e deficientes de DUSP3.....	76
4.5 Quantificação da transcrição global em células normais e deficientes de DUSP3.....	77
4.6 Efeito da deficiência de DUSP3 na interação p53-HNRNPC1/C2.....	82
4.7 Interação entre DUSP3 e PABP.....	84

4.8 Inibição da tradução global e estabilidade proteica.....	86
5. DISCUSSÃO.....	88
6. CONCLUSÕES.....	98
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100
LISTA DE ANEXOS.....	123
SÚMULA CURRICULAR.....	130

1. INTRODUÇÃO

1.1 Fosfatases

A fosforilação de proteínas é uma modificação pós-traducional fundamental que atua como eixo central nas redes de sinalização. O estado de fosforilação de uma proteína ou substrato não proteico é definido sob ação oposta de dois tipos de enzimas distintas, as quinases que catalisam a modificação de fosforilação e é revertida pelas fosfatases, frequentemente são ativas simultaneamente (Hunter 1995). O seu papel é essencial para múltiplos aspectos da fisiologia eucariótica, para a manutenção da dinâmica celular e para a resposta rápida de mudanças no ambiente (Kumar e Maddika, 2017), sendo que esta representa o mecanismo mais comum pelo o qual a função do produto gênico é regulada nos sistemas celulares. Historicamente, as quinases têm sido mais estudadas e atualmente mais enzimas quinases do que fosfatases são descritas (Figura 1) (Sacco et al., 2012; Manning et al., 2002). No entanto, estudos recentes mostraram a importância das fosfatases em diversos processos biológicos e revelaram papéis predominantes para essas enzimas no controle das respostas celulares.

Table 1. Protein phosphatase and kinase repertoires in the nine organisms. The numbers of kinases are from KinBase (81); the sizes of the proteomes were estimated from the literature (see text S9).

	Protein phosphatases	Protein phosphatases as % of proteome	Kinases	Kinases as % of proteome	Estimated proteome size	Kinase/phosphatase ratio
<i>Homo sapiens</i> (human)	189	0.84%	538	2.39%	22,500	2.85
<i>S. purpuratus</i> (sea urchin)	166	0.71%	354	1.52%	23,300	2.13
<i>D. melanogaster</i> (<i>Drosophila</i>)	137	1.01%	237	1.74%	13,600	1.73
<i>C. elegans</i>	244	1.24%	438	2.22%	19,735	1.80
<i>N. vectensis</i> (anemone)	158	0.88%	443	2.46%	18,000	2.80
<i>A. queenslandica</i> (sponge)	205	0.68%	703	2.34%	30,000	3.43
<i>M. brevicollis</i>	138	1.50%	413	4.49%	9,200	2.99
<i>S. cerevisiae</i> (yeast)	75	1.25%	132	2.20%	6,000	1.76
<i>D. discoideum</i>	113	0.90%	285	2.28%	12,500	2.52
Average	158	1.00%	394	2.41%	17,204	2.45

Figura 1 – Relação quinases/fosfatases de diferentes organismos. Tomado de Chen et al., 2017.

Recentemente diversos estudos tentam definir o fosfatoma humano incluindo todos os membros de qualquer família com qualquer atividade de fosfatase proteica para fornecer um contexto genômico e evolutivo abrangente; o fosfatoma resultante inclui 189 genes que representam 0,84% do proteoma humano (Figura 2) (Dennise Bradshaw, 2011). O equilíbrio da fosforilação mantido pelas fosfatases e quinases é crucial pois sua regulação aberrante é conhecida por desencadear doenças (Rios et al., 2014; Tonks 2006), o mau funcionamento destas enzimas está associado a condições clínicas ou são marcadores de doenças como o câncer (Julien et al., 2011).

1.1.1 Fosfatase de Especificidade Dual (DUSP)

A família das fosfatases de especificidade dual (DUSP) representa o maior e mais diversificado grupo, pois elas são capazes de desfosforilar os resíduos Tyr e Ser/Thr devido à estrutura do seu sítio catalítico, o qual não é tão profundo e é mais aberto que o das tirosina fosfatases clássica (Jeong et al., 2014). A sequência consenso, HC(X)5R, presente no domínio catalítico das DUSPs é altamente conservada. Na base da fenda catalítica encontra-se o resíduo Cys, que é o principal responsável pela reação enzimática da fosfatase (Alonso et al., 2004; Farooq e Zhou, 2004). De forma clássica, as DUSPs são subdividas em 16 grupos os quais tem papéis em diversas vias de sinalização como a regulação das vias das MAPK. Entre elas as MKPs desfosforilam o motivo treonina-X-tirosina (TXY) de MAPKs (X é qualquer aminoácido) (Boutros et al., 2008). Apresentam o domínio 2 de homologia a CDC25 (CH2), um domínio de ligação a MAPK (MKB) no N-terminal e um domínio catalítico de fosfatase no C-terminal. Outras DUSPs como as miotubularinas (MTM) apresentam um domínio de homologia de pleckstrina (PH) no seu N-terminal (Bermudez et al., 2010; Patterson et al., 2009). O subgrupo menos caracterizado e ainda mais diverso é o das fosfatases de especificidade dual atípicas (aDUSPs), que são geralmente pequenas (<250 aminoácidos), e o seu melhor representante é a DUSP3, que tem sido amplamente estudada devido a sua estrutura simples de um único domínio catalítico.

Figura 2 – Relações filogenéticas de proteínas fosfatases humanas. As árvores foram geradas a partir dos múltiplos alinhamentos de referência dos domínios da fosfatase de nove espécies. As fosfatases são classificadas em 10 diferentes enovelamentos estruturais e 20 famílias, dos quais três diferentes enovelamentos compartilham um motivo catalítico comum de CX5R. Os três enovelamentos apresentam uma Cys catalítica, CC1 (Cys-based class I), CC2 (Cys-based class II) e CC3 (Cys-based class III), sendo CC1, o maior grupo incluindo a família de proteínas tirosina fosfatases (PTPs), bem como a família de fosfatase de dupla especificidade (DSPs ou DUSPs) e a família PTEN de fosfatases lipídicas. Seta indica a posição do DUSP3 junto com outras fosfatases de especificidade dual. Tomado de Chen et al., 2017.

1.1.2 Fosfatases de Especificidade Dual atípicas (aDUSP)

Este grupo compreende 19 proteínas classificadas dentro do grupo de fosfatases de especificidade dual atípica (aDUSPs), este grupo foi identificado com base a sua homologia com o produto do gene Vacina H1 vírus (VH1) (Bayón e Alonso, 2010; Guan et al., 1991). As aDUSPs não apresentam os domínios MKB/CH2, mas algumas delas podem desfosforilar as MAPKs, como DUSP3 e DUSP12 e se comportam como verdadeiras MKPs desfosforilando ERK1/2, JNK e até p38. Estas fosfatases compartilham alguma redundância em seus substratos com as MKPs (Patterson et al., 2009; Nunes-Xavier et al., 2011; Cho et al., 2017). A ausência dos domínios MKB/CH2, juntamente com os resultados negativos para outros membros deste grupo como reguladores das vias MAPK e a redundância com as MKPs, sugere que ERK1/2, JNK e p38 não são os substratos específicos das aDUSPs (Zhou et al., 2002; Bayón e Alonso, 2010). A maior parte destas proteínas são pequenas (<27 kDa), além de desfosforilar os resíduos Tyr e Ser/Thr, podem ter outros substratos como mRNA, lipídios e glicogênio (Bayón e Alonso, 2010; Patterson et al., 2009). As aDUSPs apresentam o domínio catalítico consensual das DUSPs, o qual é responsável pela atividade da fosfatase. Ademais, apresentam sequências regulatórias ou de reconhecimento/interação em suas porções C e N-terminal (Alonso et al., 2004-b; Jeong et al., 2006; Schwertassek et al., 2010).

1.1.3 DUSP3

DUSP3 (também conhecida como fosfatase relacionada a VH1 ou VHR) é uma proteína fosfatase de especificidade dual atípica (aDUSP) e foi a primeira fosfatase de especificidade dual identificada em 1991 (Ishibashi et al., 1992). DUSP3 apresenta apenas um único domínio catalítico que desfosforila resíduos de tirosina e treonina que está constitutivamente ativo e é amplamente expressa em vários tecidos. O seu nível de expressão também é restrito ao tipo celular, enquanto a sua atividade depende do compartimento subcelular onde está localizada (Alonso et al., 2001; Rahmouni et al., 2006). DUSP3 participa em vários processos biológicos desfosforando suas proteínas alvos e

revertendo a sinal de algumas quinases como os membros da família de proteínas quinases ativadas por mitógenos, ou MAPKs (ERK, SAPK/JNK, p38), que estão associadas com a proliferação e diferenciação celular, e também resposta a estresse (Todd et al., 1999; Todd et al., 2002; Schumacher et al., 2002). Além das MAPKs, DUSP3 apresenta outros alvos como STAT5 e o receptor de EGF ERBB2 (Hoyt et al., 2007; Wang et al., 2011).

Novos estudos indicam o envolvimento da DUSP3 na resposta celular frente ao dano no DNA. A análise de células com e sem exposição à radiação, mostraram que a expressão da DUSP3 é constitutiva e semi-estável através de todas as mudanças de fase do ciclo celular, e a sua expressão não é afetada por danos no DNA induzidos por radiação gama. Estes dados indicam que DUSP3 é uma enzima abundante que permanece no núcleo mesmo sob estresse, onde poderia ter outros alvos diferentes às clássicas MAPKs (Forti et al., 2010 e 2014). Numa abordagem sob estresse, novos possíveis alvos foram descobertos através da espectrometria de massas (cerca de cinquenta proteínas foram identificadas). A interação direta de DUSP3 com essas proteínas abre um novo conjunto de processos biológicos nos quais a fosfatase estaria envolvida (Panico e Forti, 2013)

1.1.4 O papel da fosfatase DUSP3 nos processos biológicos

As características únicas da DUSP3 e sua interação com outras proteínas que não são MAPKs exclui-o do grupo das MKPs e torná-o um alvo para a busca de novas interações biológicas. Ao regular as MAPKs ERK1/2, JNK e p38, a DUSP3 estaria envolvida na regulação de muitos processos biológicos nos quais estas vias de sinalização são conhecidas por terem um impacto. Entre os papéis atribuídos ao DUSP3 estão o controle do ciclo celular, a proliferação, a senescência de alguns tipos de câncer e nas respostas imunes mediadas pelos substratos MAPK (Alonso et al., 2003; Bayón e Alonso, 2010; Jeffrey et al., 2007; Kondoh e Nishida, 2007; Rahmouni et al., 2006; Salojin e Oravec, 2007). DUSP3 se comporta como uma verdadeira MKPs capaz de reconhecer e defosforilar ERK, JNK e p38 em menor grau (Cerignoli et al., 2006; Kondoh e Nishida, 2007; Todd et al., 1999), o que sugere a existência de um mecanismo que reconhece e

desfosforila seus substratos independentemente do domínio CH2. Assim também, não existe um feedback positivo na atividade de DUSP3 em resposta à ativação das MAPKs (Kang e Kim, 2006), sendo o aumento na atividade de DUSP3 causado pela fosforilação no seu resíduo Tyr138 pelas quinases VRK3, Zap70 e Tyk2 em definidos contextos celulares (Alonso et al., 2003; Hoyt et al., 2007).

Figura 3 - Substratos de DUSP3. Os diferentes substratos da fosfatase DUSP3 foram validados in vivo e in vitro (primeira camada de vizinhos), identificados in vitro e previstos in silico (primeira e segunda camada de vizinhos), todos trabalham em conjunto para mediar as diversas funções biológicas dessa fosfatase mostradas no esquema (periferia magenta). Sob condições específicas, algumas proteínas cinases (Tyr ou Ser / Thr) podem fosforilar DUSP3 aumentando sua atividade fosfatase (em azul à direita) em seus substratos. Tomado de Monteiro et al. 2018.

DUSP3 é uma das aDUSPs mais estudadas, devido à sua implicação em câncer. Sua superexpressão em células tumorais que se encontram sob condições de estresse genotóxico inibe o crescimento celular e proliferação, por isso DUSP3 pode ser considerado como um novo marcador para a progressão do câncer e um possível alvo para terapias anticâncer (Keyse 2008). Recentemente se demonstrou que DUSP3 teria participação no processo de angiogênese na tumorigênese, o qual é crucial para o crescimento e manutenção do tumor. As células endoteliais têm alta expressão de DUSP3, o que poderia estar relacionado à tubulogênese (comprimento da rede e número de interseções do tubo) in vivo via PKC, independentemente das vias de ERK1/2 e JNK. Em células endoteliais

deficientes de DUSP3 sob estímulo de β -FGF, foi bloqueado fortemente o surgimento de angiogênese. Modelos in vivo e ex vivo, de camundongos DUSP3 $-/-$, tiveram uma clara diminuição na neovascularização, reforçando o papel da DUSP3 na neoangiogênese in vivo (Amand et al., 2014). Além de regular a proliferação e apoptose em células tumorais humanas, DUSP3 está envolvida na formação do fuso mitótico, na regulação negativa da atividade da telomerase (Rahmouni et al., 2006) e em processo de dano/reparo de DNA (Forti et al., 2010), no entanto os mecanismos moleculares pelos quais DUSP3 participa nesses processos biológicos não são conhecidos. Várias abordagens experimentais foram realizadas para tentar entender melhor o mecanismo de ação de DUSP3, estas confirmaram a boa estabilidade da enzima e sua co-localização com os seus substratos clássicos (MAPK) no núcleo. Mas um efeito inesperado da interação DUSP3-ERK1/2 foi na regulação dos eventos cromossômicos, induzido a formação de fusos multipolares e aneuploidia quando ERK1/2 é superativada (Eves et al., 2006). A inibição transiente da DUSP3 leva à formação de fusos multipolares em células cancerígenas mitóticas, mas este defeito é revertido através do silenciamento ou inibição química da ERK1/2 ou pela reconstituição de DUSP3 por expressão exógena (Tambe et al., 2016). Além disso, em células mamíferas na fase G2/M, a DUSP3 e ERK1/2 não fosforilada estão presentes no aparato do fuso (Rahmouni et al., 2006). Estes dados destacam a importância da DUSP3 na estabilidade genômica da célula.

DUSP3 também co-localiza com a histona H2AX fosforilada (Ser139), um marcador clássico para quebra de fita dupla de DNA (DSB). Sob condições de estresse (radiação) é expressa em níveis elevados nos núcleos das células HeLa, HaCaT e HEK293 irradiadas com radiação gama (Henkens et al., 2008). Outros estudos têm mostrado alguns indícios da implicação de DUSP3 com a regulação da estabilidade genômica interagindo fisicamente com a proteína NBS1 e indiretamente com o complexo MRN (MRE11-RAD50-NBS1), que se dedica exclusivamente à detecção de danos no DNA e iniciação do reparo especialmente depois de radiação ionizante (Forti, 2014.). Assim também os alvos de DUSP3, JNK, p38 e

ERK1/2 (MAPKs) medeiam respostas celulares sob tratamentos de radiações ionizantes em células HeLa regulando positivamente a rota ATM/ γ -H2AX para controlar a reparo por recombinação homóloga (HR) em danos no DNA induzidos por radiação gama (Forti, 2014; Kim et al., 2008; Golding et al., 2007; Todd et al., 1999; Schumacher et al., 2002). Por isso, pode-se inferir que DUSP3 permite a regulação nuclear eficaz da atividade destas MAPK melhorando a atividade da maquinaria de reparo do DNA e interagindo com o complexo de reconhecimento de danos DSB mantendo a integridade das sequências de DNA.

O grupo de trabalho do Laboratório de Sinalização em Sistemas Biomolecular (LSSB) da Universidade de São Paulo - IQ, contribuiu para a identificação de novos alvos da enzima DUSP3 por técnicas de pull-down, imunoprecipitação, co-localização, análises por MS e bioinformática, conseguindo assim identificar muitas novas proteínas que podem interagir com DUSP3. De todos os possíveis alvos, Nucleofosmina (NPM), HNRNP C1/C2 e Nucleolina (NUCL) foram os alvos mais promissores devido à sua implicação em processos biológicos nos quais DUSP3 também estaria participando (Panico e Forti, 2013; Forti, 2014). No entanto, é importante mencionar que das 45 proteínas encontradas interagindo com a DUSP3, 50% estão envolvidas na estrutura e funções do DNA/ RNA, e 11 proteínas tem o domínio RRM ou KH com capacidade de reconhecer e se unir às sequencias específicas de motivos de RNA.

1.2 HNRNPC

As ribonucleoproteínas têm um alto nível de expressão e estão sujeitas a uma regulação estrita ao longo do ciclo celular (Geuens et al., 2016). HNRNPC1/C2 pertence à grande família de ribonucleoproteínas nucleares heterogêneas ubiquamente expressas e que se ligam a transcritos de RNA nascentes afetando a estabilidade, o processamento, a exportação e a tradução de mRNA. A proteína HNRNPC1/C2 é bastante abundante no núcleo dos eucariotos e se liga ao pré-mRNA, mas tem também funções citoplasmáticas descritas (Dreyfuss et al., 2002; Weighardt et al., 1996; König et al., 2010). Esta proteína

desempenha um papel muito importante no processamento do pré-mRNA e pode ser considerada como uma chaperonina de mRNA, mantendo longos trechos de RNA em um estado de fita única desdobrada para permitir um processamento mais eficiente do pré-mRNA. Esta proteína nuclear forma um complexo com um conjunto específico de proteínas, formando partículas de ribonucleoproteínas nucleares heterogêneas (hnRNPs).

1.2.1 O papel da proteína HNRNPC1/C2 nos processos biológicos

HNRNPC1/C2 é uma proteína envolvida em vários processos biológicos desempenhando diferentes funções moleculares, tem a capacidade de se ligar a proteínas idênticas formando tetrâmeros (Rual et al., 2005; Hegele et al., 2012), pode reconhecer e se unir a sequências poli(U) no 3'-UTR e 5'-UTR mRNA estabilizando o mRNA (Shetty, 2005). Ela também reconhece e se liga ao RNA contendo modificações de N6-metiladenosina, permitindo a formação dos complexos ribonucleoproteicos e o montagem do spliceosome (Liu et al., 2015; Swanson et al., 1987; Jurica et al., 2002). Se liga ao DNA nucleossômico formando parte do complexo remodelador da cromatina (Mahajan et al., 2005). Faz parte do complexo enzimático da RNA telomerase regulando negativamente a manutenção dos telômeros, a superexpressão da HNRNPC1/C2 induz encurtamento de telômeros (Fu e Collins, 2007; Ford et al., 2000) e interage com IGF2BP1 modulando a taxa de transcrições e localização de alguns mRNA (Weinlich et al., 2009).

Os complexos tetraméricos de HNRNPC1/C2 classificam os transcritos da RNA polimerase II (Pol II) de acordo com seu comprimento, estas proteínas podem se unir a pre-mRNAs assim como com mRNA sem introns, mas não podem se ligar a pequenos RNAs (Köhler e Hurt, 2007; Maniatis e Reed, 2002). As proteínas HNRNPC1/C2 comportam-se como uma régua molecular ligando-se seletivamente às regiões de pré-mRNA não estruturadas com mais de 200 a 300 nucleotídeos e vão classificar os transcritos em duas categorias: RNA longos (>200nt) que serão exportados como mRNA ou RNA pequenos que serão exportados como pequenos RNAs nucleares rico em uridina (U snRNA), independentemente das sequências (McCloskey et al., 2012; Masuyama et al., 2004).

As proteínas HNRNPC1/C2 além de empacotar o mRNA nascente, também têm funções em outros processos biológicos. De todas hnRNPs, só HNRNPC e HNRNPU se associam com hTR (RNA telomerase humana), independentemente da presença do hTERT (Transcriptase reversa da telomerase humana). O sítio de ligação para a HNRNPC1/C2 mapeia para uma sequência de 5-6 bases de uridilato localizado diretamente 5' da região molde da hTR (Fu e Collins, 2007; Ford et al., 2000). Depleção transiente de HNRNPC ou HNRNPU não tem impacto sobre a síntese dos telômeros, mas a superexpressão destas duas hnRNPs gera um encurtamento progressivo dos telômeros. Curiosamente, a superexpressão de HNRNPA1 gera um alongamento dos telômeros (LaBranche et al., 1998). O possível papel da HNRNPC ao interagir com a hTR seria direcionar a dinâmica da localização das RNPs da telomerase. A localização da hTR muda ao longo do ciclo celular (Jády et al., 2006; Tomlinson et al., 2006), e as proteínas HNRNPC e HNRNPU compartilham a distinção de retenção nuclear em vez de deslocamento entre o núcleo e o citoplasma. Estas duas proteínas permitiriam a retenção das RNPs da telomerase no núcleo. No entanto, a superexpressão de hnRNP C ou hnRNP U poderia induzir o encurtamento dos telômeros sequestrando a maioria do pool das RNP da telomerase longe dos telômeros (Dreyfuss et al., 2002).

HNRNPC1/C2 tem um papel muito importante na estabilidade de alguns mRNA. A regulação da estabilidade dos mRNA tem um papel muito importante na expressão gênica eucariótica; diferentes mRNAs exibem meias-vidas características e sua estabilidade é um dos principais determinantes da sua abundância. Portanto regulação do decaimento do mRNA é um processo potencialmente importante na determinação do nível de expressão gênica (Schoenberg e Maquat, 2012). HNRNPC reconhece e se liga ao 3'UTR do uPAR mRNA, regulando a expressão do uPAR no nível pós-transcricional, desde que HNRNPC liga-se ao mRNA de uPAR 3'UTR mas não altera a síntese de mRNA de uPAR (Shetty, 2005-c). A importância deste mecanismo vem do papel que uPAR desempenha em doenças como o câncer; a ligação de uPA para o receptor uPAR na superfície de células malignas

estimula o crescimento das células tumorais e o processo de metástase, através de processos como remodelação tecidual, invasão de células tumorais, adesão celular e proliferação celular (Mazar et al., 1999). Além disso a invasão de células tumorais derivadas de epitélio também é facilitada pela saturação de uPAR com uPA suplementado exogenamente ou uPA endógeno superexpresso (Hollas et al., 1992).

HNRNPC1/C2 também reconhece o remodelamento estrutural gerado pela modificação pós-transcricional m6A (N6-methyladenosine) em transcritos de RNA. A N6-metiladenosina demonstrou alterar a estrutura local em mRNAs e RNAs longos não-codificantes (lncRNAs) por meio de um mecanismo denominado 'm6A-switch', facilitando a ligação de HNRNPC, levando à regulação do processamento de mRNA (Liu et al., 2015), e influenciando a expressão gênica e a maturação no núcleo (Wang et al., 2014). m6A também afeta a maturação do mRNA através da interferência com as atividades de ligação de reguladores pós-transcricionais (Dominissini et al., 2012; Zhao et al., 2014), e elas podem recrutar outros fatores como as proteínas de domínio YTH para desestabilizar as estruturas do RNA e facilitar a ligação do HNRNPC (Liu et al., 2015).

HNRNPC1/C2 é rapidamente fosforilada em resposta à aplicação de baixas concentrações de H_2O_2 em células endoteliais humanas. Sob condições de repouso as proteínas HNRNPC estão presentes principalmente no estado bifosforilado, com algumas espécies monofosforiladas e trifosforiladas, nos resíduos Ser247 e Ser286. Após estímulo com baixas concentrações de H_2O_2 , há um rápido aumento no nível de fosforilação, com um aumento na quantidade de espécies trifosforiladas e a formação transitória de algumas proteínas quatrifosforiladas, no resíduo Ser240 e em um dos quatro resíduos de serina contíguos de Ser225-Ser228 (Stone e Collins, 2002). *in vitro*, demonstrou-se que a presença de mRNA modula o estado de fosforilação da proteína e que a fosforilação da proteína regula sua afinidade por mRNA (Mayrand et al., 1993; Fung et al., 1997; Mayrand et al., 1996). Em células Hela, durante a mitose o nível de fosforilação de HNRNPC1/C2 é maior comparado com as proteínas das células em interfase (Piñol-Roma e Dreyfuss, 1993). A

proteína quinase CK2 fosforila hnRNP1/C2 no seu resíduo Ser247 (Holcomb e Friedman, 1984), indicando que o domínio C terminal da HNRNP1/C2 serve como o local para a fosforilação basal e estimulada regulando possivelmente algumas das funções dos complexos de HNRNP1/C2 (Stone et al., 2003). As quinases responsáveis pelos outros locais de fosforilação permanecem desconhecidas até o momento. A identificação das quinases e fosfatases que atuam sobre HNRNP junto com os mecanismos de ativação/desativação e as alterações estruturais e funcionais resultantes da fosforilação devem permitir uma compreensão muito melhor dos mecanismos pelos quais a ligação de mRNA por HNRNP1/C2 é regulada.

HNRNP1/C2 tem sido identificada como uma proteína celular que interage especificamente com uma sequência heptamérica de uridinas na sequência IRES (local de entrada ribossômica interno, do inglês **I**nternal **R**ibosome **E**ntry **S**ite) do mRNA de c-myc localizado entre dois códons de iniciação de tradução alternativos CUG e AUG, mais especificamente na região 5'UTR (Kim et al., 2003). O proto-oncogene c-MYC desempenha um papel fundamental na proliferação, diferenciação, apoptose e regulação do ciclo celular (Pelengaris et al., 2002). A interação de HNRNP1/C2 com o mRNA de c-myc aumenta a tradução deste transcrito na fase G2/M do ciclo celular quando a tradução dependente de cap é parcialmente inibida. As proteínas HNRNP são majoritariamente nucleares na interfase, embora na fase G2/M move-se para o citoplasma parcialmente. Este dado sugere que o HNRNP C, via ligação ao IRES, modula a tradução do mRNA de c-myc de maneira dependente da fase do ciclo celular (Kim et al., 2003). Outro estudo destaca o papel da HNRNP1/C2 na iniciação da tradução do mRNA de Unr durante a mitose (Schepens et al., 2007). O mecanismo pelo qual as proteínas C se translocam do núcleo para o citoplasma para atuar na regulação da mitose não está claro, mas tem-se descrito a importância da interação da HNRNP1/C2 com o lncRNA MALAT-1 para a translocação desta proteína para o citoplasma na fase G2/M (Yang et al., 2013). MALAT-1 é muito abundante no núcleo e transloca parcialmente do núcleo para o citoplasma na fase G2/M (Clark e Mattick, 2011).

Recentemente tem se associado este lncRNA com a formação de nódulos tumorais e em muitos contextos biológicos onde atua ligando diretamente fatores proteicos ou orientando complexos lncRNA-proteínas para seus locais-alvo para regular a expressão gênica (Gutschner et al., 2013; Wang e Chang, 2011). O silenciamento de MALAT-1 compromete a translocação de HNRNPC1/C2 na fase G2/M, mas também levou à paragem do ciclo nas fases G1/S e G2/M em células cultivadas (Yang et al., 2013). Outro efeito da regulação negativa de MALAT-1 é uma queda na expressão de genes que apresentam sequências IRES, por exemplo, o gene PITSLREp58 e Unr (Petretti et al., 2006; Schepens et al., 2007). A interação entre MALAT-1 e hnRNPC é crítica para a translocação citoplasmática das proteínas HNRNPC, o lncRNA interage com HNRNPC1/C2 no núcleo em interfase e quando as células progridem para a fase G2/M, facilita a translocação do HNRNPC do núcleo para o citoplasma. Já no citoplasma as proteínas HNRNPC estimulam a tradução dependente de IRES e aumenta os níveis de proteína CDK11/PITSLREp58 na mitose. A proteína CDK11/PITSLREp58 regula o ciclo celular participando em processos como a maturação de centríolos e a formação do fuso mitótico bipolar durante a fase da mitose (Petretti et al., 2006).

Outro processo importante no qual o HNRNPC participa, é a regulação dos elementos de Alu e sua inserção durante processamento alternativo. Os elementos Alu são os elementos transponíveis mais abundantes no genoma humano, na sua sequência contém sítios de processamento crípticos característicos que são usados sob circunstâncias raras. A ligação competitiva entre HNRNPC e a subunidade do fator auxiliar U2 de 65 kDa (U2AF65) é chave no reconhecimento do sítio de processamento, e é o mecanismo pelo qual a incorporação aberrante de elementos Alu é controlada (Zarnack et al., 2013). Estas duas proteínas competem por sítios de ligação ao RNA, particularmente nos motivos de polipirimidina de exons alternativos que o HNRNPC reprime (Huelga et al., 2012; Fu e Ares Jr, 2014).

A HNRNPC1/C2 fosforilada é capaz de regular a tradução do mRNA de p53 por ligação a um elemento que atua em cis no final 5' da região codificadora do mRNA, mostrando a influência desta ribonucleoproteína sobre a expressão da proteína supressora do tumor antes e durante a apoptose em resposta aos processos de dano no DNA (Christian et al., 2008). HNRNPC1/C2 se liga também às moléculas de DNA, sob condições de estresse que provocam danos na fita dupla de DNA (DSB), esta ribonucleoproteína se liga especificamente e fortemente às regiões danificadas de DNA, através da sua interação com a proteína Ku70 e a proteína quinase dependente de DNA (DNA-PK) participando do reparo de DSB através da via NHEJ (Lee et al., 2005). Nestes estudos, também se observou que HNRNPC1/C2 é um dos principais componentes da matriz nuclear, mantendo-se firmemente ligada e mantendo a sua localização mesmo após estresse pela radiação.

HNRNPC1/C2 interage com DUSP3 sob condições com e sem radiação, a sua localização foi similar à apresentada pela enzima DUSP3, além disso a sua localização não muda antes e após do tratamento com radiação gama (Panico e Forti, 2013). Estes resultados juntamente com estudos anteriores e aos dados não publicados do grupo do LSSB que mostram co-localização da proteína DUSP3 com a proteína MAPK p38, ajudam a reforçar a hipótese de interação entre HNRNPC1/C2 e DUSP3. Através de ensaios de Co-imunoprecipitação foram isolados complexos nos quais DUSP3 pode estar envolvido, mostrando uma forte interação entre DUSP3 e NPM, seguido pela interação entre DUSP3 e HNRNPC1/C2 e finalmente a interação entre DUSP3 e NUCL, sendo este último o mais fraco. A interação de DUSP3 e as proteínas HNRNPC levanta a questão de saber se a ausência da fosfatase teria um efeito sobre as diferentes funções que o HNRNPC1/C2 teria dentro da célula.

1.3 Biogênese de ribossomos

A síntese e maturação de ribossomos é fundamental para a célula e demanda uma grande quantidade de energia, consumindo uma vasta porção de metabólitos celulares e moléculas energéticas. A biogênese do ribossomo ocorre principalmente no nucléolo, sendo finalizada posteriormente no nucleoplasma e no citoplasma (Derenzini et al., 2017). Notavelmente, a biogênese dos ribossomos eucarióticos depende da ação conjunta de todos os três mecanismos de transcrição, RNA polimerases I, II e III (Pol I, Pol II e Pol III), que devem ser coordenados para garantir a alta eficiência e precisão da produção de ribossomos. Pol I produz 28S, 5.8S e 18S rRNA, Pol III sintetiza 5S rRNA, enquanto Pol II transcreve os mRNAs para as proteínas ribossômicas. Em mamíferos, a Pol I produz o precursor 47S que então é processado para gerar os rRNA 18S, 5.8S e 28S maduros. O 5S sintetizado pela Pol III é transcrito no nucleoplasma e importado para o nucléolo. Os mRNA das RPs são transcritos pela Pol II no nucleoplasma e importados para o citoplasma (Odintsova et al., 2003; Vladimirov et al., 1996).

A biogênese do ribossomo é o resultado de uma série de etapas coordenadas. A primeira etapa ocorre no nucléolo onde o DNA ribossomal (rDNA), com cerca de 400 cópias de genes ribossômicos, é transcrito. A célula requer montar um complexo multiproteico que inclui a Pol I e vários fatores de iniciação da transcrição basais e o promotor do rDNA. Os rRNAs processados são associados com proteínas ribossômicas (RPs) para formar a subunidade grande 60S e a subunidade pequenas 40S dos ribossomos maduros. A subunidade 60S contém uma cópia dos rRNAs 28S, 5.8S e 5S, junto com 47 proteínas ribossômicas (chamadas RPLs), enquanto a subunidade 40S contém apenas uma cópia do rRNA 18S e 32 proteínas ribossômicas (chamadas RPSs). As duas subunidades 40S e 60S migram para o citoplasma onde formam a partícula final 80S do ribossomo maduro. É importante mencionar que durante o processo de formação do ribossomo, mais de 150 proteínas não ribossômicas e cerca de 70 snoRNAs estão envolvidos (Fatica e Tollervey, 2002; Fromont-Racine et al., 2003; Kressler et al., 2010; Tschochner e Hurt, 2003). O

resultado final de tal esforço espacial e temporalmente coordenado é que, em uma célula de levedura em crescimento, a cada segundo, 40 ribossomos nascentes deixam o nucléolo, o principal local de montagem do ribossomo, para exportação para o citoplasma (Tschochner e Hurt, 2003). A distribuição aproximada de RNA é 80% rRNA, 15% tRNA e 5% mRNA. O genoma da levedura é 1.4×10^7 pb comparado com os 5469 nt do rRNA nos ribossomos, portanto, existem cerca de 200.000 ribossomos por célula. O tempo de geração é de ~ 100 minutos de uma levedura, portanto deve produzir 2000 ribossomos por minuto (Warner, 1999). Apesar da capacidade de síntese dos ribossomos, a sua taxa de produção na célula é estritamente dependente da atividade da Pol I, sendo a taxa de transcrição do rRNA a etapa limitante na biogênese do ribossomo (Kopp et al., 2007).

Figura 4 – Modelo atual de maturação e exportação de subunidades ribossômicas 40S e 60S.. Modelo da maturação e exportação de subunidades ribossômicas 40S e 60S. A partícula precursora ribossômica mais antiga é o precursor 'clássico' 90S composto por 35S pré-rRNA (45S em mamíferos), o grande processossome U3 snoRNP contendo U3 e outros fatores de síntese 40S. Após a clivagem no local A2, o precursor 90S se separa nas pré-subunidades 40S e 60S. O processossome se dissocia das partículas pré-40S derivadas, mas alguns fatores adicionais se unem às subunidades 40S nascentes antes da saída do núcleo. A maioria dos fatores pré-60S se reúne durante ou após a clivagem em A2. Durante o movimento do nucléolo em direção ao poro nuclear, muitos dos fatores pré-60S desmontam-se da subunidade nascente em etapas subsequentes, enquanto algumas proteínas se associam transitariamente em estágios posteriores. A maturação final ocorre após a passagem pelo poro nuclear. Tomado de Tschochner e Hurt, 2003

Contudo, a regulação da biogênese do ribossomo permite aumentar a síntese de proteínas incrementando a taxa de síntese de rRNA (Thomas, 2000; Conlon e Raff, 1999). A proliferação celular deve ser estreitamente coordenada com os mecanismo da biogênese de ribossomos; a correta resposta da maquinaria da síntese de ribossomos ao estímulos de proliferação é necessária para a progressão celular através das fases do ciclo celular, e a obtenção de um complemento ribossômico adequado durante a fase G1 possibilita que a célula supere o checkpoint G1/S, que define o limite além do qual a célula está comprometida a se dividir independentemente do crescimento (Volarević et al., 2000; Derenzini et al., 2005; Pardee, 1989).

1.4 Síntese de proteínas

A síntese de proteínas ocorre no citoplasma, no também chamado processo de tradução, e de forma geral este processo está dividido em três etapas: iniciação, alongamento e término. Alguns fatores que podem afetar a taxa de síntese de proteína são a disponibilidade de ribossomos livres, o qual é um parâmetro limitante no processo de tradução (von der Haar, 2012), mas também qualquer alteração na homeostase dos ribossomos pode afetar o processo de tradução (Bielczyk-Maczyńska et al., 2015; Chung et al., 2015). Características específicas dos mRNAs também tem um impacto na taxa de tradução, a presença de quadros de leitura abertos upstream (uORFs) e locais internos de entrada dos ribossomos (IRES) na sequência de mRNA podem exercer uma influência crescente na frequência de iniciação da tradução em resposta à escassez de ribossomos (Raveh et al., 2016).

Recentemente, sabe-se que a estrutura complexa dos ribossomos também vai fornecer outra camada de controle translacional da expressão gênica. A heterogeneidade na composição das RPs e rRNA apoia o conceito de ribossomo especializado (Xue e Barna, 2012). Vários estudos mostram a estequiometria diferencial entre as RPs que constituem o núcleo ribossômico, em procariotos (Hardy, 1975; Weber, 1972) e eucariotos (Westermann

et al., 1976; Slavov et al., 2015). Assim também, modificações químicas como metilação da base, pseudouridilação e metilação da ribose em 2'-hidroxila (2'-O-metilação) no padrão químico do rRNA podem representar um novo caminho para a especialização funcional do ribossomo (Erales et al., 2017; Marcel et al., 2013). No mecanismo da síntese, a iniciação da tradução é a etapa limitante mais importante (Sonenberg e Hinnebusch, 2009). No modelo canônico de início da tradução dependente de cap, a subunidade menor do ribossomo, 40S, é recrutada para uma base modificada no extremo 5' terminal do mRNA, o m7G cap. O início da tradução é coordenado por um complexo de fatores de iniciação eucarióticos (eIFs) chamado eIF4F, que está composto por: a proteína andaime grande eIF4G que facilita as interações entre as outras proteínas do complexo e a subunidade 40S, eIF4E que reconhece a estrutura m7G cap 5' terminal do mRNA e a RNA helicase eIF4A que processa as estruturas secundárias do RNA que inibem a tradução. O complexo eIF3 está associado à subunidade ribossomal 40S e evita que a subunidade ribossômica grande se ligue prematuramente ao 40S. O eIF3 também interage com o complexo eIF4F. Finalmente, a proteína de união a poli (A) (PABP) interage com eIF4G e com eIF4B, circularizando o mRNA e estabilizando o complexo. Após a formação do complexo eIF4F/mRNA/40S/eIF3 e a união com PABP/eIF4B, vai se adicionar o complexo ternário. O complexo ternário é composto por eIF2, metionil-tRNAi e GTP (Sonenberg e Hinnebusch, 2009; Bushell et al., 2001). A subunidade 40S do complexo, faz a varredura ao longo do 5'UTR do mRNA procurando o códon de iniciação. O reconhecimento do códon de iniciação causa a hidrólise do eIF2-GTP, desacoplamento do tRNAi do eIF2 e liberação de fatores de iniciação. Por último, a subunidade 60S ribossômica é recrutada formando o ribossomo 80S, e começando a tradução (Jackson et al., 2010). O ribossomo 80S pode decodificar um mRNA a uma taxa de 5,6 códons por segundo (Zaher e Green, 2009).

A regulação da síntese de proteínas na célula, em resposta a variações do seu meio ambiente, estresse ou ciclo celular, é um mecanismo que depende principalmente da modulação dos estados de fosforilação dos eIFs por quinases e fosfatase em resposta ao

estresse. O mecanismo principal para a inibição da tradução global é a fosforilação do fator de iniciação eIF2. Quando eIF2 é fosforilado no resíduo Ser51 da subunidade α , ele impede a reciclagem do eIF2 e reduz a taxa de tradução, diminuindo a concentração do complexo ternário. As quinases GCN2, PERK, HRI e PKR controlam a formação do complexo ternário em células de mamíferos, sendo ativadas por diferentes estímulos externos (Dever, 1999). Outro mecanismo que permite a redução global da síntese de proteínas é baseado na interferência no reconhecimento do extremo m7G cap (Raught e Gingras, 2007). As proteínas de ligação a eIF4E (4EBPs) competem com eIF4G pelo sítio de ligação no eIF4E e previnem a formação de complexo eIF4F (Marcotrigiano et al., 1999). A fosforilação das proteínas 4EBPs reduz a força de união entre estas proteínas e o eIF4E, no seu estado hipofosforilado ligam-se fortemente ao eIF4E e inibem a formação do complexo eIF4F. Sob este mecanismo de inibição, a tradução dependente de cap é inibida durante a fase mitótica do ciclo celular pela hipofosforilação da proteína 4E-BP1, e pela hiperfosforilação do fator de iniciação eucariótica eIF4GII (Pyronnet et al., 2001).

Um mecanismo particular de síntese de proteínas que é ativado sob condições de estresse é a tradução dependente de IRES, explicada na seção 1.5. Os fatores de transativação IRES (ITAF, do inglês IRES trans-acting factors) que recrutam a subunidade menor do ribossomo ao mRNA independentemente de CBC são variados. Mudanças na abundância ou atividade desses ITAFs permitem o controle preciso da tradução mediada por IRES, e este mecanismo geralmente é usado durante condições de estresse quando a tradução dependente de cap é comprometida (veja a parte 1.5). De acordo com o tipo de estresse, um mecanismo diferente de regulação da síntese de proteínas será ativado. O controle de tradução após danos no DNA, ativa uma série de redes de sinalização que são chamadas em conjunto “resposta ao dano no DNA (DDR)”. O resultado da resposta ao dano no DNA pode ser de parada do ciclo celular ou apoptose, e a decisão final dependerá da gravidade e natureza do dano ao DNA afetado (Jackson e Bartek, 2009).

A Radiação UV, gera no DNA dímeros de ciclopirimidina e 6-4 fotoprodutos que requerem excisão e reparo pela via de reparo de excisão de nucleotídeos (NER) (Shuck et al., 2008). A via de sinalização da DNA-PKcs seria o enlace entre a maquinaria de resposta ao dano no DNA, a ativação da quinase GCN2 e a inibição da translação através da fosforilação da eIF2 α . Após UV, a tradução global é inibida através da fosforilação no resíduo Ser51 do eIF2 α , mecanismo chave na resposta a UV. A fosforilação do eIF2 α reduz o nível do complexo ternário, resultando em uma diminuição geral do início da tradução. eIF2 α mutante (Ser51Ala) ou a falta da sua quinase upstream, GCN2, não conseguem inibir a tradução (Deng et al., 2002).

Embora a tradução global seja inibida como resultado do dano ao DNA, alguns mRNA são traduzidos. Esses transcritos contêm elementos dentro da sua sequência 5'UTR ou 3'UTR geralmente, que permitem a regulação seletiva e específica desses mRNAs. Por exemplo a proteína tumor supressor p53 (Yang et al., 2006), as proteínas anti-apoptóticas XIAP e BCL2 (Gu et al., 2009; Sherrill et al., 2004), etc.

1.5 Tradução dependente de IRES

O local interno de entrada ao ribossomo (IRES) é uma região do mRNA que recruta o ribossomo, e assim promove a iniciação da tradução independentemente do complexo de união a 7mG cap (CBC). Ainda não está claro se a atividade pode ser atribuída a uma sequência comum ou a uma estrutura secundária comum nelas presente. A tradução dependente de IRES não requer atividade de mTOR e é independente da ligação do complexo eIF4F. Como já foi mencionado, este mecanismo é mediado por ligação direta de uma sequência IRES no 5'UTR do mRNA ao ribossomo, e facilitada ou inibida por complexos de proteínas de união a RNA nomeadas ITAF (do inglês IRES-transacting-factors) (Jang e Wimmer, 2002). Estes complexos podem ser formados por alguns fatores canônicos de iniciação da tradução e por proteínas de união ao RNA (http://www.iresite.org/IRESite_web.php?page=ITAFs_of_cellular_IRESs).

A composição do complexo ITAF, contendo proteínas de união aos RNAs específicos ou fatores de iniciação canônicos, varia entre os mRNAs contendo IRES (Jang e Wimmer, 2002). Entre os mRNA que contêm IRES pode se mencionar: multifuncional c-myc (Nanbru et al., 1997; Stoneley et al., 1998), o proto-oncogene fator de crescimento derivado de plaquetas 2 (PDGF2)/c-sis (Bernstein et al., 1997), inibidor do apoptose ligado ao X relacionado na sobrevivência e morte celular (XIAP) (Holcik et al., 1999), o fator de ativação de protease apoptótica 1 (Apaf-1) (Coldwell et al., 2000), o fator de crescimento de fibroblastos humano 2 (FGF-2) (Vagner et al., 1995), o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (Huez et al., 1998), ornitina descarboxilase (ODC) (Pyronnet et al., 2000), a CDK11/ p58PITSLRE quinase (Cornelis et al., 2000), p27kip1 (Zheng e Miskimins, 2011), e vários outros.

Sob condições de estresse, a tradução global é inibida (Pyronnet et al., 2001). Quando a tradução dependente de cap é inibida, vários estudos sugerem que HNRNPC1/C2 modula a tradução dependente de IRES de algumas proteínas essenciais para respostas a determinado estímulo. Algumas das interações já descritas entre as proteínas HNRNPC e seus alvos mRNA incluem: HNRNPC1/C2 interage com a sequência U heptamérica dentro do IRES do mRNA c-myc. Lembrando que as proteínas HNRNPC são parcialmente redistribuídas entre o núcleo e o citoplasma de forma dependente do ciclo celular e na interfase a maior parte destas proteínas reside no núcleo, enquanto na fase G2/M uma porção migra para o citoplasma (Millard et al., 2000). Portanto a tradução de mRNA c-myc é aumentada durante a fase G2/M quando a tradução global é inibida, sugerindo que a tradução dependente do IRES de c-myc é regulada por HNRNPC1/C2 de uma maneira dependente de fase do ciclo (Kim et al., 2003). O aumento na tradução do mRNA c-myc através do IRES é um mecanismo para manter um nível constante da proteína c-MYC ao longo do ciclo celular, já que a tradução dependente de cap da maior parte dos mRNAs diminui na fase mitótica do ciclo celular (Stoneley et al., 2000; Pyronnet et al., 2001).

Outro mRNA que é regulado por HNRNPC1/C2 é p27^{kip1}. Durante a fase G2/M HNRNPC interage com o IRES presente no mRNA p27^{kip1}, a proteína traduzida deste mRNA desempenha um papel fundamental na regulação do ciclo celular através da inibição da complexo ciclina E/cdk2 (Millard et al., 2000; Sherr e Roberts, 1999). Além das HNRNPC, as proteínas HuR e PTB também se unem ao IRES do mRNA p27^{kip1} localizado na região rica em U a 40nt upstream do códon de iniciação de tradução (Kullmann et al., 2002; Cho et al., 2005). As proteínas c-MYC e p27^{KIP1} também desempenham papéis críticos na progressão da fase G1/S; PTB reconhece o IRES do p27^{kip1} mRNA e modula a transição da fase G1/S (Cho et al., 2005). Dessa forma é possível que HNRNPC também tenha um papel na regulação das funções das proteínas c-MYC e p27^{KIP1} na transição G1/S. O mRNA Unr é regulado por três proteínas que reconhecem a região IRES deste transcrito. HNRNPC1/C2 liga-se ao IRES do mRNA Unr estimulando a tradução desta proteína. Enquanto as proteínas PTB e UNR se ligam à mesma região inibindo a tradução dependente de IRES. Durante a mitose, o aumento da tradução dependente de IRES de Unr resulta da ligação das proteínas HNRNPC ao mRNA Unr e da dissociação das proteínas PTB e UNR do IRES mRNA Unr. Aparentemente, na mitose há uma cascata de sinalização mediada por IRES compreendendo as proteínas HNRNPC1/C2 que estimulam a tradução de Unr e este último junto com as proteínas HNRNPC contribui para o reconhecimento da sequência IRES no p58PITSLRE mRNA (Tinton et al., 2005; Schepens et al., 2007). A tradução na fase G2/M dependente de IRES da quinase CDK11/p58PITSLRE, gera uma isoforma exclusiva da fase mitótica a qual é necessária para a maturação dos centrosomos e a formação do fuso mitótico bipolar durante a mitose (Cornelis et al., 2000; Petretti et al., 2006). HNRNPC também regulam a tradução dependente de IRES do PDGF2/c-sis mRNA, HNRNPC1/C2 interage com parte do extremo 5'N terminal do PDGF2/c-sis mRNA que contém um elemento IRES ligado à diferenciação (Sella et al., 1999). Estes dados envolvem a HNRNPC1/C2 em vários processos biológicos além da formação das partículas 40S. A interação com DUSP3 poderia modular estes processos através da regulação da força de

união do seu domínio RRM com sus mRNA alvos, desfosforilando tirosinas nos domínios das proteínas C e desencadeando mudanças conformacionais que enfraquecem a força da interação proteína – RNA.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar o efeito do silenciamento da fosfatase DUSP3 nas funções da proteína heterogênea nuclear HNRNPC1/C2.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar o nível de fosforilação da proteína HNRNPC1/C2 nas células silenciadas para DUSP3 (DUSP3-).
- Analisar a expressão do pre-rRNA 45S e o processamento dos rRNA 5.8S, 18S e 28S em células normais e DUSP3-, através de primers específicos e PCR em tempo Real.
- Analisar a tradução global e a montagem das subunidades ribossômicas em células normais e DUSP3-, através da análise do perfil de polirribossomos.
- Avaliar a distribuição das proteínas de interesse nas frações obtidas da análise de perfil de polirribossomos (subunidades ribossômicas, monossomas e polirribossomos).
- Analisar a expressão dos genes c-myc e xiap em condições controle em células normais e DUSP3-, a traves de primers específicos e PCR em tempo Real, e sua expressão proteica dependente de ciclo e sob estresse.
- Analisar a interação in vitro das proteínas p53 e HNRNPC em lisados de células normais e deficientes de DUSP3, através de ensaios de co-imunoprecipitação.
- Análise da transcrição global em condições controle e sob estresse de células normais e deficientes para DUSP3.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura de células

As células utilizadas para os ensaios foram: a linhagem de fibroblastos normais embrionários de pulmão humano MRC-5V1 (MRC-5) imortalizada com SV-40 e transduzidas com partículas lentivirais contendo construções plasmidiais que codificam shRNA com uma sequência que não inibe qualquer proteína (MRC5 Mock) e outras com sequência que inibe a proteína DUSP3 (MRC5 2A) (Huschtscha e Holliday, 1983). A linhagem XP12RO derivada de biópsia de pele de pacientes que possuíam deficiência no reparo de DNA por NER, imortalizadas com SV-40 e também transduzidas com as mesmas partículas lentivirais que codificam shRNA com uma sequência que não inibe qualquer proteína (XPA Mock) e outras com sequência que inibe a proteína DUSP3 (XPA 2A) , estas células possuem uma mutação no gene XPA, sendo deficiente nas duas subvias de reparo por NER (Satokata et al., 1992) e por isso o nome clonal que lhe foi atribuído. A linhagem A549 (adenocarcinoma epitelial pulmonar) foi gentil doação da Profa. Dra. Daniela Bassères. As células foram tratadas com Plasmocin™ (InvivoGen) por duas semanas, seguindo instruções do fabricante, para livrá-las de contaminação por Mycoplasma sp. As linhagens celulares foram mantidas em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Life Technologies), contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab), 0,025 g/L de penicilina (Sigma-Aldrich) e 0,1 g/L de estreptomicina (Life Technologies) a 37 °C em atmosfera umidificada constituída de 5% de CO₂ e 95% de ar.

3.2 Sincronização de células G₀/G₁, G₁/S e G₂/M

Para obter células sincronizadas na fase G₀/G₁, placas previamente semeadas com células e com uma confluência de ~70% foram lavadas duas vezes com PBS a 37 °C. A seguir, meio deficiente em soro contendo 0.1% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab), a 37 °C, foi adicionado e as placas incubadas por 48 horas. Após o tempo de tratamento, meio fresco foi adicionado às placas e foi quantificado o tempo de liberação para 15 min, 1h e 3h.

Para sincronização na fase G₁/S, foi usado o método de bloqueio duplo como timidina. Meio contendo 2 mM de timidina, a 37 °C, foi adicionado às placas com 30% de

confluência de células, e incubadas por 18 h. Após o tratamento, as placas foram lavadas duas vezes com PBS, a 37 °C, e foi adicionado meio sem timidina a 37 °C e se deixou por 9 horas no tempo de liberação na estufa a 37 °C. Após, novamente as células foram tratadas com meio contendo 2mM de timidina e incubadas por 18 h, 37 °C. Finalmente, as células foram lavadas duas vezes com PBS aquecido e liberadas com meio sem timidina. Os tempos de liberação foram 15min, 1h e 3 h.

Para sincronização em G2/M, utilizou-se Nocodazol. Culturas celulares com 75% de confluência foram crescidas por 18h na presença de Nocodazol 330nM (concentração final) em meio completo com 10% SFB. Após este tempo, as placas foram lavadas duas vezes com PBS a 37 °C, e liberadas a reentrar no ciclo por adição de meio fresco com 10% SFB. Os tempos de liberação foram 15 min, 1h e 3h.

3.3 Irradiação das linhagens celulares

As células semeadas em placas foram lavadas com PBS 37 °C e irradiadas com UVC usando a própria lâmpada da cabine de segurança biológica (Esco classII BSC). As células foram irradiadas com doses altas ou baixas conforme o tratamento (dose alta UVC 28 J/m²; dose baixa 6 J/m²). O tempo de exposição foi previamente determinado com o dosímetro VLX 3W (Vilbert Lourmat). Após os tratamentos, o meio de cultura foi sistemática e imediatamente trocado e as células foram retornadas à incubadora, nas próprias placas de cultura para posteriores experimentos. Após os tempos de recuperação as células foram lisadas de acordo com o devido protocolo descrito.

3.4 Ensaio de inibição da síntese proteica

Placas em estado de confluência foram tratadas com cycloheximide (CHX) a uma concentração final de 150 ug/ml. Solução-mãe de cycloheximide 10 mg/ml foi preparada no dia do ensaio e usada para preparar meio DMEM com CHX na concentração desejada. As células foram mantidas por um período de até 8 horas no meio contendo CHX.

3.5 Preparação dos lisados celulares totais e quantificação

Para a obtenção do lisado proteico total, as células foram plaqueadas em placas p100 até atingirem uma densidade celular de aproximadamente 80% de confluência. As placas com uma confluência desejada foram tratadas de acordo com o ensaio em que eles seriam usados; após o tempo de recuperação, as células foram lavadas duas vezes com PBS gelado e coletadas raspando a placa com espátulas descartáveis. As células foram concentradas por centrifugação a 10.000g por 2 minutos, após o qual foi adicionado 150 μ l de tampão de lise celular RIPA (50mmol/L Tris-HCl pH7.2, 1% Triton X-100, 0,5% deoxicolato de sódio, 0,1% SDS, 500 mmol/L NaCl, 10mmol/L $MgCl_2$) gelado acrescido de inibidores de proteases (2 μ g/mL Leupetina Pepstatina A e Aprotinina, 1 mmol/L PMSF) e, dependendo do ensaio, também foram adicionado inibidores de fosfatases (1mmol/L Ortovanadato de sódio e 1mmol/L fluoreto de sódio). As células foram mantidas em gelo por 10 minutos e centrifugadas a 17.200g por 10 minutos a 4°C para eliminar debris celulares; a fração sobrenadante foi recolhida em tubo novo, aliquoteada e armazenada em freezer -80°C. As proteínas foram quantificadas segundo método de Bradford (Bradford, 1976), em microplacas utilizando Protein Assay (Bio-Rad), utilizando albumina de soro bovino como padrão de concentração de proteína.

Se o lisado celular foi usado para ensaios de co-imunoprecipitação, outros dois tampões diferentes para a lise do pellet foram utilizados:

- Tampão fraco (50mmol/L Tris-HCl pH7.5, 1% IGEPAL® CO-630, 135 mmol/L NaCl, 1.5 mmol/L $MgCl_2$)
- Tampão D2 (50mmol/L Tris pH 7.3, 0.5% IGEPAL® CO-630, 0.5% Triton X-100, 0,1% deoxicolato de sódio, 150 mmol/L NaCl NaCl, 5 mmol/L $MgCl_2$, 2 mmol/L EGTA, 5% glicerol). *Foi adicionado ao final glicerol para se obter uma concentração de 5% de tampão D2.

Para o tampão fraco e D2, foi adicionado ao tampão gelado inibidores de proteases (2 μ g/mL Leupetina Pepstatina A e Aprotinina, 1 mmol/L PMSF) e dependendo do ensaio

também foi adicionado inibidores de fosfatases (1mmol/L Ortovanadato de sódio e 1mmol/L fluoreto de sódio). Em seguida, deixa-se incubando por 30 min no gelo, após o qual o lisado foi centrifugado, alíquotado e quantificado como descrito acima.

3.6 Eletroforese desnaturante de proteínas (SDS-PAGE)

A análise eletroforética das proteínas foi realizada sob condições desnaturantes segundo LAEMMLI, 1970. O gel de poliacrilamida utilizado possuía concentração de acrilamida de 5% no gel de empilhamento e variável no gel separador, de 10%, 13% ou 15%, espessura do gel de 1,5mm e relação acrilamida:bis-acrilamida de 29:1. As corridas eletroforéticas foram realizadas em voltagem constante de 100 V e amperagem variável, em tampão de corrida (192 mM Glicina; 0,1% SDS; 25mM Tris) a temperatura ambiente e os géis foram utilizados para transferência por western blot.

3.7 Western Blot e Immunoblotting

Os géis de SDS-PAGE destinados para transferência das proteínas foram mergulhados em água MilliQ antes da montagem na cuba de transferência. O sistema de transferência usado foi o sistema úmido Mini Trans-Blot, da Bio-Rad, usando tampão de transferência (192 mM Glicina, 20% metanol, 25mM Tris pH8.3) e as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose-Millipore utilizando a 350mA por cuba, e por 1h 30 min até 2h 5 min, a temperatura ambiente (dependente da proteína de interesse a se transferir). Após transferência, as membranas foram coradas com solução do corante Ponceau. As membranas foram bloqueadas com 5% de leite em pó em TBS-T (20 mmol/L Tris-HCl pH 7.6; 137 mmol/L NaCl; 0,1% Tween 20) por 1h sob agitação em temperatura ambiente. Em seguida, foram incubadas com diferentes anticorpos primários poli ou monoclonais: anti-DUSP3 (1:1000, BD Biosciences - 610546), anti-NPM (1:1000, Sigma-Aldrich - B0556); anti-NCL (1:1000, Sigma-Aldrich - N2662), anti-HNRNPC (1:1000, Sigma-Aldrich - R5028), anti-HNRNPC1/C2 (1:1000, Sta. Cruz - sc-32308), anti-p53 (1:1000, Sta. Cruz - sc-56180), anti-p53 (1:1000, Cell Signaling - #2524), anti c-MYC (1:2000, Abcam – ab32072), anti-XIAP (1:1000, Cell Signaling - 2042), anti-PABP (1:1000, Sta. Cruz - sc-

166027), anti-PITSLRE/CDK11 (1:1000, Cell Signaling - 5524), anti-RPS6 (1:1000, Sta. Cruz - sc-74459), anti-RPS6 (1:1000, Sigma-Aldrich - SAB4300484) e anti-RPL26 (1:1000, Sigma-Aldrich - R0655) diluídos em TBS-T e Azida sódica 2 %, o tempo de incubação foi de acordo com as instruções na ficha de dados de cada anticorpo ou padronizado em cada caso. Por fim, as membranas foram incubadas com o respectivo anticorpo secundário fluorescente, dependendo do animal do anticorpo primário, na diluição de 1:15000 IRDye 800CW ou 680RD (LI-COR Biosciences), por 1h a temperatura ambiente. As membranas foram reveladas utilizando Scanner Odyssey Infrared Image System (LI-COR Biosciences) e as bandas foram quantificadas com auxílio do software Odyssey V 3.0 (LI-COR Biosciences). As bandas foram normalizadas usando um controle de carregamento interno apropriado (Actina), usando os valores normalizados das replicatas biológicas, foi calculado a média ($\bar{X}$) e o desvio padrão de acordo com a fórmula $SD = \sqrt{\frac{\sum(X - \bar{X})^2}{(n-1)}}$.

3.8 Co-Imunoprecipitação

Os ensaios de co-imunoprecipitação foram feitos escolhendo diferentes tampões de lise, RIPA, Tampão fraco ou Tampão D2. A partir de 500 µg de lisado total em 500 µl de volume de reação, incubamos por 30 min, 4°C, sob agitação horizontal, com 10 µL da resina Agarose A/G Plus (Santa Cruz Biotech), como etapa de pre-cleaning. Centrifugamos por 5min, 1000g, e recuperamos o sobrenadante. Prosseguimos incubando o lisado overnight, 4°C, sob agitação horizontal, com 2 µg de anticorpo. Centrifugamos por 5min, 1000g, e recuperamos o sobrenadante. Posteriormente adicionamos 10 µL de resina para incubação por 1h e 30 min, 4°C, sob agitação horizontal. Centrifugamos por 5min, 1000g, recuperamos o sobrenadante e guardamos. Lavamos a resina 2x com o mesmo tampão usado para a lise total (RIPA, Tampão fraco ou Tampão D2), centrifugando por 5 min, 100g, e guardando o sobrenadante cada vez.

3.9 Imunofluorescência

As células semeadas sobre lamínulas foram coletadas em placa de seis poços (35mm) após tratamentos dependendo do ensaio. As lamínulas foram lavadas duas vezes com tampão PBS a temperatura ambiente, por 2 min. Em seguida fixamos as células com uma solução de 3% paraformaldeído e 2% sacarose em PBS, por 10 min, a temperatura ambiente. Após fixação, as lamínulas foram lavadas mais duas vezes com PBS, por 2 min, a temperatura ambiente. Subsequentemente, a permeabilização foi feita com uma solução de 0,5% TritonX-100, 6,85% sacarose e 3 mM $MgCl_2$ em PBS, em gelo, por 5 min. Após o qual, mais duas lavagens foram feitas com PBS, por 2 min, a temperatura ambiente. As lamínulas foram incubadas com uma solução bloqueadora contendo 3% de BSA (Sigma-Aldrich) e 10% de SFB (Cultilab) em PBS, por 30 min, a temperatura ambiente, em câmara úmida. Lavamos mais duas vezes com PBS, por 2 min, a temperatura ambiente, e incubamos com o anticorpo primário. O anticorpo anti-hnRNPC (Sigma-Aldrich - R5028) foi usado numa diluição de 1:500 em uma solução de 3% BSA em PBS, e incubados por 2 horas, a temperatura ambiente, em câmara úmida. Após a incubação, lavamos por mais três vezes com PBS, a temperatura ambiente, por 5 minutos. Em seguida, as lamínulas foram incubadas por mais 1 hora a temperatura ambiente, em câmara úmida, com o anticorpo secundário capaz de reconhecer o anticorpo primário, feito numa solução de 3% BSA em PBS e diluído 1:500. Utilizamos anticorpos anti-mouse (ThermoFisher, AlexaFluor 555). Finalmente, após mais três lavagens com PBS de 5 min cada e a temperatura ambiente, montamos as lamínulas com meio de montagem VECTASHIELD® suplementado com DAPI (VectorLabs), e afixamos com esmalte de unhas sobre uma lâmina de vidro. As imagens foram captadas num microscópio DMI8 da Leica, no aumento de 40x, para a microscopia de fluorescência.

3.10 Ensaio de quantificação da transcrição global

O protocolo seguido foi uma variação do protocolo do manual do Click-iT RNA Alexa Fluor 488 Imaging Kit (Invitrogen). Células semeadas sobre lamínulas numa

confluência de 80% foram incubadas com meio DMEM contendo 2mM 5-etinil-uridina (EU) durante uma hora. Em seguida, as lamínulas foram lavadas duas vezes com PBS contendo 2 mM EU e irradiadas com UVC (6J/m² e 28J/m²) ou não (grupo controle). Imediatamente, foi adicionado o meio DMEM contendo 2mM EU, e se deixou recuperando por 5 ou 15 minutos. Após recuperação, as lamínulas foram retiradas do meio e fixadas com uma solução de 3% paraformaldeído e 2% sacarose em PBS, por 10 min, a temperatura ambiente. Efetuamos duas lavagens com PBS, por 2 min, a temperatura ambiente, antes de fixar novamente com metanol (o metanol foi usado para se eliminar a fluorescência das células GFP positivas), por 20 min, a -20°C. Após mais duas lavagens com PBS, por 5 min, a temperatura ambiente, montamos as lamínulas como descrito acima. As imagens foram captadas num microscópio DMI8 da Leica, no aumento de 40x, para a microscopia de fluorescência.

3.11 Perfil de polisossomos

O protocolo usado foi uma variação do protocolo previamente descrito (Esposito et al., 2010). O número de células semeadas em placas p100 é dependente do tipo celular (MRC5 mock 70x10⁴ células, MRC5 2A 60x10⁴, XPA mock 180x10⁴ e XPA 2A 190x10⁴); as células foram mantidas no meio DMEM 10% soro por dois dias até atingirem uma confluência de ~70%. As placas foram lavadas duas vezes com PBS a 37 °C e submetidas ao tratamento com UVC (28J/m² e 6J/m²). Após o tratamento, foi adicionado meio fresco para as placas e deixamos um tempo de 5 ou 15 minutos de recuperação na incubadora, 5% CO₂, a 37 °C. Foi adicionado cicloheximida (CHX) até uma concentração de 350ug/ml durante 3 min na incubadora, 5% CO₂, a 37 °C. Imediatamente as placas foram lavadas com PBS com CHX 350ug/ml gelado e mantidas sobre gelo. As células foram coletadas por raspagem em PBS gelado com CHX 350ug/ml e centrifugadas a 10 000g por 2 min. Adicionou-se o buffer de lise (TrisHCl pH 7.5 10 mM, Igepal CA-630 SIGMA 2 %, Heparina

0.1 U/ul, DTT 2 mM, 2 µg/mL Leupetina, Pepstatina A e Aprotinina, cicloheximide 100 µg/ml, KCl 1.5 mM, MgCl₂ 2.5 mM) e as células foram incubadas por 15 minutos no gelo, após o qual foram centrifugadas a 8.000 g para clarificar o lisado e coletar o sobrenadante. Uma alíquota de 5 µl foi separada para quantificação das amostras a 260 nm. As amostras foram adicionadas em gradientes lineares de sacarose, feitos com o Gradient Master BIOCOMP (7% - 47% sacarose). Os polissomos foram separados no gradiente linear de sacarose por ultracentrifugação a 40.000 rpm, por 4 horas, a 4 °C, usando o rotor HITACHI P40ST Swing. Frações de 500 µl foram coletadas usando o sistema de coleta automático e monitoradas a 260 nm. Os dados foram coletados e processados com o ALMEMO system e o software ALMEMO VIEW SOFTWARE. Das frações, as proteínas foram precipitadas com etanol 100% (Coudert et al., 2014), sendo que para cada fração de 500 µl adicionou-se 1 ml de etanol 100 % e deixou-se precipitar overnight a -20 °C, após o qual foi centrifugado a 17.200g, por 25 min, a 4 °C. O pellet foi lavado duas vezes com 1 ml de álcool 70% e centrifugado a 17.200g por 25 minutos nas mesmas condições. As proteínas foram ressuspensas em SDS 1% e fervidas a 100 °C, por 10 minutos, e armazenadas em freezer -20°C. A detecção de proteínas de interesse nas frações dos polissomos foi feito pelo método convencional de imobilização das proteínas em membrana de nitrocelulose e o uso de anticorpos específicos para as proteínas de interesse, seguindo os protocolos de eletroforese desnaturante de proteínas (SDS-PAGE) e Western blot descritos.

3.12 Extração e quantificação de RNA

O protocolo usado foi uma adaptação do protocolo disponível no manual do TRIzol™ Reagent (Invitrogen). As células foram semeadas em placas de cultura p100 até atingirem uma confluência de 80% e tratadas com UVC (dose baixa 6J/m²). Findo o tratamento, o meio foi removido e a placa foi lavada duas vezes com PBS a 37 °C. A seguir, a cada placa foram adicionados 300 µl TRIzol™ Reagent, imediatamente o reagente foi espalhado e coletado junto com as células através de raspagem em um tubo de 500 µl. Após homogeneização, as amostras foram incubadas por 3 min a temperatura ambiente, e foi

adicionado 100 μ l de clorofórmio, depois de uma agitação vigorosa por 15 segundos, e as amostras foram incubadas por 3 min sob agitação lenta, a temperatura ambiente. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 12.000g, por 15 min, a 4 °C. Após a obtenção de uma suspensão trifásica, coletou-se a fase que continha RNA em suspensão e adicionou-se 500 μ l isopropanol. Os tubos foram agitados vigorosamente (vortex) durante 15 segundos e incubadas overnight a – 20 °C para precipitar o RNA. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 12.000g, por 10 min, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado obtido foi lavado com 500 μ l de uma solução de etanol 75%, e centrifugado a 7.500g, por 5 min, a 4 °C. O etanol foi remoído e o precipitado de RNA foi deixado secar brevemente a temperatura ambiente. O RNA foi ressuspenso em 50 μ l de água ultrapura (Millipore, MilliQ System) tratada com DPEC, e as amostras foram aquecidas a 60 °C por 5 min. Após, os tubos foram transferidos imediatamente para o gelo e depois armazenadas a -80 °C. A concentração das amostras para os ensaios foi quantificada por meio de medida de absorbância a 260 nm em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific) e com o Qubit™ RNA BR Assay Kit (Invitrogen). Como controle de qualidade da extração, foram aceitos os valores das razões 260/280 e 260/230 com valores entre 1.8 - 2.2. A qualidade dos RNAs também foi avaliada através do Agilent RNA - Bioanalyzer.

3.13 Síntese de cDNA

Após a extração de RNA total, as amostras foram usadas como molde para a síntese de cDNA. O Kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix foi escolhido para a síntese seguindo as instruções do manual do produto. Na síntese de cDNAs dos rRNAs foram usados primers específicos, para cada reação foi adicionado um Mix dos primers reverse a uma concentração de 1 μ M cada um, para 2 μ g de RNA total, num volume final de 20 μ l. Para a síntese de cDNA dos mRNAs foram usados 50 μ M de Oligo(dT)₂₀, por 2 μ g de RNA total, num volume final de 20 μ l. A seguir, a cada amostra contendo o híbrido RNA/primers num tubo de 200 μ l foram adicionados os seguintes reagentes, em ordem:

Primer Oligo(dT)₂₀ (50 μ M), ou mix primers reverse específicos (1 μ M) – 1 μ l

Tampão de anelamento	–	1 ul
H ₂ O MilliQ, tratada com DPEC, livre de nucleases q.s.p	–	8 ul

Cada tubo foi, posteriormente, incubado a 65 °C por 5 min. Imediatamente depois, os tubos foram colocados em gelo por 1 min e centrifugados brevemente, e posteriormente adicionou-se os seguintes reagentes, em ordem:

Mix de reação da primeira cadeia 2X	–	10 ul
Mix de enzima SuperScript™ III/RNaseOUT™	–	2 ul

Os tubos foram misturados brevemente por vortex, concentrados e incubados a 50 °C por 50 min. Finalmente, a reação foi terminada incubando a 85 °C por 5 min e os tubos colocados em gelo. As amostras foram armazenadas a – 20 °C ou processadas diretamente para o PCR.

3.14 Análise da expressão genica por RT-qPCR

As reações de RT-qPCR foram realizadas em termociclador ABI 7300 (ABI), com primers específicos para os genes que reconhecem regiões dentro do precursor rRNA 45S e dentro dos rRNAs maduros 5.8S, 18S e 28S. Assim também primers específicos para os genes c-myc e xiap. Cada par de primers foi desenhado com auxílio da plataforma online Primer-BLAST-NCBI-NIH (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), que localiza primers específicos usando Primer3 e BLAST, a partir do template escolhido das sequências de RNA do banco de dados Nucleotide - RefSeq da NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/#>). Para os genes c-myc e xiap, foi considerado as regiões conservadas nos exons consecutivos para o desenho dos primers (região inter-exons). A predição de dímeros do mix de primers reverse dos genes ribossômico foi feita com a plataforma online Multiple Primer Analyzer (Thermo Scientific Web Tools - <https://www.thermofisher.com/br/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html>). A tabela 1 mostra as sequências de primer forward e reverse desenhados para cada gene estudado e o gene utilizado para

controle endógeno. O sistema de detecção utilizado foi a fluorescência emitida por SYBRGreen™ e a análise dos dados foi feita a partir do método do $\Delta\Delta Ct$, utilizando-se os cálculos abaixo.

Foi determinada a média do Ct (ciclos threshold) das réplicas técnicas do gene específico e do housekeeping (Ct_T), após o qual foi calculada a diferença entre as médias técnicas do gene de interesse e o housekeeping de cada replica biológica ($\Delta Ct = Ct_{T-House} - Ct_{T-gene}$). A seguir foi calculada a diferença entre todos os ΔCt s e um ΔCt de uma das réplicas biológicas do grupo controle ($\Delta\Delta Ct_i = \Delta Ct_i - \Delta Ct_1$). Cada $\Delta\Delta Ct$ foi convertido em expressão relativa de acordo com a formula $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$. A média do RQ do grupo controle e tratamento foram normalizadas ($RQ_{controle}/RQ_{controle}$ e $RQ_{tratamento}/RQ_{controle}$) e os valores foram representados no Excel junto com seus desvios padrão. O desvio padrão de cada grupo foi calculado com a formula $DP_{Controle/tratamento} = \sqrt{\frac{\sum(\Delta\Delta Ct_i + \Delta\Delta Ct_{media})^2}{n-1}}$, a significância da diferença de expressão foi analisada a traves o teste t de Student numa distribuição bicaudal do tipo heteroscedástica.

Gene alvo	Primers Forward	Primers Reverse
RNA ribossômico 45S	Seq _{Fw} : GAACGGTGGTGTGTCGTT	Seq _{Rv} : GCGTCTCGTCTCGTCTCACT
RNA ribossômico 28 S	Seq _{Fw} : GTGAACAGCAGTTGAACATGGG	Seq _{Rv} : AACCGCGACGCTTTCCAAG
RNA ribossômico 18S	Seq _{Fw} : GATGGTAGTCGCCGTGCC	Seq _{Rv} : GCCTGCTGCCTTCCTTGG
RNA ribossômico 5.8S	Seq _{Fw} : ACTCGGCTCGTGCGTC	Seq _{Rv} : GCGACGCTCAGACAGG
c-myc	Seq _{Fw} : GTAGTGGAACCAGCAGCCT	Seq _{Rv} : TCGTCGCAGTAGAAATACGGCT
xiap	Seq _{Fw} : CCTCCTCCGGGACCCTC	Seq _{Rv} : ACCTTTTCGCGCCAGGAC
gapdh	Seq _{Fw} : GCACCGTCAAGGCTGAGAAAC	Seq _{Rv} : ATGGTGGTGAAGACGCCAGT

Tabela 1- Sequencias de primers forward (Seq_{Fw}.) e reverse (Seq_{Rv}.) utilizadas nas reações de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR).

3.15 Determinação da concentração e eficiência de primers

Para determinar a concentração dos primers 5.8S, 18S 28S e 45S a serem utilizados na reação de qPCR, foram testadas duas concentrações de 200 e 400 nM. A concentração utilizada foi aquela que apresentou curva de dissociação como somente um pico e o menor Ct. Para determinar a eficiência de cada par de primers, após a determinação da concentração a usar, foi realizada uma reação de qPCR com diluições de cDNA nas proporções 1:10, 1:20, 1/40, 1/80 e 1/100. Os resultados dos Cts foram então relacionados à concentração correspondente, gerando um gráfico. O coeficiente angular (α) da equação de reta gerada foi utilizado para calcular a eficiência de cada par de primers, de acordo como a equação:

$$Ef = 10^{\left(\frac{-1}{\alpha}\right)}$$

$$Ef(\%) = (Ef - 1) * 100\%$$

3.16 Análises estatísticas

Os resultados foram analisados utilizando teste de significância teste *t* de Student ou ANOVA, e expressos em média + desvio padrão amostral (SEM) de triplicata experimental. Foi utilizado o software GraphPad Prism 5.00 (San Diego, CA) e Microsoft Excel (2016) para a representação gráfica de todos os resultados.

4 RESULTADOS

4.1 Nível de fosforilação da proteína HNRNPC em células normais e deficientes de DUSP3

Estudos recentes têm descrito a interação de DUSP3 com HNRNPC, embora eles são parte dos complexos formados em resposta a estresse, a interação entre as duas proteínas pode ser indireta. Ensaios de fluorescência (co-localização), co-imunoprecipitação e pull-down confirmaram a interação dentro do mesmo complexo (Panico e Forti, 2013), mas o efeito da interação se fosse direta, teria um impacto nos níveis da fosforilação da proteína HNRNPC e consequentemente nas funções que executa (Mayrand et al., 1993; 1996). As proteínas DUSP3 e HNRNPC são altamente expressas no tipo celular fibroblastos (The Human Protein Atlas), e a DUSP3 está distribuída por toda a célula, mais a maior parte dela está presente no nucleoplasma. HNRNPC está presente principalmente no nucleoplasma, mesmo que durante a fase G2/M ela migre parcialmente para o citoplasma. Ambas proteínas são abundantes no núcleo, o que faz imaginar que se a interação fosse direta, a proximidade das proteínas e sua abundância permitiriam uma rápida regulação por parte da fosfatase. Nesse sentido foi concebido o seguinte ensaio: avaliamos os níveis de fosfotirosina total (devido à preferência de DUSP3 por esse fosforesíduo) (Denu et al., 1995; Schumacher et al., 2002) da proteína HNRNPC isolada do extrato total de células normais e deficientes de DUSP3, através da técnica de imunoprecipitação. O tratamento usado para as células foi UVC em doses baixas (6J/m^2), e os tempos de recuperação escolhidos após tratamento foram 5 e 15 minutos, uma vez que HNRNPC é rapidamente fosforilada (20 minutos após estímulo com H_2O_2 apresentam aumento significativo nos níveis de fosforilação) (Stone et al., 2003).

As sublinhagens de fibroblastos MRC5 (MRC5 Mock e MRC5 shRNA DUSP3/MRC5 2A) usadas neste e na maioria dos ensaios foram caracterizadas em estudos prévios do grupo de trabalho do laboratório. Os níveis de DUSP3 e HNRNPC são abundantes na MRC5 Mock, e a MRC5 2A também tem uma alta expressão da HNRNPC. Foram feitas

duas réplicas biológicas com um e dois tempos de recuperação respectivamente, o ensaio de imunoprecipitação foi feito de acordo como o descrito na seção 3.8 de Materiais e Métodos. O tampão usado para o extrato total e o processo da imunoprecipitação foi o tampão D2 com inibidores de proteases e sem inibidores de fosfatases.

Figura 5 – Níveis de fosforilação da proteína HNRNPC1/C2 após tratamento com 6J/m^2 UVC pelo ensaio de imunoprecipitação. Membrana representativa revelada com anticorpos específicos para fosfotirosinas (pY) e a proteína HNRNPC1/C2 total (PT). IP feito com anti-HNRNPC1/C2 e IB feito com anti-pY. Lisado total de células MRC5 Mock e 2A sem estresse e irradiadas com UVC, foram usados. O grupo controle e o tempo de recuperação de 5 min têm $n=2$, o tempo de recuperação de 15 min tem $n=1$. Os poços “T” correspondem ao extrato total, “S” o sobrenadante da primeira centrifugação após incubação de 1h 30 min com a resina, “L” a última lavagem, “IP” poço da resina junto com as proteínas ligadas ao anticorpo primário, “IB” imunoblotting. A ponta da seta indica a banda correspondente a proteína HNRNPC.

Níveis de fosforilação da proteína HNRNPC1/C2

Figura 6 – Relação pY/PT em células normais e deficientes de DUSP3. O sinal obtido da pY foi normalizada com o sinal da proteína total de HNRNPC capturada pelo o método de imunoprecipitação. Na representação, os dados de cada réplica foram normalizados com a condição controle da célula normal. “pY” é o resíduo fosforilado de tirosina quantificado no poço IP, “PT” é a quantidade total de proteína HNRNPC quantificada no poço IP.

Os níveis de fosfotirosina (pY) da HNRNPC são maiores nas células deficientes de DUSP3 em todas as condições analisadas, já na condição controle existe um aumento da

fosforilação basal das proteínas C (figura 5 y 6). Esses dados levam a pensar que a ausência de DUSP3 mantém a HNRNPC num estado superativado mesmo sem estímulo. Após os tempos de recuperação a diferença é mantida ou vai aumentando entre células normais e deficientes de DUSP3 (figura 6). Estes dados sugerem que, após um estímulo, a falta de regulação dos níveis de fosforilação do HNRNPC faz com que a diferença entre as células normais e deficientes seja ainda mais pronunciada. É interessante notar que, após 5 minutos de recuperação, os níveis de fosforilação caem na célula silenciada e na célula normal (numa maior proporção na célula normal). Possivelmente, o mecanismo de resposta da célula ao estresse genotóxico (UVC) seria diminuir os níveis de fosforilação basal nos resíduos de tirosina da proteína HNRNPC. Ao contrário do aumento da fosforilação nos resíduos de serina após estimulação com H_2O_2 , gerando proliferação, sobrevivência celular e migração celular (Kattapuram et al., 2005). No nosso caso, o aparente mecanismo regulador vai diminuir a fosforilação dos resíduos tirosina no domínio RRM (Velusamy et al., 2008), portanto, diminuindo a afinidade da HNRNPC pelo RNA. É importante mencionar que os dois estímulos (UVC e H_2O_2) com mecanismos contrários (o peróxido aumenta os níveis de fosfoserina e o UVC abaixaria o nível de fosfotirosina) tem o mesmo efeito, o de enfraquecer a força de ligação entre HNRNPC e seus RNAs alvo. Sabe-se que HNRNPC faz parte de corpos nucleares que atuam na forma de um estoque de proteínas e RNAs necessários para a resposta dinâmica da célula frente a estímulos (Chiodi et al., 2000; Yang et al., 2013, Saitoh et al., 2004). Dentro do estoque existem RNAs, assim com proteínas, que vão permitir uma rápida resposta ao estresse. Tem se descrito a interação do LncRNA MALAT-1 com HNRNPC1/C2 (Yang et al., 2013) e a importância deste LncRNA que é especificamente retido em nos speckles, associado à modificação ou armazenamento da máquina de processamento de pré-mRNA, afetando potencialmente a regulação da função genética (Miyagawa et al., 2012, Tripathi et al., 2010). Dentro destas organelas subnucleares, o estado de fosforilação das proteínas que o compõem é muito importante. As proteínas SR (família de fatores de splicing ricos em serina e arginina), como o SRSF2 e a

RNA Pol II estão hiperfosforiladas nestes complexos, e sua localização vai depender do seu estado de fosforilação (Saitoh et al., 2012). É importante mencionar, a presença da proteína SFPQ neste tipo de organelas associada com os LncRNAs MALAT-1 (Ji et al., 2014) e NEAT1 (Imamura et al., 2014), esta proteína tem sido achada no análise de espectrometria de massas associado com DUSP3 em resposta ao estresse (Panico e Forti, 2013). Estes dados sugerem o possível papel da DUSP3 na formação destas organelas subnucleares ao interagir e regulando o estado de fosforilação das proteínas que formam os complexos.

Nosso ensaio sugere que a DUSP3 interage diretamente com algum domínio da HNRNPC, desfosforilando fosfotirosinas no motivo reconhecido pelo seu bolsão catalítico. A perda de DUSP3 leva a um estado “superativado” da HNRNPC que pode ter um profundo impacto na homeostase celular.

4.2 Expressão gênica do pré-rRNA 45S e os rRNA 28S, 18S e 5.8S maduros em células normais e deficientes de DUSP3

Nossos experimentos de expressão genica por qPCR em tempo real foram feitos com amostras numa diluição 1:100 e 0.4 uM de cada par de primers, sob condições padrão da etapa de elongação 60 °C por um minuto durante 40 ciclos. Nosso modelo experimental leva em consideração o rápido processo de ribogênese; num período de 5 minutos uma célula eucariótica normal sem estresse poderia substituir cerca do 7% do estoque de ribossomos, após 15 minutos teria substituído 21 % deles (Tschochner e Hurt, 2003; Warner, 1999). As condições genotóxicas que formam dímeros de ciclobutano-pirimidina (CPDs) e 6-4 fotoprodutos (6-4PPs) no DNA também podem afetar os ácidos nucleicos presentes nos ribossomos (rRNA). Não é conhecido um mecanismo de reparo de danos nos ribossomos, mas se existe um controle de qualidade destes e uma rápida substituição de ribossomos defeituosos, pode-se inferir que, durante as condições de estresse, a taxa de produção de novo dos ribossomos aumentaria para substituir aqueles cuja função foi

afetada após tratamento com UVC, por exemplo. Assim, de nossos resultados podemos inferir que a expressão genica relativa dos rRNA maduros (5.8S, 18S e 28S) não tem diferença significativa em nenhuma das condições do experimento (figura 7). No entanto, após 15 minutos de recuperação se tem uma tendência a uma maior expressão do pré-rRNA 45S ($p=0.07$) (figura 7-c). Nossos resultados sugerem que em condição basal (sem tratamento), as espécies ribossomais maduras 5.8S, 18S e 28S estão presentes em quantidades semelhantes nas células normais e nas células deficientes de DUSP3. Após tratamento, a resposta de ambas células parece não diferir no intervalo de tempo de 5 minutos, mas após 15 minutos há um acúmulo do pré-rRNA 45S na célula deficiente de DUSP3. Os rRNA maduros não apresentam nenhuma tendência mesmo após 15 minutos. Este dado sugere que a fosfatase DUSP3 poderia ter um impacto na cascata de sinalização que ativa a transcrição de genes ribossômicos em condições de estresse, mas o aumento do precursor ribossômico não tem um impacto grande na quantidade das espécies ribossomais maduras.

Tem se descrito o efeito da deficiência de HNRNPC, NPM e NCL no processamento das espécies de pré-rRNA (Tafforeau et al., 2013). HNRNPC e NPM geram uma acumulação maior 2.5 e 2 vezes respectivamente dos pré-rRNAs 47S, NCL causa uma redução na quantidade dos precursores 47S, 45S e 41S. O nosso primer para a detecção dos níveis do 45S hibridam na região compreendida entre os sítios 01 e A0, aquela região está nas especies 45S, 47S, 34S, 30S. Com isso, é possível que a deficiência de DUSP3 em condições sem estresse gera uma maior expressão de genes ribossômicos, mas devido ao efeito do acúmulo de algumas especies de pré-rRNAs, as subsequentes especies se mantem numa concentração relativamente normal (figura 7-c).

Figura 7 – Expressão genica das espécies ribossomais 5.8S, 18S, 28S e 45S determinada por RT-qPCR para células normais e deficientes de DUSP3. Células normais (Mock) e deficientes de DUSP3 (2A) foram analisadas sob condições controle (sem tratamento) e estresse (UVC 6J/m2 – dose baixa). Foram representadas as médias da expressão relativa junto com o desvio padrão. Estatística usando teste t de Student: ns. (a) condição de controle, (b) 5 minutos após tratamentos com UVC, (c) 15 minutos após tratamento com UVC e (d) bandas do produto de PCR em gel de agarose 1 %.

4.3 Tradução global nas células normais e deficientes de DUSP3

4.3.1 Análise do status da tradução através do perfil de polirribossomos

Os dados obtidos no perfil de polirribossomos podem fornecer informações valiosas sobre o status de tradução da célula e da montagem das subunidades ribossômicas (Esposito et al., 2010). Nossos resultados mostram que não há diferenças notáveis entre o perfil polirribossômico de células normais e deficientes de DUSP3, como a presença de halfmers ou depleção de alguma subunidade (figura 8). Para a quantificação da área embaixo a curva e comparação entre os grupos (células deficientes e normais) em cada tratamento, os valores das áreas foram normalizados em relação a área da subunidade menor. É bom lembrar que a subunidade menor está formada por uma espécie de rRNA

(18S), além disso o seu processamento se separa do processamento dos rRNA 28S e 5.8S nas primeiras etapas da biogênese ribossomal (formação do pré-rRNA 30S/34S) (Henras et al., 2015; Kobyłecki et al., 2018). Com isso, se a razão de todas as áreas tivesse uma diferença significativa entre as células normais e deficientes, poder-se-ia inferir que a subunidade menor tem um defeito na sua biogênese ou montagem, caso contrário, se a razão de um pico só tem diferença significativa o defeito será restrito a ele. Foram feitas três réplicas biológicas para a condição controle e duas réplicas biológicas para os tratamentos de 6J/m² e 28J/m², e tempo de recuperação de 5 min nas células MRC5 Mock e MRC5 2A (MRC5 shRNA DUSP3), e duas réplicas biológicas para as células XPA Mock e XPA 2A XPA shRNA DUSP3) na condição controle (figura 9).

Nossos dados não mostram diferenças significativas nas células MRC5 sem tratamento (figura 9 - a), mas sugerem ao comparar os resultados das células MRC5 e XPA nos controles, que existe tendência à uma menor quantidade de polissomos nas células silenciadas, o que sugere uma menor síntese proteica ao nível dos polissomos (figura 9 – a, d). Após estresse com doses baixa e alta de UVC, as células deficientes de DUSP3 apresentam um menor efeito na sua síntese de proteínas em relação ao controle, enquanto a célula normal aparentemente tem uma queda maior nos níveis de tradução (figura 9 – b, c). O que pode se inferir destas tendências é que as células deficientes em DUSP3 são menos sensíveis à inibição da tradução global após estresse, ou que os mecanismos alternativos à tradução dependente de cap estão superativados ou desregulados. É importante mencionar que das proteínas identificadas através de espectrometria de massas como possíveis parceiros interagindo com DUSP3 (Panico e Forti, 2013), as mais abundantes tem algum papel na síntese de proteínas. Encontrou-se a proteína PABP1, que participa diretamente na síntese proteica dependente de cap (Le et al., 1997; Preiss e Hentze, 1999), e também HNRNPC e NUCL que participam da tradução de mRNA através de mecanismos alternativos mediados por sequências IRES (Schepens et al., 2007; Morfousse et al., 2016).

Figura 8 – Traço representativo do perfil de polirribossomos dos extratos preparados a partir de células normais e deficientes de DUSP3 em presença de cicloheximida. O extrato ribossômico foi fracionado utilizando um gradiente de sacarose de 7 - 47% e analisado usando um aparelho de seringa de bomba conectado a um detector de UV. Os valores de absorbância detectados num comprimento de onda de 254nm foram plotados pelo o programa ALMEMO VIEW SOFTWARE. O eixo horizontal é o tempo em que a amostra passou pelo detector de absorvência. Os picos das curvas representam as diferentes subunidades ribossômicas, monossomas 80S e os polissomos (indicadas na figura). A seta indica a area embaixo a curva.

Figura 9 – Análise da área do perfil de polirribossomos das células normais e deficientes de DUSP3. Os gráficos de barras indicam a razão entre as áreas dos picos da subunidade 60S, monossomas 80S e polissomos em relação da área do pico 40S. As figuras (a) e (d) são as condições basais sem tratamento que se repetem em dois tipos celulares diferentes MRC5 e XPA (fibroblastos deficientes da via de NER). Estatística (a) 2way ANOVA: ns.

4.3.2 Análise da presença das proteínas DUSP3 e HNRNPC1/C2 nas subunidades ribossômicas, monossomas e polissomos

As proteínas presentes nas frações obtidas do perfil de polirribossomos foram precipitadas com etanol 100%, e foi este método que melhor se adaptou para nossos ensaios. O etanol precipitou os complexos de ácidos nucleicos e proteínas presente nas frações, e as lavagens subsequentes com etanol 70% permitiram remover parte da sacarose que interfere com a eletroforese. As figuras 10 e 11 são membranas representativas dos Western blots das frações. No ensaio da figura 10 usou-se as 24 frações obtidas para a transferência úmida durante 1h e 30min das proteínas em membrana de nitrocelulose (o tempo ideal para proteínas do tamanho da DUSP3, 21kDa). No ensaio da figura 11, as frações ímpares foram transferidas por um tempo de 1h e 50min para a revelação das

proteínas HNRNPC1/C2 e RPS6 (34kD e 29kD respectivamente) e as frações pares foram transferidas durante 2h e 10min para a revelação das proteínas PABP e NPM (71kD e 33kD respectivamente).

Figura 10 – Presença de DUSP3 nas subunidades ribossômica e nos polissomos. Western blot representativo da distribuição da fosfatase DUSP3 nas subunidades ribossômicas 40S e 60S, assim como nos monossomos 80S e polissomos. (a) perfil de polirribossomos obtido nesse ensaio do fracionamento do lisado total de células normais (MRC5 Mock), com a numeração das frações coletadas. (b) membranas reveladas com os anticorpos anti-DUSP3 e anti-RPS6 das condições controle e sob estresse (dose baixa 6J/m2 e dose alta 28J/m2). As setas indicam a banda correspondente à proteína. RPS6 foi usado como controle da presença da subunidade menor, 80S e polissomos nas frações. As setas indicam as bandas correspondentes a proteína DUSP3.

Figura 11 - Presença de HNRNPC e PABP nas subunidades ribossômica e nos polissomos. Western blot representativo da distribuição das proteínas HNRNPC1/C2, PABP e NPM nas subunidades ribossômicas 40S e 60S, assim como nos monossomos 80S e polissomos. (a) perfil de polirribossomos obtido nesse ensaio do fracionamento do lisado total de células normais e deficientes de DUSP3, com numeração das frações coletadas. (b) membranas reveladas com os anticorpos anti-HNRNPC, anti-PABP, anti-NPM e anti-RPS6 das condições controle e sob estresse (dose baixa 6J/m2). As setas indicam a banda correspondente à proteína. RPS6 foi usado como controle da presença da subunidade menor, 80S e polissomos nas frações. As setas indicam as bandas correspondentes a proteína HNRNPC.

Dos resultados dos Western blots podemos inferir que a DUSP3 estaria interagindo com proteínas da subunidade menor em todas as condições testadas (Figura 10). Sua presença na subunidade maior não é muito clara, enquanto nas frações correspondentes a 60S há também a presença de DUSP3, mas pode ser devido ao fato de que também existem alguns complexos da subunidades menores, conforme indicado pelas bandas de proteína RPS6 (proteína da subunidade 40S). As proteínas HNRNPC e PABP estão presentes em todas as frações correspondentes às subunidades 40S e 60S, assim como nos monossomas e polissomos. Novamente, existe a presença da proteína RPS6 nas frações correspondentes à subunidade maior. Não é clara a diferença entre as quantidades de HNRNPC nas células deficientes de DUSP3 e as células normais, mesmo nas condições controle e tratadas com UVC (ver no anexo 6). A proteína PABP aparentemente seria mais abundante nas subunidades ribossômicas e monossomas/polissomos em células normais do que nas células deficientes de DUSP3, e após estresse, aumentaria em ambas células (figura 11). O desenho do experimento permite demonstrar a presença da DUSP3 e seus possíveis parceiros no mesmo local, o ribossomo. É importante mencionar que PABP, está envolvida no mecanismo da tradução dependente de cap; uma menor presença dela na subunidade menor, assim como nos monossomas/polissomos, pode sugerir que a célula deficiente de DUSP3 tem sua tradução global prejudicada (Le et al., 1997).

4.3.3 Análise da presença de DUSP3 e HNRNPC1/C2 nas subunidades 40S e 60S após tratamento como EDTA

Para se determinar a presença de DUSP3 numa das subunidades ribossômicas, os extratos totais das células foram tratados com EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético). Ao adicionar este reagente, os monossomas e polissomos se dissociam nas subunidades maior e menor, liberando os mRNA e mantendo só os complexos proteicos específicos do 40S ou 60S. Neste experimento, extrato total das células normais (MRC5 Mock e XPA Mock) e

deficientes em DUSP3 (MRC5 2A e XPA 2A) sem tratamento, foram comparados através do ensaio de perfil de polirribossomos e western blot das frações obtidas.

Figura 12 – Traço representativo do extrato de ribossomo preparado a partir de células normais e deficientes de DUSP3 em presença de EDTA. (a) o tratamento com EDTA prévio à centrifugação gera um perfil de dois picos, o primeiro corresponde à subunidade menor e o subsequente à subunidade maior. Os valores de absorbância foram detectados num comprimento de onda de 254nm e plotados pelo programa ALMEMO VIEW SOFTWARE. O eixo horizontal é o tempo em que a amostra passou pelo detector de absorbância junto com a numeração das frações obtidas. (b) razão das áreas embaixo a curva dos picos 40S e 60S, os valores de cada linhagem foram normalizados com o valor da razão da célula normal (Mock). A seta indica a área embaixo a curva quantificada. (n=1).

A quantificação das áreas sob a curva dos picos correspondentes ao 40S e 60S (figura 12-b), não mostram nenhuma variação na quantidade de subunidades das células deficientes de DUSP3 (MRC5 2A e XPA 2A) em relação as células normais. Dos western blots as proteínas DUSP3 e HNRNPC1/C2 estão localizadas principalmente na subunidade menor, e aparentemente HNRNPC estaria presente em uma quantidade maior na subunidade 40S da célula deficiente em comparação com a célula normal, em ambas linhagens celulares (figura 13). Estes dados sugerem a presença de DUSP3 especificamente na subunidade menor e que a deficiência dela teria um efeito na abundância de HNRNPC nos complexos associados à subunidade 40S.

Figura 13 - Presença de HNRNPC e DUSP3 nas subunidades 40S e 60S dos lisados tratados com EDTA. (a) as membranas foram reveladas para avaliar a presença de HNRNPC1/C2 numa das subunidades ribossomais. (b) revelado com DUSP3. "M" poço do marcador de peso molecular, "T" poços com extrato total de células normais, como controle da eletroforese e transferência, "2 - 13" numeração das frações obtidas do perfil de polirribossomos. Acima de cada membrana está indicado as frações correspondentes a cada subunidade ribossomal.

4.3.4 Interação de DUSP3 com complexos proteicos das subunidades 40S e 60S

Para ter uma ideia da afinidade da DUSP3 com os complexos específicos da subunidade 40S, foi avaliada a capacidade dessa fosfatase para interagir com os complexos proteicos formados por proteínas da subunidade maior e menor dos ribossomos. Por meio do ensaio de co-imunoprecipitação, analisamos diferentes condições nas quais a DUSP3 poderia estar interagindo com complexos ribossômicos específicos. Foram testados, uma condição suave com tampão fraco e condições mas restritivas com o tampão D2 (ver materiais e métodos seção 3.8), adicionados com heparina (inibidor geral de RNases) ou mesmo RNases. Nossos resultados sugerem que DUSP3 estaria interagindo com complexos proteicos nos quais a proteína RPS6 está presente. RPS6 é uma proteína

constitutiva dos ribossomos que faz parte da subunidade menor, mas também tem se descrito funções diversas para esta proteína fora dos complexos ribossomais (Jeon et al., 2008; Gao et al., 2019). Da figura 14 (a-i), pode se inferir que a afinidade de DUSP3 pelos complexos formados pela proteína RPS6 aumenta após tratamento com UVC, caso contrário, a interação com a proteína RPL26 (proteína específica da subunidade maior) é ausente nas duas condições (controle e doses alta de UVC 28J/m²). Extrato total de células A549, foram testadas sob as mesmas condições com tampão fraco, confirmando a interação da DUSP3 com os complexos proteicos formados por RPS6 (figura 14 a-ii). Condições, mas restritivas foram testadas para avaliar a estabilidade dos complexos formados por DUSP3 e RPS6 através do aumento da concentração de sais e detergentes, assim como a etapa de pré-cleaning (figura 14 b). Para avaliar a dependência da interação com a presença de RNA nos complexos, foi adicionado heparina numa concentração de 1U/ul para manter a integridade dos RNAs ou foi adicionado 50 ug de RNase para a degradação dos mesmos. Os resultados demonstraram que nos lisados tratados com RNase a interação diminui bastante em relação ao lisado tratado com heparina (figura 14-b). Durante o processo de pré-cleaning existe perda de proteína RPS6, e provavelmente dos complexos nos quais DUSP3 estaria presente. Mas ainda assim, DUSP3 aparece interagindo com RPS6 no poço do IP. Estes dados confirmam a presença de DUSP3 nos complexos ribossomais da subunidade 40S e sugere que estes complexos não são tão fracos e transitórios, além disso, são dependentes da presença de RNA.

a Tampão fraco

b Condições estringentes

Figura 14 - Co-imunoprecipitação de DUSP3 com proteínas ribossomais RPS6 e RPL26 nas condições controle e sob estresse UVC, e em condições restritivas. Lisado total de células MRC5 Mock foram usados em diferentes condições de tampão. (a) Co-IP em tampão fraco sem heparina nem RNases, (a-i) células MRC5 Mock foram usadas para o extrato total de proteínas, e incubadas com anticorpos anti-RPS6 e anti-RPL26, as membranas foram reveladas para as proteínas DUSP3, RPS6 e RPL26. (a-ii) extrato total de células A549 foram usadas para o mesmo ensaio em tampão fraco. (b) lisado total de células MRC5 Mock com tampão D2 e adicionados com heparina ou RNases foram usados como condições mais restritivas. Etapa de pré-cleaning foi adicionado. Todos os ensaios foram feitos com 500 ug de proteína total e 2ug de anticorpo. "T" poço para o extrato total, "A" poço da resina obtida da etapa de pré-cleaning, "S" poço para o sobrenadante, "L" poço para a última lavagem e "IP" poço para a resina contendo as proteínas ligadas ao anticorpo. As setas indicam as bandas correspondentes a proteína DUSP3 ou RPS6. Os quadrados pontilhados indicam ausência das bandas correspondentes a proteína DUSP3.

4.4 Expressão de mRNA que contém sequência IRES reguladas por HNRNPC1/C2

4.4.1 Expressão de proteínas em células sincronizadas

A expressão de mRNA contendo sequências IRES é mediada por complexos ITAF com composição específica para cada mRNA (Jang e Wimmer, 2002) e estes complexos medeiam a tradução independente de cap sob condições específicas. Muitos destes mecanismos são ativados em etapas chave do ciclo celular, como a fase G2/M, e muitas proteínas necessárias para a correta progressão de fase são sintetizadas neste período através de mecanismo alternativos à tradução dependente de cap (Petretti et al., 2006). c-MYC é uma proteína importante para a proliferação, diferenciação, apoptose e regulação do ciclo celular (Pelengaris et al., 2002). Tem-se descrito a interação de HNRNPC1/C2 com o mRNA de c-myc na fase G2/M aumentando a tradução do mRNA c-myc dependente de IRES e mantendo o nível constante da proteína c-MYC ao longo do ciclo celular (Kim et al., 2003). XIAP (Inibidor do apoptose ligado ao cromossomo X) é um dos inibidores mais poderosos e abundantes de apoptose. Igualmente ao mRNA do c-myc, xiap apresenta uma sequência IRES reconhecida pela proteína HNRNPC. A tradução do mRNA xiap mediada por sequência IRES aumenta em condições de estresse celular, como estresse genotóxico gerado por radiação UVC (Holčík et al., 2003). Nesse contexto, é importante saber se existe um desequilíbrio dos mecanismos de tradução dependentes de IRES nas células deficientes em DUSP3. Os níveis de expressão proteica das proteínas foram analisados em diferentes fases do ciclo celular ($G_0/G1$, $G1/S$ e $G2/M$), e sob condições de estresse genotóxico leve e alto. Nas figuras 15 e 16 (e anexo 8), nas condições controle (células assíncronas sem tratamento), a expressão de XIAP e c-MYC é muito maior nas células deficientes de DUSP3 em relação a expressão das células normais. Nas células bloqueadas em fase $G_0/G1$ e $G1/S$, após 15 minutos e 1 hora da liberação, têm-se uma expressão menor de c-MYC nas células deficientes. Nasquelas transições de fases, após 3 horas da liberação, o nível de c-MYC aumenta progressivamente, aparentemente restaurando a relação da expressão de c-MYC entre células deficientes de DUSP3 e normais encontrada nas células assíncronas. Na

fase G2/M, após 15 minutos de liberação os níveis de c-MYC nas células deficientes e normais é similar, mas após 1 hora e até 6 horas o nível de c-MYC na célula deficiente aumenta consideravelmente em relação à célula normal. É possível que a expressão da proteína c-MYC seja comprometida durante o bloqueio do ciclo celular, e que a queda de seu nível nas células deficientes de DUSP3 seja um efeito da sensibilidade das células ao estresse (Torres et al., 2017).

Figura 15 – Sincronização de células deficientes de DUSP3 e normais nas fases G₀/G₁, G₁/S e G₂/M. (a) Membrana representativa, com condições controle “C” (células assíncronas) e tempos de liberação de 15 min, 3h e 6h após bloqueio com soro “S”, timidina “T” e nocodazole “N” ou “Ndz”. (b) Quantificação da expressão da proteína c-MYC nas diferentes fases do ciclo celular, os controles e tempos de liberação de 15 minutos são valores representativos de dois experimentos (n=2), todas as condições foram normalizadas em relação ao Mock controle.

Figura 15.1 – Sincronização de células deficientes de DUSP3 e normais nas fases G₀/G₁, G₁/S e G₂/M. Quantificação da expressão da proteína XIAP nas diferentes fases do ciclo celular, os controles e tempos de liberação de 15 minutos são valores representativos de dois experimentos (n=2), todas as condições foram normalizadas em relação ao Mock controle.

Igualmente a proteína c-MYC, XIAP apresenta o nível muito alto nas células deficientes e assíncronicas sem tratamento (figura 15.1 e 16.1-a) e, aparentemente em todas as fases do ciclo e após todos os tempos de liberação, as células silenciadas mantêm uma maior expressão da proteína XIAP em relação com as células normais. A proteína XIAP é superexpressa sob condições de estresse e evita a apoptose celular. Sob essa perspectiva, o bloqueio do ciclo é estímulo suficiente para manter a síntese de XIAP, permitindo que a célula evite apoptose (Tong et al., 2005; Bruno et al., 2008). É importante notar que o aumento no nível de expressão das proteínas pode ser causado por uma maior tradução de

seus genes, uma maior estabilidade de suas proteínas por alguma modificação pós-tradução ou porque sua síntese é favorecida devido a um mecanismo alternativo independente de cap ou incremento da meia-vida do seu mRNA.

4.4.2 Expressão de proteínas em células sob estresse

Sob estresse genotóxico, as células deficientes de DUSP3 vão apresentar uma maior sensibilidade ao dano no DNA, o que resulta numa menor proliferação e sobrevivência celular (Torres et al., 2107). Mesmo assim, sob essas condições, a célula continua traduzindo mRNA de proteínas importantes para reverter o dano e bloquear sinais pró-apoptóticas. Dos tratamentos em geral (figura 16), na célula silenciada, os níveis da proteína c-MYC caem progressivamente, tanto na dose baixa quanto na dose alta de UVC, sendo essa queda ainda mais evidente nas células deficientes tratadas com doses elevadas. Nas células normais, 1 hora após tratamento leve, os níveis de expressão de c-MYC já se mostram recuperando. Esses dados refletem o fato de que as células deficientes de DUSP3 são mais sensíveis, e levam mais tempo para se recuperar de danos no DNA. Na dose baixa, nas células deficientes de DUSP3, os níveis de c-MYC permanecem acima dos níveis das células normais após 15 minutos e 1 hora de recuperação. Na dose alta, a célula silenciada parece não se recuperar do dano recebido. Na figura 16.1-a, a expressão de XIAP após doses baixas de UVC, diminui nas duas células. Embora, na célula deficiente de DUSP3, há uma maior expressão nos primeiros períodos de recuperação (15 min e 1 h). Após três horas, a célula normal recupera seu nível basal de expressão de XIAP, ao contrário do que acontece na célula silenciada, onde seu nível permanece abaixo da condição sem estresse. Contudo, a célula deficiente mantém seu nível de XIAP acima do nível na célula normal após os tempos de recuperação 15 minutos e 1 hora com a dose leve. Em dose alta de UVC, a queda na expressão é mais evidente, na célula deficiente, aparentemente seus níveis de XIAP continuam caindo mesmo após 3 horas de recuperação.

Com a mesma dose, na célula normal, a queda é menos pronunciada e após três horas parece se recuperar.

Nas células sem estresse, o nível de expressão da proteína CDK11 não tem grande diferença entre a célula normal e deficiente (16.1-b), e aquele padrão é mantido até 1 hora após o tratamento com dose baixa de UVC. Após 3 horas, a célula normal recupera seu nível basal de expressão enquanto a célula deficiente mantém um nível inferior ao de seu nível basal. A doses altas, a célula deficiente vai ter uma menor expressão de CDK11 em relação à célula normal, em todos os tempos de recuperação. Nos primeiros tempos de recuperação, as células deficientes de DUSP3 apresentam uma maior expressão da proteína c-MYC e XIAP. Ao contrário, os níveis de CDK11 são similares ou maiores se comparar o tratamento com doses altas de UVC. Estes dados sugerem uma desregulação nos mecanismos de tradução dependentes de sequência IRES nas células deficientes de DUSP3. O mRNA dos genes *xiap*, *c-myc* e *cdk11* são alvos de HNRNPC através de suas sequências IRES, mas a sequência IRES de CDK11 produz uma isoforma de peso molecular 58kD (CDK11p58) (Petretti et al., 2006), e aqui foi avaliada a expressão da proteína traduzida por mecanismo dependente de cap (CDK11p110 – 110kD). Aparentemente a tradução da proteína CDK11p110 não seria afetada pelos desequilíbrios na regulação da tradução dependente de IRES. Por esse motivo, seu nível de expressão na célula normal e silenciada fica muito próximo, ainda após um tempo de recuperação de 1 hora. Em um tempo de recuperação mais longo, os defeitos nas vias de reparo do DNA celular nas células deficientes de DUSP3 afetariam os níveis de expressão das proteínas avaliadas neste ensaio.

Figura 16 – Expressão das proteínas c-MYC, XIAP e CDK11 em células deficientes de DUSP3 e normais sob estresse genotóxico. As células foram tratadas com doses baixas (6J/m2) e altas (28J/m2) de UVC, após dos tempos de recuperação 15 minutos, 1h e 3h foram analisadas a expressão das proteínas. (a) Membrana representativa, com condições controle “C” (sem tratamento) e tempos de recuperação de 15 min, 3h e 6h (b) Quantificação da expressão da proteína c-MYC, os controles e tempos de recuperação de 15 minutos e uma hora são valores representativos de dois experimentos (n=2), todas as condições foram normalizadas em relação ao Mock controle.

Figura 16.1 – Expressão das proteínas c-MYC, XIAP e CDK11 em células deficientes de DUSP3 e normais sob estresse genotóxico. (a) Quantificação da expressão da proteína XIAP, os controles e tempos de recuperação de 15 minutos e uma hora são valores representativos de dois experimentos (n=2). (b) Quantificação da expressão da proteína CDK11. Todas as condições foram normalizadas em relação ao controle Mock.

4.4.3 Expressão gênica do c-myc e xiap em células normais e deficientes de DUSP3

Para garantir que o aumento na expressão das proteínas XIAP e c-MYC nas condições sem estresse não é o efeito de uma maior transcrição do seu gene, foi avaliada os níveis de mRNA dos genes xiap e c-myc. Os resultados prévios sugerem que as células sem estresse têm superexpressas as proteínas avaliadas neste ensaio. Embora nosso resultado aqui não encontrou diferença significativa nos níveis de expressão gênica dos genes xiap e c-myc (tabela 2). Esses dados descartam a possibilidade de um aumento de proteínas devido a uma maior quantidade de mRNA. É possível que a deficiência de DUSP3 aumente o nível de fosforilação dessas duas proteínas e sua meia-vida com elas, mas nenhuma interação foi descrita entre a fosfatase DUSP3 e as proteínas XIAP ou c-MYC. Os mecanismos mais prováveis para aumentar sua expressão proteica são a desregulação nos mecanismos de síntese dependentes de IRES e aumento na meia-vida de seus mRNAs. Interessantemente, HNRNPC, além de mediar a sínteses dos mRNA xiap e c-myc através das sequências IRES, ela tem função de chaperonina (ligando-se no 5'UTR ou 3'UTR), interagindo com alguns mRNAs e os protegendo da degradação, assim como facilitando sua tradução (Velusamy et al., 2008). Nossos resultados da presença de HNRNPC e DUSP3 na subunidade menor, com as análises de expressão genica, reforçam a possibilidade de um mecanismo dependente da fosforilação regulador da expressão proteica de alguns mRNAs através de proteínas de ligação a mRNA.

Xiap						
	FC-M	FC-A	FC-N	SD	TS	
MRC5 Mock	3.86563784	3.207953163	1	1.9635	0.698974011	NS
MRC5 2A	3.390644398	2.593800742	0.80855318	1.6314		

C-myc						
	FC-M	FC-A	FC-N	SD	TS	
MRC5 Mock	1.468690233	1.4466504	1	0.436	0.716040039	NS
MRC5 2A	1.398607037	1.335430417	0.92311896	0.1963		

Tabela 2 - Expressão dos genes xiap e c-myc determinada por RT-qPCR para células normais e deficientes de DUSP3. Células normais (Mock) e deficientes de DUSP3 (2A) foram analisadas sob condições controle (sem tratamento). FC-M = Fold Change – Mediana, FC-A = Fold Change – Média, FC-N = Fold Change – Normalizada, SD = desvio padrão, TS = teste T de Student. NS = não significativo.

4.5 Quantificação da transcrição global em células normais e deficientes de DUSP3

Nossos primeiros resultados, o perfil de polirribossomos juntamente com a análise da expressão gênica dos rRNAs, mostrou que não havia diferença significativa na síntese de proteínas entre células normais e deficientes de DUSP3 em condições livres de estresse, e que a relação entre subunidades ribossômicas era semelhante entre as duas células, isso sugerindo que não há defeito na montagem das subunidades. Nesse sentido, uma peça-chave para entender melhor a aparente igualdade do estado traducional entre as duas células é uma análise de sua transcrição global. Para esse ensaio, usou-se o Click-iT RNA Alexa Fluor 488 Imaging Kit (Invitrogen). As condições analisadas foram controle (sem estresse), e doses baixas (6J/m²) e altas (28J/m²) de UVC, com tempos de recuperação de 5 e 15 minutos. É importante notar que existe uma diferença muito grande na morfologia celular das células deficientes de DUSP3 e normais. As células com ausência de DUSP3 têm um citoplasma mais extenso e um núcleo maior, características já descritas por Rahmouni et al., 2006. Nossa célula silenciada apresenta o mesmo perfil morfológico. Na figura 17, núcleos maiores podem ser observados nas células deficientes de DUSP3 e uma maior intensidade de fluorescência no nucleoplasma e um maior número de centros de alta expressão (CAE).

Figura 17 – Ensaio de imunofluorescência com sonda marcada no nucleotídeo modificado EU para quantificação do estado da transcrição global de células deficientes de DUSP3 e normais. Imagens representativas das condições do ensaio. Nas duas primeiras columnas da esquerda, MRC5 Mock, e, à direita, MRC5 2A. (a) condição controle. (b) dose baixa com 5 minutos de recuperação. (c) dose baixa com 15 minutos de recuperação. (d) dose alta com 5 minutos de recuperação e (e) dose alta com 15 minutos de recuperação. Dose baixa (UVC 6J/m²), dose alta (28J/m²). A sonda ligada ao nucleotídeo modificado está em verde, em azul o DAPI. Os pontos mais intensos representam sítios de maior atividade de transcrição. Foram analisados 100 núcleos por cada linhagem de célula sujeito a tratamento, a intensidade da fluorescência foi quantificada com o programa ImageJ e o valor foi determinado com a fórmula: $CTCF = \text{Densidade Integrada} - (\text{Área da célula selecionada} \times \text{Fluorescência média das leituras de fundo})$; onde CTCF é a fluorescência total celular corrigida, a área de cada célula foi determinada individualmente junto com seu background no programa ImageJ.

Nossos resultados mostram uma diferença significativa da intensidade de fluorescência entre as células normais e deficientes de DUSP3, em todas as condições (figura 18). Ao comparar a resposta de cada linhagem celular aos tratamentos, a célula deficiente de DUSP3 tem uma queda significativa após tratamento com dose baixa e alta, e a menor transcrição global se mantém após 15 minutos de recuperação (figura 19). Na célula normal, só a diferença após 15 minutos de tratamento e com a dose baixa foi significativa.

Figura 18 – Quantificação da transcrição global entre células deficientes de DUSP3 e normais. Foram analisadas a intensidade de fluorescência dos núcleos das células normais e deficientes de DUSP3 dentro de cada tratamento. Estatística: teste t de Student não pareado. (a) condição controle sem tratamento, $p < 0.0001$. (b), dose baixa e 5 minutos de recuperação, $p < 0.0001$. (c) dose alta e 5 minutos de recuperação, $p < 0.0001$. (d) dose alta e 15 minutos de recuperação, $p < 0.0001$. (e) dose baixa e 15 minutos de recuperação, $p < 0.0001$.

*Não foi considerado dentro do análise de grupos na figura 22.

Figura 19 – Quantificação da transcrição global entre células deficientes de DUSP3 e normais. Análise da intensidade de fluorescência por linhagem celular. (a) células deficientes de DUSP3 (MRC5 2A) sujeitas a diferentes condições. (b) células normais (MRC5 Mock) sujeitas a diferentes condições. “C” células sem tratamento, “6J/m² 15 min” irradiadas com 6J/m² e 15 minutos de recuperação, “28J/m² 5 min” irradiadas com 28J/m² e 5 minutos de recuperação e “28J/m² 15 min” células irradiadas com 28J/m² e 15 minutos de recuperação. Estatística: 1way ANOVA. (***) $p < 0.0001$, (**) $p < 0.001$.

Outra observação importante destes resultados foi que o número de centros de alta expressão (CAE) da célula silenciada é maior em relação à célula normal em todas as condições testadas. Na condição controle a diferença não é significativa, mas após tratamento, a célula deficiente de DUSP3 teria uma maior tradução de genes como os rDNA aumentado a diferença entre a célula normal e silenciada (figura 20). Já a análise dentro das células silenciadas mostra o aumento progressivo do número de centros de alta expressão, sendo o tratamento de dose baixa e após 15 minutos de recuperação o ponto com maior número deles. Interessante observar que há diferença de tendência da célula silenciada a aumentar o número dos centros de alta expressão, enquanto a célula normal teria uma queda (figura 21). Ao contrário da aparente igualdade traducional das células normais e deficientes de DUSP3, o estado transcricional das células é bastante diferente. Nossos resultados sugerem uma maior transcrição global na célula silenciada, o que pode ser devido a uma maior transcrição dos genes ribossômicos, uma vez que a expressão de genes como c-myc e xiap não apresenta diferenças significativas entre as células.

Figura 20 – Quantificação dos centros de alta expressão (CAE) com o nucleotídeo modificado e a sonda fluorescente. Foram contados o número de centros de alta expressão nas células normais e deficientes de DUSP3 dentro de cada tratamento. Estatística: teste t de Student não pareado. (a) condição controle sem tratamento, $p=0.1095$, ns. (b), dose baixa e 5 minutos de recuperação, $p<0.0001$. (c) dose baixa e 15 minutos de recuperação, $p<0.0001$. (d) dose alta e 5 minutos de recuperação, $p<0.0001$. (e) dose alta e 15 minutos de recuperação, $p<0.001$.

Figura 21 – Quantificação do número dos centros de alta expressão em células deficientes de DUSP3 e normais. Análise da quantidade dos centros de alta expressão por linhagem celular. (a) células deficientes de DUSP3 (MRC5 2A) sujeitas a diferentes condições. (b) células normais (MRC5 Mock) sujeitas a diferentes condições. "C" células sem tratamento, "6J/m² 5 min" irradiadas com 6J/m² e 5 minutos de recuperação, "6J/m² 15 min" irradiadas com 6J/m² e 15 minutos de recuperação, "28J/m² 5 min" irradiadas com 28J/m² e 5 minutos de recuperação e "28J/m² 15 min" células irradiadas com 28J/m² e 15 minutos de recuperação. Estatística: 1way ANOVA. (** $p<0.0001$, ** $p<0.001$).

4.6 Efeito da deficiência de DUSP3 na interação p53-HNRNPC1/C2

Shen et al., 2017, descreveram a interação direta entre HNRNPC1/C2 e p53 através do seu domínio RRM, interação essa inibida pela presença do lncRNA SNHG1 que se liga ao domínio RRM do HNRNPC e libera p53 em resposta a estresse. Neste ensaio, queríamos avaliar se a interação dessas duas proteínas é afetada pelo estado de fosforilação da HNRNPC, uma vez que já foi descrito que a fosforilação no resíduo Y57 do domínio RRM do HNRNPC aumenta sua afinidade e estabilidade de ligação as RNAs (Velusamy et al., 2008). Nossos primeiros resultados foram qualitativos, usando dois tampões (RIPA ou tampão fraco) e na presença de heparina, para evitar a degradação dos RNAs, ou ainda de RNases. Os dados obtidos nesses experimentos sugeriram uma possível deficiência na capacidade de ligação de HNRNPC com p53 na célula deficiente de DUSP3, sendo mais evidente quando o tampão contém inibidor de RNase (figura 22 a-i, a-ii). Para quantificar a interação de HNRNPC1/C2 com p53, foi feito uma réplica com tampão fraco e normalizada com os sinais da actina total das amostras. A figura 22 b-ii, mostra uma maior quantidade de HNRNPC unida a p53 na célula normal, sendo menor quando há RNAs intactos no tampão. Na célula deficiente de DUSP3, a interação p53-HNRNPC é menor em relação à célula normal com ou sem RNAs, da mesma maneira que na célula normal a interação é mais fraca quando há RNAs no tampão. A interação entre HNRNPC e p53 ocorre através do domínio RRM da HNRNPC1/C2 e os aminoácidos 1-41 da proteína p53. Os resíduos de Ser15 e Ser20 presentes nesta região de interação com p53 são importantes para a resposta apoptótica e estabilização da proteína p53 frente a estresse genotóxico (Dumaz e Meek, 1999; Chehab et al., 1999). Ao adicionar NaF (fluoreto de sódio) ao tampão, inibimos de forma geral Ser/Thr fosfatases, mantendo intactas as fosforilações dos resíduos Ser15 e Ser20. A interação de p53 com HNRNPC em presença de NaF apresenta o mesmo padrão ao comparar por separado as células normais e deficientes de DUSP3, com ou sem RNAs no tampão (apesar de uma sempre maior interação sem RNAs). Nas células normais a interação é maior (em relação à célula deficiente de DUSP3 com ou

sem RNAs), mas a adição de NaF aumenta as interações nos tampões sem RNAs nas duas linhagens celulares (figura 23 a-ii). Este dado sugere que o desbalanço do estado de fosforilação no domínio RRM da proteína HNRNPC, tem um impacto muito importante na estabilidade e atividades apoptóticas de p53.

Figura 22 – Co-imunoprecipitação de DUSP3 com a proteína p53 nas condições controle em presença de heparina ou RNases. (a) IP de p53 com dois tampões, (i) condição mais restritivas usando tampão RIPA. (ii) condição mais leve usando tampão fraco. (b-i) duplicata feita em condições leves, (b-ii) quantificação da proteína HNRNPC1/C2 interagindo com p53 (n=1). Foi normalizada pela quantidade de actina presente no lisado total. “T” poço para o lisado total, “S” poço para o sobrenadante, “L” poços para as lavagens, “IP” poço para a resina contendo as proteínas ligadas ao anticorpo. As setas indicam as bandas correspondentes a proteína HNRNPC. Os quadrados pontilhados indicam ausência da banda correspondente a proteína HNRNPC.

Figura 23 – Co-imunoprecipitação de DUSP3 com a proteína p53 na presença de Heparina e RNases. (a-i) IP-p53 usando tampão fraco e fluoreto de sódio (NaF) como inibidor de Ser/Thr fosfatases. (a-ii) quantificação da proteína HNRNPC1/C2 interagindo com p53 (n=1), normalizadas com actina total. “T” poço para o lisado total, “S” poço para o sobrenadante, “L” poço para as lavagens, “IP” poço para a resina contendo as proteínas ligadas ao anticorpo. As setas indicam a banda correspondente a proteína HNRNPC.

4.7 Interação entre DUSP3 e PABP

Os dados obtidos até então neste trabalho revelam uma interação direta entre DUSP3 e HNRNPC e que a ausência de DUSP3 tem um efeito nos níveis de fosfotirosina desta proteína. Dos processos biológicos regulados pelas proteínas HNRNPC1/C2, aparentemente existiria uma desregulação da tradução dos mRNA reconhecidos pelo domínio RRM da proteína HNRNPC em células deficientes de DUSP3. Estes resultados, juntamente com as informações disponíveis sobre resíduos de tirosina fosforilados da HNRNPC com efeito biológico disponível no site www.phosphosite.org, sugerem que a

proteína HNRNPC interage com a DUPS3 através de seu domínio RRM e que a perda de DUPS3 aumentaria a estabilidade dos complexos HNRNPC1/C2-mRNA. O domínio RRM presente nas proteínas HNRNPC é bastante conservado entre as proteínas HnRNPs (Han et al., 2010), além disso, entre os possíveis alvos achados por espectrometria de massas, 11 proteínas apresentam domínio de ligação a RNA (Panico e Forti, 2013; Forti, 2014). PABP é uma das proteínas encontradas mais abundantes nos ensaios de espectrometria (mesmo acima de HNRNPC1/C2, NUCL e NPM), tem 636 aminoácidos com 70kDa de peso molecular e apresenta 4 domínios RRM. Neste ensaio, tentou-se saber se a DUPS3 possui alguma afinidade estrutural para os domínios RRM presentes nas proteínas HnRNPs. Como já mencionado, a DUPS3 carece de um domínio exclusivo para o reconhecimento de seus alvos, mesmo apresentando certa especificidade para algumas MAPKs e receptores de tirosina quinase. Entretanto o mecanismo pelo qual esta fosfatase reconhece seus alvos ainda não é conhecido. A figura 24 demonstra a interação de DUPS3 com PABP, e que essa interação depende da presença de RNA. Esses dados reforçam nossa teoria da interação direta de HNRNPC1/C2 e DUPS3 através de seu domínio RRM.

Figura 24 - Co-imunoprecipitação de DUPS3 com a proteína PABP na presença de Heparina e RNases. (a) IP-PABP usando tampão D2 e revelado com DUPS3. (b) IP-DUPS3 usando tampão D2 e revelado para PABP. “T” poço para o lisado total, “A” poço para a resina da etapa do pre-cleaning, “S” poço para o sobrenadante, “L” poço para as lavagens, “IP” poço para a resina contendo as proteínas ligadas ao anticorpo. As setas indicam a banda correspondente a proteína DUPS3 ou PABP. O quadrado pontilhado indica ausência da banda correspondente a proteína PABP.

4.8 Inibição da tradução global e estabilidade proteica

Para saber se a deficiência de DUSP3 afeta a meia-vida das proteínas HNRNPC, PABP e p53, neste ensaio as células normais e as deficientes DUSP3 foram tratadas com cicloheximida (CHX) para inibir a tradução global de proteínas. O lisado de células tratadas por 1H, 2H, 4H, 6H e 8H com CHX a uma concentração de 150 ug/ml foi coletado e analisado por Western blot. Nossos resultados de duas réplicas biológicas sugerem que as células silenciadas teriam uma quantidade maior de proteína HNRNPC1/C2 e p53 do que as células normais e, pelo contrário, PABP seria menos abundante (n=1 para o resultado de PABP). O último resultado está de acordo com o observado nos Western blots das frações do perfil de polirribossomos (figura 11-b), onde aparentemente a célula silenciada apresenta uma menor quantidade de PABP. A partir de quatro horas de exposição ao CHX, há uma queda na quantidade de HNRNPC em ambas células, sendo mais pronunciada nas células normais. Os níveis de p53 permanecem estáveis nas duas linhagens, mas aparentemente a célula normal teria um aumento em relação a seu nível inicial. Pelo contrário, o PABP aumenta sua expressão após duas horas, nas duas linhas celulares. Aparentemente, a DUSP3 permanece estável apesar da inibição da síntese de proteínas (figura 25-b). Esses dados sugerem uma maior estabilidade do HNRNPC nas células silenciadas, e, possivelmente, com isso também é gerada uma maior estabilidade do p53. O mecanismo pelo qual a HNRNPC permanece mais estável pode ser devido ao aumento dos níveis de fosfotirosinas em seu domínio RRM, o que permitiria que ele permanecesse ligado aos seus RNAs alvo e evitasse a degradação. No caso da p53, a perda da interação com o HNRNPC impede direcioná-la para o sistema proteassoma (Shen et al., 2017). PABP é uma proteína necessária para a tradução dependente de cap, a inibição da tradução global pode ser estímulo suficiente para a síntese de novas proteínas a fim de reverter o déficit na síntese proteica. A estabilidade nos níveis de DUSP3 pode ser devido a dois motivos: o estresse gerado pela CHX é estímulo suficiente para sua fosforilação por uma das quinases ZAP-70, Tyk2 e VRK3 (Hoyt et al., 2007; Alonso et al., 2003; Kang e Kim, 2006), permitindo aumentar

sua meia-vida, ou a possibilidade de formação de dímeros da DUSP3 pode ser um mecanismo pelo qual sua estabilidade aumenta, assim como a regulação negativa da sua atividade (Pavic et al., 2014).

Figura 25 – Inibição da tradução global com cicloheximida de células normais e deficientes de DUSP3 e estabilidade de algumas proteínas. (a) membrana representativa da expressão das proteínas HNRNPC, p53, PABP e DUSP3 em células tratadas com CHX. (b - i, ii e iv) quantificação da expressão das proteínas HNRNPC, p53, e DUSP3 de duas réplicas biológicas. (b-iii) quantificação da expressão da proteína PABP (n=1). As condições foram normalizadas em relação ao controle Mock.

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho estudamos o efeito da deficiência de DUSP3 nas funções moleculares de sua proteína alvo HNRNPC e nos processos biológicos nos quais ela estaria participando. Nossos resultados confirmam a interação direta de DUSP3 com HNRNPC, e o efeito imediato da ausência da fosfatase é um aumento nos níveis de fosfotirosinas presentes na sequência de aminoácidos desta proteína (Figura 5 e 6). A possível interação de DUSP3 com a proteína PABP (proteína com 4 domínios RRM) sugere que esta fosfatase teria uma especificidade para os domínios RRM dessas proteínas. É importante mencionar que dentro do nosso grupo de trabalho está sendo estudada a interação da DUSP3 com o NUCL, uma proteína que também possui quatro domínios RRM. Dentro do domínio RRM da proteína HNRNPC, existem duas tirosinas, das quais o resíduo Tyr57, quando fosforilado, aumenta a afinidade da proteína HNRNPC pelo seu mRNA alvo (www.phosphosite.org, Velusamy et al., 2008). Esses dados reforçam a hipótese que DUSP3 estaria regulando funcionalmente a proteína HNRNPC, desfosforilando seu domínio RRM e regulando sua capacidade de ligação ao RNA.

Dos processos biológicos, nossos resultados indicam que a deficiência de DUSP3 não teria um impacto significativo na biogênese dos ribossomos. Os níveis de expressão das espécies de rRNA foram semelhantes nas condições de controle e nos tratamentos com UVC (figura 7), além disso, o perfil de polirribossomos das células silenciadas e normais foi semelhante (figura 8 e 9), sem a presença de variações bruscas como Halfmers ou perda de alguma subunidade. A proporção total de subunidades ribossômicas (40S/60S, obtidas do tratamento com EDTA), nas células MRC5 e células XPA, foi quase idêntica (Figura 12-b). Apesar desta aparente igualdade entre células normais e deficientes em DUSP3, ao analisar a transcrição global dessas células, foram observadas diferenças importantes. Sob condições de repouso, a célula silenciada tem uma transcrição geral maior em relação a célula normal (Figura 18-21). Aquela diferença significativa é mantida após o tratamento com doses baixas e altas de UVC. Para entender melhor este dado, deve se considerar na

análise da transcrição global a diferença morfológica das células, onde observou-se que o núcleo das células silenciadas é muito maior comparado às células normais (Figura 17). Isso pode gerar essa diferença significativa observada em todos os tratamentos, incluindo condições de controle. Mesmo assim, ao avaliarmos a resposta dentro de cada linha celular, para os diferentes tratamentos, dados surpreendentes são obtidos. A transcrição geral da célula silenciada para DUSP3 cai após ser exposta ao UVC (Figura 19-a), a queda é significativa e semelhante para as duas doses. Do contrário, para a célula normal a queda é leve e não significativa para a dose alta; na dose baixa após 15 minutos, a queda é significativa, mas é ainda menor do que a experimentada pela célula deficiente (Figura 19 - b). Ao analisar o número dos CAE entre a célula normal e deficiente, a célula silenciada sempre apresenta um número maior em relação ao da célula normal, sendo significativa após cada tratamento (Figura 20). Ao analisar dentro dos grupos, outro resultado interessante, a tendência na célula silenciada é aumentar no número dos CAE (condição: dose baixa, 15 minutos de recuperação, significativa), enquanto na célula normal a tendência é contrária (condição: dose alta, recuperação de 5 minutos, significativa) (figura 21 a, b). Esses dados sugerem a superexpressão dos genes rDNAs e o acúmulo das espécies ribossômicas como 5.8S, 18S e 28S. Mas este último efeito contradiz os resultados obtidos pelos ensaios de RT-qPCR e pela análise do perfil de polirribossomos. Um número maior de espécies ribossômicas deve gerar uma síntese proteica mais alta e uma relação Polissomos/40S mais alta, no entanto, isso não parece ser o caso na célula deficiente. Tudo faz pensar que há uma falta de controle na transcrição dos genes ribossômicos, mas eles não conseguem formar ribossomos maduros. Tafforeau et al. descreveu o efeito da deficiência de HNRNPC no processamento dos pré-rRNAs, onde a ausência de HNRNPC gera um acúmulo superior a 2,5 vezes dos pré-rRNAs 47S, 34S e 30S (Tafforeau et al., 2013). Possivelmente, a deficiência de DUSP3 gera o acúmulo das espécies 47S, 45S, 34S e 30S através da desregulação das funções do HNRNPC, e esse acúmulo limita a formação das subunidades ribossômicas. Um dado obtido que reforça essa possibilidade é o nível da

expressão das espécies ribossômicas 47S, 45S, 34S e 30S após estresse e 15 minutos de recuperação (teste RT-qPCR - figura 7-c). Embora a diferença não seja significativa ($p=0,07$), há uma tendência para o aumento desses pré-rRNAs. Então, a deficiência de DUSP3 gera uma superexpressão dos genes rDNAs, mas essa superexpressão é limitada pelo acúmulo das espécies ribossômicas, limitando a taxa de biogênese dos ribossomos maduros. Após uma dose baixa de UVC, existe uma super-estimulação da expressão gênica dos rDNAs que aumenta o acúmulo dos pre-rRNAs e afeta a concentração das espécies ribossômicas 47S, 45S, 34S e 30S.

Do estado traducional das células analisadas através do perfil de polirribossomos, sob condições livres de estresse, existe uma tendência da célula deficiente em apresentar uma menor síntese proteica (razão Polissomos/40S, nas células MRC5 2A e XPA 2A) em relação à célula normal (figura 9 a, d). Após tratamento com UVC, na célula MRC5 normal, há uma tendência a diminuir a relação P/40S. Por outro lado, a célula deficiente mantém um nível semelhante após doses baixas e altas de UVC (Figura 9 b-c). As proporções P/40S e P/80S dão uma ideia de quantidade de síntese proteica que a célula possui. Isso sugere que a célula deficiente é menos sensível à inibição da tradução pelo estresse genotóxico (UVC), ou que sua resposta a esse estímulo é desregulada. Esses dados, juntamente com os resultados de Western blot das frações e o Co-IP das proteínas ribossômicas, sugerem que a DUSP3 teria algum papel na síntese de proteínas. Neste trabalho determinamos a localização de DUSP3, HNRNPC e PABP nos ribossomos (Figura 10-b, 11-b). A presença de DUSP3 nas frações correspondentes à subunidade 40S sem tratamento, sugere que esta fosfatase estaria presente no ribossomo nas condições basais da célula. A diferença nas quantidades de DUSP3 e HNRNPC encontrada nas subunidades ribossômicas após o tratamento com EDTA sugere que existiriam outros possíveis parceiros de DUSP3 nos complexos ribonucleoproteicos da subunidade menor (Figura 13 a-b). Assim determinamos a interação de DUSP3 e PABP através do Co-IP em ambas direções, e observamos que a interação deles depende da presença de RNA (Figura 24 a-b). Além disso, da Figura 11-b,

podemos dizer que, possivelmente na célula silenciada, há uma quantidade menor de PABP nos ribossomos nas condições basais, em comparação com a quantidade de PABP presente na célula normal. PABP é uma proteína necessária para a estabilidade do mRNA na subunidade 40S. Uma presença mais baixa dessa proteína teria um impacto na tradução geral da célula (Le et al., 1997; Preiss e Hentze, 1999). Esses dados coincidem com os obtidos no perfil dos polirribossomos, onde a célula deficiente (MRC5 2A e XPA 2A) teria uma relação P/40S mais baixa. Após a irradiação da célula deficiente a concentração de PABP aumentaria, enquanto na célula normal sua presença diminuiria (figura 11 - b). Esse dado poderia ser o motivo para que a razão P/40S das células deficientes em DUSP3 seja mantida e a proporção nas células normais tenderia a diminuir.

A presença de HNRNPC nos ribossomos também faz dele um candidato para ser parceiro de DUSP3 nos complexos ribonucleoproteicos dos ribossomos. A distribuição de HNRNPC nas frações do perfil de polirribossomos nas condições controle e sob estresse da figura 11 parece não ser dependente de estímulo. No entanto, este dado é controverso. A réplica biológica apresentada no anexo 6, sugere uma maior presença de HNRNPC nas frações dos polirribossomos das células deficientes. Além disso, parece aumentar após o tratamento com doses baixas e tempos de recuperação de 5 e 15 minutos. Com tudo isso, nossos resultados nos permitem levantar a seguinte hipótese: HNRNPC estaria nos ribossomos formando complexos que possivelmente facilitam a síntese de mRNA específicos, entre eles c-myc e xiap.

Nos quatro ensaios apresentados aqui (figura 15, 15.1, 16 e 16.1), sob condições livres de estresse, a expressão das proteínas XIAP e c-MYC em células deficientes de DUSP3 estão ~50% acima da expressão na célula normal. A expressão dessas proteínas após o bloqueio em diferentes fases do ciclo sugere uma variação dependendo de sua função. c-MYC, um proto-oncogene responsável pelos sinais de proliferação, diferenciação e apoptose (Pelengaris et al., 2002), apresenta uma queda na sua expressão na célula silenciada após saída das fases G₀/G1 e G1/S. Na célula silenciada à medida que progride

no seu ciclo celular, a expressão de c-MYC vai aumentando consideravelmente. Na célula normal, o nível de expressão de c-MYC permanece constante até 1 hora em relação à condição controle e aumenta à medida que progride em seu ciclo celular. c-MYC é uma proteína essencial para a progressão do ciclo celular e seus níveis de expressão nas células em proliferação são mantidos constantes durante o ciclo celular por mecanismos de tradução dependentes de cap e IRES (Kim et al., 2003). As células normais e deficientes de DUSP3 que foram bloqueadas na fase G2/M (figura 15-b), mantêm um nível de expressão semelhante durante os primeiros períodos após o bloqueio. No entanto, a célula silenciada aumenta a síntese de c-MYC à medida que progride no seu ciclo e, eventualmente, excede o nível de expressão da célula normal. Esse padrão parece ser semelhante ao apresentado nas outras fases. A célula silenciada diminui drasticamente a expressão da proteína c-MYC, mas assim que progride no ciclo, ela se recupera do estresse gerado pelo bloqueio e sua expressão fica fora de controle novamente, excedendo em muito as células normais.

Células tumorais silenciadas para DUSP3 são sensíveis a danos genotóxicos (Torres et al., 2017) e possuem menor capacidade de tolerância ao estresse. Assim nas células MRC5 2A é possível que a ausência de DUSP3 interfira com os mecanismos reguladores da expressão de c-MYC, gerando a superexpressão dessa proteína. Embora, c-MYC tem dupla atividade, esse fator de transcrição pode favorecer a proliferação e passagem da célula através do ciclo celular, mas também é um potente indutor de apoptose (Amati et al., 1993). Nas células paradas em alguma fase do ciclo celular a superexpressão de c-MYC ativa a apoptose independentemente do método utilizado para o bloqueio, sendo as células paradas nas fases G₀/G1 e G1/S as mais sensíveis (Evan et al., 1992, Askew et al., 1991). A ativação de apoptose por c-MYC depende de um conjunto de fatores de transcrição, coativadores e da disponibilidade dos promotores dos genes-alvo de c-MYC (Benvenisty et al., 1992; Kretzner et al., 1992). Embora a associação de c-MYC com o seu parceiro Max possa desencadear apoptose em células bloqueadas nas fases G₀ e G1, a superexpressão

desse fator pode bloquear a função proliferativa e apoptótica do c-MYC (Mäkelä et al., 1992, Nilsson e Cleveland, 2003).

Apoptose é um mecanismo sempre ativo e é realizado a menos que a célula receba sinais de sobrevivência suficientes para impedi-la (Raff, 1992). Vários estudos envolvem c-MYC em uma resposta eficiente a uma variedade de estímulos apoptóticos, sugerindo que o c-MYC não atuaria como um efetor de apoptose, mas sensibilizaria a célula a uma variedade de gatilhos apoptóticos (Evan e Littlewood, 1998). A predisposição para ativar a resposta apoptótica nas células está correlacionada com o nível de expressão da proteína c-MYC; os níveis basais de c-MYC das células não transformadas são suficientes para induzir a apoptose. Portanto, estímulos secundários e sinais recebidos pela célula definirão o destino proliferativo ou apoptótico da célula superexpressora c-MYC (Evan et al., 1992).

Nas células analisadas neste projeto, o c-MYC vai promover proliferação e morte celular ao mesmo tempo. Nossos dados de expressão de c-MYC em células sincronizadas mostram que as células deficientes em DUSP3 e bloqueadas nas fases G₀/G1 e G1/S diminuem sua expressão de c-MYC como um mecanismo de sobrevivência. As células que conseguem reduzir seu nível de expressão conseguem superar o sinal pró-apoptótico e continuam com seu ciclo aumentando sua expressão novamente. Isso sugere que, na condição basal da célula deficiente, existe um mecanismo que vai manter o nível de expressão de c-MYC elevado, independente do papel que ele desempenha na proliferação, diferenciação e apoptose. A superexpressão da proteína c-MYC deve ser restaurada para níveis normais e assim superar o estresse decorrente de bloqueios em determinadas fases do ciclo. Esse possível mecanismo poderia explicar, nas células deficientes, a queda na expressão de c-MYC após radiação com dose baixa (seu nível cai próximo ao da célula normal), e sua incapacidade de se recuperar após uma dose alta (figura 16).

A expressão de c-MYC em células quiescentes (G₀/G1) é quase nula. Após estimulação por mitógenos ou presença de soro no meio, a expressão do mRNA de c-myc, e, a tradução de sua proteína são rapidamente induzidas. As células sob estimulação

entram rapidamente na fase G1 do ciclo celular, os níveis de c-MYC caem novamente, mas sua expressão é mantida nas condições basais durante todo o ciclo (Amati et al., 1998; Amati, 2001; Eilers, 1999). Nosso sistema analisado é de células imortalizadas com o vírus SV40. Este vírus afeta os níveis de c-MYC, mantendo-o superexpresso (Kim et al., 2010). Por esse motivo, após o bloqueio com deficiência sérica (G_0/G_1), as células normais e deficientes apresentam níveis consideráveis de c-MYC. Da mesma forma, as células bloqueadas na fase G1/S do ciclo celular continuam mostrando níveis apreciáveis de c-MYC. O efeito do método usado para a imortalização celular é muito mais evidente na célula normal. Os níveis de c-MYC não variam com relação à condição de controle, mesmo após o bloqueio com deficiência sérica. Na fase G2/M, há um aumento em sua expressão que pode ser explicado pela tradução da proteína favorecida por mecanismos de síntese independentes cap (Kim et al., 2003). A célula silenciada, é afetada pela deficiência sérica, a expressão de c-MYC diminui, mas o nível é comparável ao apresentado pela célula normal, talvez pelo efeito do mecanismo de imortalização. Da mesma forma, na fase G2/M, a síntese dependente de IRES de c-MYC mantém o nível constante. Claramente, o status biológico de nossas células influencia o resultado do aumento da expressão de c-MYC e pode ter um papel na determinação de quais genes-alvo de c-MYC são expressos ou reprimidos. Porém, podemos afirmar que a deficiência de DUPS3 está desregulamentando os níveis de expressão de c-MYC, o que poderia ter um impacto na capacidade pró-oncogênica desse fator de transcrição.

Por outro lado, o XIAP tem um papel fundamental na inibição do apoptose. Pertencente à família de inibidores de apoptose IAPs, o XIAP é o único membro capaz de inibir diretamente as fases de iniciação e execução da via das caspases (Tong et al., 2005; Eckelman et al., 2006). Sua superexpressão em células cancerígenas e linhagens celulares suprime a apoptose induzida por uma variedade de estímulos, incluindo sinais direcionados pelo fator de necrose tumoral, Fas, deficiência sérica ou fatores de crescimento, isquemia e radioterapia (Notarbartolo et al., 2004).

Nossos resultados (Figura 15.1), os níveis de XIAP na célula silenciada são maiores em relação à célula normal em todas as condições. Semelhante ao padrão de expressão de c-MYC, na célula deficiente, há uma queda na sua expressão nos estágios iniciais de liberação. No entanto, após 1 hora, seus valores são restaurados e excedem em muito os da célula normal. Com esses resultados, podemos inferir que uma expressão mais alta da proteína c-MYC aumentaria sua atividade transcricional e, assim, induziria um aumento na expressão do gene *xiap* que afetaria os níveis da proteína XIAP. No entanto, nossos resultados de expressão gênica (tabela 2) dos genes *c-myc* e *xiap* não mostram diferença significativa (em condições sem estresse). Este resultado sugere a existência de um mecanismo comum para essas duas proteínas que faz aumentar sua expressão independentemente do seu nível de transcrição. Após estresse com dose leve de UVC, a célula silenciada (mais sensível ao estresse), tem uma queda gradual de c-MYC e uma estabilização da expressão de XIAP (figura 16, 16.1 - a). Assim como nos bloqueios no ciclo celular, a célula deficiente de DUSP3 precisa diminuir os níveis de expressão de c-MYC para poder superar o estresse gerado pela radiação UVC. Tem se descrito que a intensa atividade da c-MYC gera instabilidade genômica, a superexpressão desta proteína gera dano no DNA a traves da indução de espécies reativas de oxigênio (ROS) sem indução de apoptose e pela atividade nos origens de replicação com danos subsequentes ao DNA (estresse de replicação do DNA) e ativação do ponto de verificação (Vafa et al., 2002; Dominguez-Sola et al., 2007). A célula deficiente de DUSP3 teria que diminuir a expressão de c-MYC reduzindo o dano no DNA e assim facilitar o reparo. A estabilidade de XIAP é explicada pela principal função desta proteína, a inibição do apoptose. Com doses altas de UVC, a quantidade de c-MYC e XIAP vai diminuendo até atingir níveis menores à célula normal, o que reflete a incapacidade da célula silenciosa de reverter o dano no DNA (Torres et al., 2017). HNRNPC faz parte dos complexos ITAF que reconhecem sequências específicas nos mRNAs de *c-myc* e *xiap* (IRES). A ligação das proteínas HNRNPC1/C2, além de promover a expressão em condições de estresse, permite estabilizar o mRNA e impede sua

rápida degradação (Kim et al., 2003; Shetty, 2005; Sébillon et al., 1995; Velusamy et al. 2008). Assim, o HNRNPC manteria um estoque de seu mRNA alvo para resposta rápida a certos estímulos. Uma desregulação desse mecanismo poderia favorecer a síntese de certas proteínas e até permitir sua síntese na ausência do estímulo correto.

Da interação das proteínas HNRNPC e p53 nossos dados obtidos na seção 4.6 reforçam a hipótese de hiperfosforilação do domínio RRM da proteína HNRNPC, devido à ausência de DUSP3. Esse domínio, no seu estado fosforilado, teria uma maior afinidade por seus RNAs alvo, o que geraria um aumento na meia-vida do complexo proteína-RNA (Velusamy et al., 2008). Assim também, esse domínio poderia se ligar à região entre os aminoácidos 1-41 da proteína p53, região que desempenha um papel importante na estabilidade e nas funções pró-apoptóticas da proteína (Dumaz e Meek, 1999; Chehab et al., 1999). O possível papel da proteína HNRNPC no núcleo seria sinérgico com a função da proteína MDM2, ou seja, as proteínas HNRNPC e MDM2 inibem as funções da p53, direcionando-a para a degradação (Shen et al., 2017). Por consequência, a deficiência de DUSP3 teria um impacto direto nos níveis de proteína p53, mantendo o domínio RRM de HNRNPC hiperfosforilado e sequestrado formando complexos com o lncRNA SNHG1.

Esses dados sugerem que: i) na ausência de DUSP3, o HNRNPC estaria formando complexos proteína-RNA mais estáveis, a composição deles determinará sua função e seu efeito prejudicial sobre a célula; ii) no citoplasma, formariam complexos ITAFs ligados ao mRNA e facilitariam a tradução de proteínas específicas independentemente do estímulo, por exemplo c-MYC; iii) a superexpressão de c-MYC estimularia a transcrição de genes ribossômicos, danos ao DNA, aumento no tamanho celular, desorganização da cromatina e sensibilizaria a célula para apoptose; iv) a superexpressão de XIAP permitiria neutralizar parte do sinal pró-apoptótico; v) no núcleo, HNRNPC ligado aos lncRNAs sequestraria essa proteína inibindo sua interação com a p53, além de gerar um fenótipo semelhante ao silenciamento de HNRNPC, impactando no processamento dos pré-rRNAs e gerando um acúmulo da espécie 47S.

Figura 26 – Possível mecanismo de interação de DUSP3 com a proteína HNRNPC1/C2. (i) No núcleo, HNRNPC1/C2 fica retido nos speckles junto com LncRNAs. A desfosforilação de HNRNPC pela DUSP3 vai permitir a saída desta proteína dos complexos RNA-proteínas e interagir com P53, dirigindo a P53 para a sua degradação. (ii) DUSP3 interage com o domínio RRM fosforilado da HNRNPC nos complexos ITAFs presentes nos ribossomos. HNRNPC1/C2 desfosforilada é liberada dos complexos ITAF inibindo a tradução do mRNA contendo IRES. (iii) DUSP3 possivelmente interage com PABP fosforilada nos complexos estabilizadores do mRNA na subunidade 40S. PABP desfosforilada poderia ter uma maior afinidade pelo seu RNA alvo, favorecendo a taxa de tradução global.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho, nossos resultados corroboram o compromisso da DUSP3 na regulação de diferentes funções biológicas do HNRNPC1/C2. Nossos resultados mostram a interação direta entre a DUSP3 e HNRNPC1/C2, desfosforilando seus resíduos de tirosina no seu domínio RRM. Sugerem ainda, uma interação específica da estrutura terciária $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$, presente não apenas no HNRNPC, mas em outros alvos de DUSP3, como NUCL e PABP, além de 9 possíveis parceiros encontradas por espectrometria de massas.

A perda de DUSP3 parece levar a célula a perda do controle da tradução dependente de IRES mediada por complexos ITAF/HNRNPC, via hiperfosforilação do domínio RRM. Essa desregulação gera um desequilíbrio geral na homeostase da célula e a sensibiliza para apoptose, através da superexpressão de c-MYC ou aumento na estabilidade de P53. A hiperfosforilação do domínio RRM limitaria a disponibilidade de HNRNPC para seus locais de ação dentro do núcleo, gerando um fenótipo semelhante a uma deficiência de HNRNPC (complexos RNA-HNRNPC mais estáveis), o qual geraria um acúmulo de pré-rRNAs (o mecanismo pelo o qual a deficiência de HNRNPC1/C2 gera um acúmulo do pré-rRNA 47S não é conhecido). A pouca disponibilidade de HNRNPC dentro do núcleo teria um impacto direto nos níveis de p53 nas condições basais, aumentando a estabilidade desta proteína e enviando um sinal de parada do ciclo celular (Rahmouni et al., 2006). No citoplasma, a DUSP3 estaria interagindo com HNRNPC1/C2 e PABP nos complexos ribossomais da subunidade 40S. A deficiência desta fosfatase aumentaria a presença dos complexos ITAF, e possivelmente, uma diminuição da formação do complexo estabilizador do mRNA (PABP- eIF4G-eIF4B), gerando uma menor tradução global nas células deficientes de DUSP3.

A especificidade de DUSP3 pelos seus alvos contendo domínios RRM, vai ter um impacto na dinâmica dos complexos RNA-proteínas. Nucleolina, pode sequestrar a telomerase nos nucléolos a traves da união com a enzima hTERT e a hTR (Khurts et al., 2004). Além disso a superexpressão de HNRNPC tem a capacidade de reter a hTR fora

dos extremos telomericos inibindo a elongação dos telômeros e o encurtamento destes característicos das células senescentes (Rahmouni et al., 2006). Com tudo isso, nós propomos que DUSP3 tem um papel importante na regulação da interação das proteínas com domínio RRM e seus RNA alvos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahnström, M., Nordenskjöld, B., Rutqvist, L. E., Skoog, L., & Stål, O. (2005). Role of cyclin D1 in ErbB2-positive breast cancer and tamoxifen resistance. *Breast cancer research and treatment*, 91(2), 145-151.
- Alonso, A., Rahmouni, S., Williams, S., van Stipdonk, M., Jaroszewski, L., Godzik, A., ... & Mustelin, T. (2003). Tyrosine phosphorylation of VHR phosphatase by ZAP-70. *Nature immunology*, 4(1), 44.
- Alonso, A., Rojas, A., Godzik, A., & Mustelin, T. (2004-b). The dual-specific protein tyrosine phosphatase family. In *Protein phosphatases* (pp. 333-358). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Alonso, A., Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, I., Friedberg, I., Osterman, A., ... & Mustelin, T. (2004). Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell*, 117(6), 699-711.
- Alonso, A., Saxena, M., Williams, S., & Mustelin, T. (2001). Inhibitory role for dual specificity phosphatase VHR in T cell antigen receptor and CD28-induced Erk and Jnk activation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(7), 4766-4771.
- Amand, M., Erpicum, C., Bajou, K., Cerignoli, F., Blacher, S., Martin, M., ... & Vandereyken, M. (2014). DUSP3/VHR is a pro-angiogenic atypical dual-specificity phosphatase. *Molecular cancer*, 13(1), 108.
- Arnoldussen, Y. J., Lorenzo, P. I., Pretorius, M. E., Wæhre, H., Risberg, B., Mælandsmo, G. M., ... & Saatcioglu, F. (2008). The Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase Vaccinia H1-Related Protein Inhibits Apoptosis in Prostate Cancer Cells and Is Overexpressed in Prostate Cancer. *Cancer research*, 68(22), 9255-9264.
- Baldin, V., Lukas, J., Marcote, M. J., Pagano, M., & Draetta, G. (1993). Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes & development*, 7(5), 812-821.
- Barnett, S. F., Friedman, D. L., & LeStourgeon, W. M. (1989). The C proteins of HeLa 40S nuclear ribonucleoprotein particles exist as anisotropic tetramers of (C1) 3 C2. *Molecular and cellular biology*, 9(2), 492-498.
- Bayón, Y., & Alonso, A. (2010). Atypical DUSPs: 19 phosphatases in search of a role.
- Bennett, M., Pinol-Roma, S., Staknis, D., Dreyfuss, G., & Reed, R. (1992). Differential binding of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins to mRNA precursors prior to spliceosome assembly in vitro. *Molecular and cellular biology*, 12(7), 3165-3175.
- Bermudez, O., Pagès, G., & Gimond, C. (2010). The dual-specificity MAP kinase phosphatases: critical roles in development and cancer. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 299(2), C189-C202.

- Boutros, T., Chevet, E., & Metrakos, P. (2008). Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer. *Pharmacological reviews*, 60(3), 261-310.
- Burd, C. G., Swanson, M. S., Görlach, M., & Dreyfuss, G. (1989). Primary structures of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2, B1, and C2 proteins: a diversity of RNA binding proteins is generated by small peptide inserts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(24), 9788-9792.
- Cerignoli, F., Rahmouni, S., Ronai, Z. E., & Mustelin, T. (2006). Regulation of MAP Kinases by the VHR Dual-Specific Phosphatase—Implications for Cell Growth and Differentiation. *Cell cycle*, 5(19), 2210-2215.
- Chen, M. J., Dixon, J. E., & Manning, G. (2017). Genomics and evolution of protein phosphatases. *Sci. Signal.*, 10(474), eaag1796.
- Cho, S. S. L., Han, J., James, S. J., Png, C. W., Weerasooriya, M., Alonso, S., & Zhang, Y. (2017). Dual-specificity phosphatase 12 targets p38 MAP kinase to regulate macrophage response to intracellular bacterial infection. *Frontiers in immunology*, 8, 1259.
- Cohen, P. T. W., Arino, J., & Alexander, D. R. (2004). *Topics in Current Genetics: protein phosphatases*.
- Dennis, E. A., & Bradshaw, R. A. (Eds.). (2011). *Transduction Mechanisms in Cellular Signaling: Cell Signaling Collection*. Academic Press.
- Denu, J. M., & Dixon, J. E. (1998). Protein tyrosine phosphatases: mechanisms of catalysis and regulation. *Current opinion in chemical biology*, 2(5), 633-641.
- Denu, J. M., Zhou, G., Guo, Y., & Dixon, J. E. (1995-b). The catalytic role of aspartic acid-92 in the human dual-specific protein-tyrosine-phosphatase vaccinia h1-related. *Biochemistry*, 34(10), 3396-3403.
- Denu, J. M., Zhou, G., Wu, L., Zhao, R., Yuvaniyama, J., Saper, M. A., & Dixon, J. E. (1995). The purification and characterization of a human dual-specific protein tyrosine phosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, 270(8), 3796-3803.
- Dominguez-Sola, D., Ying, C. Y., Grandori, C., Ruggiero, L., Chen, B., Li, M., ... & Dalla-Favera, R. (2007). Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc. *Nature*, 448(7152), 445.
- Dreyfuss, G., Kim, V. N., & Kataoka, N. (2002). Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nature reviews Molecular cell biology*, 3(3), 195.
- Eves, E. M., Shapiro, P., Naik, K., Klein, U. R., Trakul, N., & Rosner, M. R. (2006). Raf kinase inhibitory protein regulates aurora B kinase and the spindle checkpoint. *Molecular cell*, 23(4), 561-574.

- Farooq, A., & Zhou, M. M. (2004). Structure and regulation of MAPK phosphatases. *Cellular signalling*, 16(7), 769-779.
- Forti, F. L. (2014). Combined experimental and bioinformatics analysis for the prediction and identification of VHR/DUSP3 nuclear targets related to DNA damage and repair. *Integrative Biology*, 7(1), 73-89.
- Forti, F. L., Nascimento, M. H., & Torres, T. E. (2010). Investigating roles of dual tyrosine phosphatases in DNA damage responses. *International Journal of Low Radiation*, 7(4), 259-267.
- Geuens, T., Bouhy, D., & Timmerman, V. (2016). The hnRNP family: insights into their role in health and disease. *Human genetics*, 135(8), 851-867.
- Golding, S. E., Rosenberg, E., Neill, S., Dent, P., Povirk, L. F., & Valerie, K. (2007). Extracellular signal-related kinase positively regulates ataxia telangiectasia mutated, homologous recombination repair, and the DNA damage response. *Cancer Research*, 67(3), 1046-1053.
- Görlach, M., Burd, C. G., & Dreyfuss, G. (1994). The determinants of RNA-binding specificity of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 269(37), 23074-23078.
- Görlach, M., Wittekind, M., Beckman, R. A., Mueller, L., & Dreyfuss, G. (1992). Interaction of the RNA-binding domain of the hnRNP C proteins with RNA. *The EMBO journal*, 11(9), 3289-3295.
- Guan, K., Broyles, S. S., & Dixon, J. E. (1991). A Tyr/Ser protein phosphatase encoded by vaccinia virus. *Nature*, 350(6316), 359.
- Hamosh, A., Scott, A. F., Amberger, J. S., Bocchini, C. A., & McKusick, V. A. (2005). Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), a knowledgebase of human genes and genetic disorders. *Nucleic acids research*, 33(suppl_1), D514-D517.
- Hao, L., & ElShamy, W. M. (2007). BRCA1-IRIS activates cyclin D1 expression in breast cancer cells by downregulating the JNK phosphatase DUSP3/VHR. *International journal of cancer*, 121(1), 39-46.
- Hegele, A., Kamburov, A., Grossmann, A., Sourlis, C., Wowro, S., Weimann, M., ... & Stelzl, U. (2012). Dynamic protein-protein interaction wiring of the human spliceosome. *Molecular cell*, 45(4), 567-580.
- Henkens, R., Delvenne, P., Arafa, M., Moutschen, M., Zeddou, M., Tautz, L., ... & Rahmouni, S. (2008). Cervix carcinoma is associated with an up-regulation and nuclear localization of the dual-specificity protein phosphatase VHR. *BMC cancer*, 8(1), 147.

- Herbst, R. S., Morgensztern, D., & Boshoff, C. (2018). The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature*, 553(7689), 446.
- Hoyt, R., Zhu, W., Cerignoli, F., Alonso, A., Mustelin, T., & David, M. (2007). Cutting edge: selective tyrosine dephosphorylation of interferon-activated nuclear STAT5 by the VHR phosphatase. *The Journal of Immunology*, 179(6), 3402-3406.
- Huang, M., Rech, J. E., Northington, S. J., Flicker, P. F., Mayeda, A., Krainer, A. R., & LeStourgeon, W. M. (1994). The C-protein tetramer binds 230 to 240 nucleotides of pre-mRNA and nucleates the assembly of 40S heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles. *Molecular and cellular biology*, 14(1), 518-533.
- Hunter, T. (1995). Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*, 80(2), 225-236.
- Hynes, N. E., & MacDonald, G. (2009). ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Current opinion in cell biology*, 21(2), 177-184.
- Hynes, N. E., & Stern, D. F. (1994). The biology of erbB-2/nue/HER-2 and its role in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1198(2-3), 165-184.
- Imamura, K., Imamachi, N., Akizuki, G., Kumakura, M., Kawaguchi, A., Nagata, K., ... & Kai, C. (2014). Long noncoding RNA NEAT1-dependent SFPQ relocation from promoter region to paraspeckle mediates IL8 expression upon immune stimuli. *Molecular cell*, 53(3), 393-406.
- Ishibashi, T., Bottaro, D. P., Chan, A., Miki, T., & Aaronson, S. A. (1992). Expression cloning of a human dual-specificity phosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(24), 12170-12174.
- Jackson, M. D., & Denu, J. M. (2001). Molecular reactions of protein phosphatases insights from structure and chemistry. *Chemical Reviews*, 101(8), 2313-2340.
- Jeffrey, K. L., Camps, M., Rommel, C., & Mackay, C. R. (2007). Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signalling and immune responses. *Nature reviews Drug discovery*, 6(5), 391.
- Jeong, D. G., Cho, Y. H., Yoon, T. S., Kim, J. H., Son, J. H., Ryu, S. E., & Kim, S. J. (2006). Structure of human DSP18, a member of the dual-specificity protein tyrosine phosphatase family. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 62(6), 582-588.
- Jeong, D. G., Wei, C. H., Ku, B., Jeon, T. J., Chien, P. N., Kim, J. K., ... & Kim, D. S. (2014). The family-wide structure and function of human dual-specificity protein phosphatases. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 70(2), 421-435.
- Julien, S. G., Dubé, N., Hardy, S., & Tremblay, M. L. (2011). Inside the human cancer tyrosine phosphatome. *Nature Reviews Cancer*, 11(1), 35.

- Kamma, H., Portman, D. S., & Dreyfuss, G. (1995). Cell type-specific expression of hnRNP proteins. *Experimental cell research*, 221(1), 187-196.
- Kang, T. H., & Kim, K. T. (2006). Negative regulation of ERK activity by VRK3-mediated activation of VHR phosphatase. *Nature cell biology*, 8(8), 863.
- Keyse, S. M. (2008). Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) and cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 27(2), 253-261.
- Kim, J. H., Paek, K. Y., Choi, K., Kim, T. D., Hahm, B., Kim, K. T., & Jang, S. K. (2003). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C modulates translation of c-myc mRNA in a cell cycle phase-dependent manner. *Molecular and cellular biology*, 23(2), 708-720.
- Kim, M. J., Choi, S. Y., Park, I. C., Hwang, S. G., Kim, C., Choi, Y. H., ... & Lee, S. J. (2008). Opposing roles of c-Jun NH2-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase in the cellular response to ionizing radiation in human cervical cancer cells. *Molecular Cancer Research*, 6(11), 1718-1731.
- Kondoh, K., & Nishida, E. (2007). Regulation of MAP kinases by MAP kinase phosphatases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1773(8), 1227-1237.
- König, J., Zarnack, K., Rot, G., Curk, T., Kayikci, M., Zupan, B., ... & Ule, J. (2010). iCLIP reveals the function of hnRNP particles in splicing at individual nucleotide resolution. *Nature structural & molecular biology*, 17(7), 909.
- Kumar, P., & Maddika, S. (2017). Cellular Dynamics Controlled by Phosphatases. *Journal of the Indian Institute of Science*, 97(1), 129-145.
- Landrum, M. J., Lee, J. M., Riley, G. R., Jang, W., Rubinstein, W. S., Church, D. M., & Maglott, D. R. (2013). ClinVar: public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. *Nucleic acids research*, 42(D1), D980-D985.
- Lang, R., Hammer, M., & Mages, J. (2006). DUSP meet immunology: dual specificity MAPK phosphatases in control of the inflammatory response. *The Journal of Immunology*, 177(11), 7497-7504.
- Liu, N., Dai, Q., Zheng, G., He, C., Parisien, M., & Pan, T. (2015). N 6-methyladenosine-dependent RNA structural switches regulate RNA–protein interactions. *Nature*, 518(7540), 560.
- Luechapanichkul, R., Chen, X., Taha, H. A., Vyas, S., Guan, X., Freitas, M. A., ... & Pei, D. (2013). Specificity profiling of dual specificity phosphatase vaccinia VH1-related (VHR) reveals two distinct substrate binding modes. *Journal of Biological Chemistry*, 288(9), 6498-6510.

- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., & Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 298(5600), 1912-1934.
- McAfee, J. G., Shahied-Milam, L., Soltaninassab, S. R., & LeSturgeon, W. M. (1996-b). A major determinant of hnRNP C protein binding to RNA is a novel bZIP-like RNA binding domain. *Rna*, 2(11), 1139-1152.
- McAfee, J. G., Soltaninassab, S. R., Lindsay, M. E., & LeSturgeon, W. M. (1996). Proteins C1 and C2 of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complexes bind RNA in a highly cooperative fashion: support for their contiguous deposition on pre-mRNA during transcription. *Biochemistry*, 35(4), 1212-1222.
- Merrill, B. M., Barnett, S. F., LeSturgeon, W. M., & Williams, K. R. (1989). Primary structure differences between proteins C1 and C2 of HeLa 40S nuclear ribonucleoprotein particles. *Nucleic acids research*, 17(21), 8441-8449.
- Nadler, S. G., Merrill, B. M., Roberts, W. J., Keating, K. M., Lisbin, M. J., Barnett, S. F., ... & Williams, K. R. (1991). Interactions of the A1 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein and its proteolytic derivative, UP1, with RNA and DNA: evidence for multiple RNA binding domains and salt-dependent binding mode transitions. *Biochemistry*, 30(11), 2968-2976.
- Nagai, K., Oubridge, C., Jessen, T. H., Li, J., & Evans, P. R. (1990). Crystal structure of the RNA-binding domain of the U1 small nuclear ribonucleoprotein A. *Nature*, 348(6301), 515.
- Nakuci, E., Mahner, S., DiRenzo, J., & ElShamy, W. M. (2006). BRCA1-IRIS regulates cyclin D1 expression in breast cancer cells. *Experimental cell research*, 312(16), 3120-3131.
- Nicholson, R. I., Gee, J. M. W., & Harper, M. 2. (2001). EGFR and cancer prognosis. *European journal of cancer*, 37, 9-15.
- Nunes-Xavier, C., Roma-Mateo, C., Rios, P., Tarrega, C., Cejudo-Marin, R., Tabernero, L., & Pulido, R. (2011). Dual-specificity MAP kinase phosphatases as targets of cancer treatment. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 11(1), 109-132.
- Panico, K., & Forti, F. L. (2013). Proteomic, cellular, and network analyses reveal new DUSP3 interactions with nucleolar proteins in HeLa cells. *Journal of proteome research*, 12(12), 5851-5866.
- Patterson, K. I., Brummer, T., O'brien, P. M., & Daly, R. J. (2009). Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets. *Biochemical Journal*, 418(3), 475-489.
- Pulido, R., & van Huijsduijnen, R. H. (2008). Protein tyrosine phosphatases: dual-specificity phosphatases in health and disease. *The FEBS journal*, 275(5), 848-866.

- Rahmouni, S., Cerignoli, F., Alonso, A., Tsutji, T., Henkens, R., Zhu, C., ... & Mustelin, T. (2006). Loss of the VHR dual-specific phosphatase causes cell-cycle arrest and senescence. *Nature cell biology*, 8(5), 524.
- Rios, P., Nunes-Xavier, C. E., Tabernero, L., Koehn, M., & Pulido, R. (2014). Dual-specificity phosphatases as molecular targets for inhibition in human disease. *Antioxidants & redox signaling*, 20(14), 2251-2273.
- Rual, J. F., Venkatesan, K., Hao, T., Hirozane-Kishikawa, T., Dricot, A., Li, N., ... & Klitgord, N. (2005). Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature*, 437(7062), 1173.
- Sacco, F., Perfetto, L., Castagnoli, L., & Cesareni, G. (2012). The human phosphatase interactome: An intricate family portrait. *FEBS letters*, 586(17), 2732-2739.
- Salojin, K., & Oravecz, T. (2007). Regulation of innate immunity by MAPK dual-specificity phosphatases: knockout models reveal new tricks of old genes. *Journal of leukocyte biology*, 81(4), 860-869.
- Schumacher, M. A., Todd, J. L., Rice, A. E., Tanner, K. G., & Denu, J. M. (2002). Structural basis for the recognition of a bisphosphorylated MAP kinase peptide by human VHR protein Phosphatase. *Biochemistry*, 41(9), 3009-3017.
- Schwertassek, U., Buckley, D. A., Xu, C. F., Lindsay, A. J., McCaffrey, M. W., Neubert, T. A., & Tonks, N. K. (2010). Myristoylation of the dual-specificity phosphatase c-JUN N-terminal kinase (JNK) stimulatory phosphatase 1 is necessary for its activation of JNK signaling and apoptosis. *The FEBS journal*, 277(11), 2463-2473.
- Sébillon, P., Beldjord, C., Kaplan, J. C., Brody, E., & Marie, J. (1995). AT to G mutation in the polypyrimidine tract of the second intron of the human β -globin gene reduces in vitro splicing efficiency: evidence for an increased hnRNP C interaction. *Nucleic acids research*, 23(17), 3419-3425.
- Shahied, L., Braswell, E. H., LeSturgeon, W. M., & Krezel, A. M. (2001). An antiparallel four-helix bundle orients the high-affinity RNA binding sites in hnRNP C: a mechanism for RNA chaperonin activity. *Journal of molecular biology*, 305(4), 817-828.
- Shetty, S. (2005). Regulation of urokinase receptor mRNA stability by hnRNP C in lung epithelial cells. *Molecular and cellular biochemistry*, 272(1-2), 107-118.
- Sicinski, P., Donaher, J. L., Parker, S. B., Li, T., Fazeli, A., Gardner, H., ... & Weinberg, R. A. (1995). Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast. *Cell*, 82(4), 621-630.
- Stone, R. L., & Dixon, J. E. (1994). Protein-tyrosine phosphatases. *Journal of Biological Chemistry*, 269(50), 31323-31326.

- Swanson, M. S., Nakagawa, T. Y., LeVan, K., & Dreyfuss, G. I. D. E. O. N. (1987). Primary structure of human nuclear ribonucleoprotein particle C proteins: conservation of sequence and domain structures in heterogeneous nuclear RNA, mRNA, and pre-rRNA-binding proteins. *Molecular and cellular biology*, 7(5), 1731-1739.
- Tambe, M. B., Narvi, E., & Kallio, M. (2016). Reduced levels of Dusp3/Vhr phosphatase impair normal spindle bipolarity in an Erk1/2 activity-dependent manner. *FEBS letters*, 590(16), 2757-2767.
- Tan, J. H., Kajiwar, Y., Shahied, L., Li, J., McAfee, J. G., & LeSturgeon, W. M. (2001). The bZIP-like motif of hnRNP C directs the nuclear accumulation of pre-mRNA and lethality in yeast. *Journal of molecular biology*, 305(4), 829-838.
- Todd, J. L., Rigas, J. D., Rafty, L. A., & Denu, J. M. (2002). Dual-specificity protein tyrosine phosphatase VHR down-regulates c-Jun N-terminal kinase (JNK). *Oncogene*, 21(16), 2573.
- Todd, J. L., Tanner, K. G., & Denu, J. M. (1999). Extracellular Regulated Kinases (ERK) 1 and ERK2 Are Authentic Substrates for the Dual-specificity Protein-tyrosine Phosphatase VHR A NOVEL ROLE IN DOWN-REGULATING THE ERK PATHWAY. *Journal of Biological Chemistry*, 274(19), 13271-13280.
- Tonks, N. K. (2006). Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nature reviews Molecular cell biology*, 7(11), 833.
- Tripathi V, Ellis JD, Shen Z, Song DY, Pan Q, Watt AT, Freier SM, Bennett CF, Sharma A, Bubulya PA, Blencowe BJ, Prasanth SG, Prasanth KV (2010) The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. *Mol Cell* 39(6): 925–938.
- Vandereyken, M., Jacques, S., Van Overmeire, E., Amand, M., Rocks, N., Delierneux, C., ... & Zurashvili, T. (2017). Dusp3 deletion in mice promotes experimental lung tumour metastasis in a macrophage dependent manner. *PloS one*, 12(10), e0185786.
- Wagner, K. W., Alam, H., Dhar, S. S., Giri, U., Li, N., Wei, Y., ... & Multani, A. S. (2013). KDM2A promotes lung tumorigenesis by epigenetically enhancing ERK1/2 signaling. *The Journal of clinical investigation*, 123(12), 5231-5246.
- Wang, J. Y., Yeh, C. L., Chou, H. C., Yang, C. H., Fu, Y. N., Chen, Y. T., ... & Chen, Y. R. (2011). Vaccinia H1-related phosphatase is a phosphatase of ErbB receptors and is down-regulated in non-small cell lung cancer. *Journal of Biological Chemistry*, 286(12), 10177-10184.
- Weighardt, F., Biamonti, G., & Riva, S. (1996). The roles of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNP) in RNA metabolism. *Bioessays*, 18(9), 747-756.

- Williamson, D. J., Banik-Maiti, S., DeGregori, J., & Ruley, H. E. (2000). hnRNP C is required for postimplantation mouse development but is dispensable for cell viability. *Molecular and cellular biology*, 20(11), 4094-4105.
- Wittekind, M., Gorlach, M., Friedrichs, M., Dreyfuss, G., & Mueller, L. (1992). Proton, carbon-13, and nitrogen-15 NMR assignments and global folding pattern of the RNA-binding domain of the human hnRNP C proteins. *Biochemistry*, 31(27), 6254-6265.
- Yip, Y. L., Famiglietti, M., Gos, A., Duek, P. D., David, F. P., Gateau, A., & Bairoch, A. (2008). Annotating single amino acid polymorphisms in the UniProt/Swiss-Prot knowledgebase. *Human mutation*, 29(3), 361-366.
- Yuvaniyama, J., Denu, J. M., Dixon, J. E., & Saper, M. A. (1996). Crystal structure of the dual specificity protein phosphatase VHR. *Science*, 272(5266), 1328-1331.
- Zhou, B., Wang, Z. X., Zhao, Y. U., Brautigan, D. L., & Zhang, Z. Y. (2002). The specificity of extracellular signal-regulated kinase 2 dephosphorylation by protein phosphatases. *Journal of Biological Chemistry*, 277(35), 31818-31825.
- Zhou, G., Denu, J. M., Wu, L., & Dixon, J. E. (1994). The catalytic role of Cys124 in the dual specificity phosphatase VHR. *Journal of Biological Chemistry*, 269(45), 28084-28090.
- Jurica, M. S., Licklider, L. J., GYGI, S. P., Grigorieff, N., & Moore, M. J. (2002). Purification and characterization of native spliceosomes suitable for three-dimensional structural analysis. *Rna*, 8(4), 426-439.
- Mahajan, M. C., Narlikar, G. J., Boyapaty, G., Kingston, R. E., & Weissman, S. M. (2005). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1/C2, MeCP1, and SWI/SNF form a chromatin remodeling complex at the β -globin locus control region. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(42), 15012-15017.
- Fu, D., & Collins, K. (2007). Purification of human telomerase complexes identifies factors involved in telomerase biogenesis and telomere length regulation. *Molecular cell*, 28(5), 773-785.
- Ford, L. P., Suh, J. M., Wright, W. E., & Shay, J. W. (2000). Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1 and C2 associate with the RNA component of human telomerase. *Molecular and cellular biology*, 20(23), 9084-9091.
- Weinlich, S., Hüttelmaier, S., Schierhorn, A., Behrens, S. E., Ostareck-Lederer, A., & Ostareck, D. H. (2009). IGF2BP1 enhances HCV IRES-mediated translation initiation via the 3' UTR. *Rna*, 15(8), 1528-1542.
- Köhler, A., & Hurt, E. (2007). Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(10), 761.

- Maniatis, T., & Reed, R. (2002). An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature*, 416(6880), 499.
- Ohno, M., Segref, A., Bachi, A., Wilm, M., & Mattaj, I. W. (2000). PHAX, a mediator of U snRNA nuclear export whose activity is regulated by phosphorylation. *Cell*, 101(2), 187-198.
- McCloskey, A., Taniguchi, I., Shinmyozu, K., & Ohno, M. (2012). hnRNP C tetramer measures RNA length to classify RNA polymerase II transcripts for export. *Science*, 335(6076), 1643-1646.
- Masuyama, K., Taniguchi, I., Kataoka, N., & Ohno, M. (2004). RNA length defines RNA export pathway. *Genes & development*, 18(17), 2074-2085.
- Nakielnny, S., & Dreyfuss, G. (1996). The hnRNP C proteins contain a nuclear retention sequence that can override nuclear export signals. *The Journal of Cell Biology*, 134(6), 1365-1373.
- LaBranche, H., Dupuis, S., Ben-David, Y., Bani, M. R., Wellinger, R. J., & Chabot, B. (1998). Telomere elongation by hnRNP A1 and a derivative that interacts with telomeric repeats and telomerase. *Nature genetics*, 19(2), 199.
- Jády, B. E., Richard, P., Bertrand, E., & Kiss, T. (2006). Cell cycle-dependent recruitment of telomerase RNA and Cajal bodies to human telomeres. *Molecular biology of the cell*, 17(2), 944-954.
- Tomlinson, R. L., Ziegler, T. D., Supakorndej, T., Terns, R. M., & Terns, M. P. (2006). Cell cycle-regulated trafficking of human telomerase to telomeres. *Molecular biology of the cell*, 17(2), 955-965.
- Dreyfuss, G., Kim, V. N., & Kataoka, N. (2002). Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nature reviews Molecular cell biology*, 3(3), 195.
- Shetty, S. (2005-c). Protein synthesis and urokinase mRNA metabolism. *Molecular and cellular biochemistry*, 271(1-2), 13-22.
- Mazar, A. P., Henkin, J., & Goldfarb, R. H. (1999). The urokinase plasminogen activator system in cancer: implications for tumor angiogenesis and metastasis. *Angiogenesis*, 3(1), 15.
- Hollas, W., Hoosein, N., Chung, L., Mazar, A., Henkin, J., Kariko, K., ... & Boyd, D. (1992). Expression of urokinase and its receptor in invasive and non-invasive prostate cancer cell lines. *Thrombosis and haemostasis*, 68(06), 662-666.
- Liu, N., Dai, Q., Zheng, G., He, C., Parisien, M., & Pan, T. (2015). N 6-methyladenosine-dependent RNA structural switches regulate RNA–protein interactions. *Nature*, 518(7540), 560.

- Dominissini, D., Moshitch-Moshkovitz, S., Schwartz, S., Salmon-Divon, M., Ungar, L., Osenberg, S., ... & Sorek, R. (2012). Topology of the human and mouse m⁶A RNA methylomes revealed by m⁶A-seq. *Nature*, 485(7397), 201.
- Zhao, X., Yang, Y., Sun, B. F., Shi, Y., Yang, X., Xiao, W., ... & Jin, K. X. (2014). FTO-dependent demethylation of N⁶-methyladenosine regulates mRNA splicing and is required for adipogenesis. *Cell research*, 24(12), 1403.
- Wang, X., Lu, Z., Gomez, A., Hon, G. C., Yue, Y., Han, D., ... & Ren, B. (2014). N⁶-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature*, 505(7481), 117.
- Stone, J. R., & Collins, T. (2002). Rapid phosphorylation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1/C2 in response to physiologic levels of hydrogen peroxide in human endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 277(18), 15621-15628.
- Mayrand, S. H., Dwen, P., & Pederson, T. (1993). Serine/threonine phosphorylation regulates binding of C hnRNP proteins to pre-mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(16), 7764-7768.
- Fung, P. A., Labrecque, R., & Pederson, T. (1997). RNA-dependent phosphorylation of a nuclear RNA binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(4), 1064-1068.
- Mayrand, S. H., Fung, P. A., & Pederson, T. (1996). A discrete 3' region of U6 small nuclear RNA modulates the phosphorylation cycle of the C1 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particle protein. *Molecular and cellular biology*, 16(3), 1241-1246.
- Piñol-Roma, S. E. R. A. F. I. N., & Dreyfuss, G. I. D. E. O. N. (1993). Cell cycle-regulated phosphorylation of the pre-mRNA-binding (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein) C proteins. *Molecular and cellular biology*, 13(9), 5762-5770.
- Holcomb, E. R., & Friedman, D. L. (1984). Phosphorylation of the C-proteins of HeLa cell hnRNP particles. Involvement of a casein kinase II-type enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 259(1), 31-40.
- Stone, J. R., Maki, J. L., & Collins, T. (2003). Basal and hydrogen peroxide stimulated sites of phosphorylation in heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1/C2. *Biochemistry*, 42(5), 1301-1308.
- Kim, J. H., Paek, K. Y., Choi, K., Kim, T. D., Hahm, B., Kim, K. T., & Jang, S. K. (2003). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C modulates translation of c-myc mRNA in a cell cycle phase-dependent manner. *Molecular and cellular biology*, 23(2), 708-720.
- Pelengaris, S., Khan, M., & Evan, G. (2002). c-MYC: more than just a matter of life and death. *Nature Reviews Cancer*, 2(10), 764.

- Schepens, B., Tinton, S. A., Bruynooghe, Y., Parthoens, E., Haegman, M., Beyaert, R., & Cornelis, S. (2007). A role for hnRNP C1/C2 and Unr in internal initiation of translation during mitosis. *The EMBO journal*, 26(1), 158-169.
- Clark, M. B., & Mattick, J. S. (2011, June). Long noncoding RNAs in cell biology. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 22, No. 4, pp. 366-376). Academic Press.
- Gutschner, T., Hämmerle, M., Eißmann, M., Hsu, J., Kim, Y., Hung, G., ... & Zörnig, M. (2013). The noncoding RNA MALAT1 is a critical regulator of the metastasis phenotype of lung cancer cells. *Cancer research*, 73(3), 1180-1189.
- Wang, K. C., & Chang, H. Y. (2011). Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Molecular cell*, 43(6), 904-914.
- Yang, F., Yi, F., Han, X., Du, Q., & Liang, Z. (2013). MALAT-1 interacts with hnRNP C in cell cycle regulation. *FEBS letters*, 587(19), 3175-3181.
- Petretti, C., Savoian, M., Montembault, E., Glover, D. M., Prigent, C., & Giet, R. (2006). The PITSLRE/CDK11p58 protein kinase promotes centrosome maturation and bipolar spindle formation. *EMBO reports*, 7(4), 418-424.
- Schepens, B., Tinton, S. A., Bruynooghe, Y., Parthoens, E., Haegman, M., Beyaert, R., & Cornelis, S. (2007). A role for hnRNP C1/C2 and Unr in internal initiation of translation during mitosis. *The EMBO journal*, 26(1), 158-169.
- Zarnack, K., König, J., Tajnik, M., Martincorena, I., Eustermann, S., Stévant, I., ... & Ule, J. (2013). Direct competition between hnRNP C and U2AF65 protects the transcriptome from the exonization of Alu elements. *Cell*, 152(3), 453-466.
- Huelga, S. C., Vu, A. Q., Arnold, J. D., Liang, T. Y., Liu, P. P., Yan, B. Y., ... & Ares Jr, M. (2012). Integrative genome-wide analysis reveals cooperative regulation of alternative splicing by hnRNP proteins. *Cell reports*, 1(2), 167-178.
- Fu, X. D., & Ares Jr, M. (2014). Context-dependent control of alternative splicing by RNA-binding proteins. *Nature Reviews Genetics*, 15(10), 689.
- Christian, K. J., Lang, M. A., & Raffalli-Mathieu, F. (2008). Interaction of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1/C2 with a novel cis-regulatory element within p53 mRNA as a response to cytostatic drug treatment. *Molecular pharmacology*, 73(5), 1558-1567.
- Lee, S. Y., Ji-Hye, P. A. R. K., Sungsu, K. I. M., Eun-Jung, P. A. R. K., Yungdae, Y. U. N., & Jongbum, K. W. O. N. (2005). A proteomics approach for the identification of nucleophosmin and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1/C2 as chromatin-binding proteins in response to DNA double-strand breaks. *Biochemical Journal*, 388(1), 7-15.

- Alonso, A., Rahmouni, S., Williams, S., van Stipdonk, M., Jaroszewski, L., Godzik, A., ... & Mustelin, T. (2003). Tyrosine phosphorylation of VHR phosphatase by ZAP-70. *Nature immunology*, 4(1), 44.
- Amati, B. (2001). Integrating Myc and TGF- β signalling in cell-cycle control. *Nature cell biology*, 3(5), E112.
- Amati, B., Alevizopoulos, K., & Vlach, J. (1998). Myc and the cell cycle. *Front Biosci*, 3(3), d250-68.
- Amati, B., Littlewood, T. D., Evan, G. I., & Land, H. (1993). The c-Myc protein induces cell cycle progression and apoptosis through dimerization with Max. *The EMBO journal*, 12(13), 5083-5087.
- Askew, D. S., Ashmun, R. A., Simmons, B. C., & Cleveland, J. L. (1991). Constitutive c-myc expression in an IL-3-dependent myeloid cell line suppresses cell cycle arrest and accelerates apoptosis. *Oncogene*, 6(10), 1915-1922.
- Benvenisty, N., Leder, A., Kuo, A., & Leder, P. (1992). An embryonically expressed gene is a target for c-Myc regulation via the c-Myc-binding sequence. *Genes & development*, 6(12b), 2513-2523.
- Bernstein, J., Sella, O., Le, S. Y., & Elroy-Stein, O. (1997). PDGF2/c-sis mRNA leader contains a differentiation-linked internal ribosomal entry site (D-IRES). *Journal of Biological Chemistry*, 272(14), 9356-9362.
- Bielczyk-Maczyńska, E., Hung, L. L., Ferreira, L., Fleischmann, T., Weis, F., Fernandez-Pevada, A., ... & Stemple, D. L. (2015). The ribosome biogenesis protein Nol9 is essential for definitive hematopoiesis and pancreas morphogenesis in zebrafish. *PLoS genetics*, 11(12), e1005677.
- Blyn, L. B., Towner, J. S., Semler, B. L., & Ehrenfeld, E. (1997). Requirement of poly (rC) binding protein 2 for translation of poliovirus RNA. *Journal of virology*, 71(8), 6243-6246.
- Bodem, J., Dobрева, G., Hoffmann-Rohrer, U., Iben, S., Zentgraf, H., Delius, H., ... & Grummt, I. (2000). TIF-IA, the factor mediating growth-dependent control of ribosomal RNA synthesis, is the mammalian homolog of yeast Rrn3p. *EMBO reports*, 1(2), 171-175.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Bruno, T., Iezzi, S., De Nicola, F., Di Padova, M., Desantis, A., Scarsella, M., ... & Fanciulli, M. (2008). Che-1 activates XIAP expression in response to DNA damage. *Cell death and differentiation*, 15(3), 515.

- Bushell, M., Wood, W., Carpenter, G., Pain, V. M., Morley, S. J., & Clemens, M. J. (2001). Disruption of the interaction of mammalian protein synthesis eukaryotic initiation factor 4B with the poly (A)-binding protein by caspase-and viral protease-mediated cleavages. *Journal of Biological Chemistry*, 276(26), 23922-23928.
- Chehab, N. H., Malikzay, A., Stavridi, E. S., & Halazonetis, T. D. (1999). Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(24), 13777-13782.
- Cho, S., Kim, J. H., Back, S. H., & Jang, S. K. (2005). Polypyrimidine tract-binding protein enhances the internal ribosomal entry site-dependent translation of p27Kip1 mRNA and modulates transition from G1 to S phase. *Molecular and cellular biology*, 25(4), 1283-1297.
- Chung, J., Bauer, D. E., Ghamari, A., Nizzi, C. P., Deck, K. M., Kingsley, P. D., ... & Dalton, A. J. (2015). The mTORC1/4E-BP pathway coordinates hemoglobin production with L-leucine availability. *Sci. Signal.*, 8(372), ra34-ra34.
- Clemens, M. J., Bushell, M., Jeffrey, I. W., Pain, V. M., & Morley, S. J. (2000). Translation initiation factor modifications and the regulation of protein synthesis in apoptotic cells. *Cell death and differentiation*, 7(7), 603.
- Coldwell, M. J., Mitchell, S. A., Stoneley, M., MacFarlane, M., & Willis, A. E. (2000). Initiation of Apaf-1 translation by internal ribosome entry. *Oncogene*, 19(7), 899.
- Conlon, I., & Raff, M. (1999). Size control in animal development. *Cell*, 96(2), 235-244.
- Cornelis, S., Bruynooghe, Y., Denecker, G., Van Huffel, S., Tinton, S., & Beyaert, R. (2000). Identification and characterization of a novel cell cycle-regulated internal ribosome entry site. *Molecular cell*, 5(4), 597-605.
- Coudert, L., Adjibade, P., & Mazroui, R. (2014). Analysis of translation initiation during stress conditions by polysome profiling. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (87), e51164.
- Damiano, F., Rochira, A., Tocci, R., Alemanno, S., Gnani, A., & Siculella, L. (2013). hnRNP A1 mediates the activation of the IRES-dependent SREBP-1a mRNA translation in response to endoplasmic reticulum stress. *Biochemical Journal*, 449(2), 543-553.
- Deng, J., Harding, H. P., Raught, B., Gingras, A. C., Berlanga, J. J., Scheuner, D., ... & Sonenberg, N. (2002). Activation of GCN2 in UV-irradiated cells inhibits translation. *Current Biology*, 12(15), 1279-1286.
- Derenzini, M., Montanaro, L., & Trere, D. (2017). Ribosome biogenesis and cancer. *Acta histochemica*, 119(3), 190-197.
- Derenzini, M., Montanaro, L., Chillà, A., Tosti, E., Vici, M., Barbieri, S., ... & Treré, D. (2005). Key role of the achievement of an appropriate ribosomal RNA complement for G1-S phase transition in H4-II-E-C3 rat hepatoma cells. *Journal of cellular physiology*, 202(2), 483-491.

- Dever, T. E. (1999). Translation initiation: adept at adapting. *Trends in biochemical sciences*, 24(10), 398-403.
- Dumaz, N., & Meek, D. W. (1999). Serine 15 phosphorylation stimulates p53 transactivation but does not directly influence interaction with HDM2. *The EMBO journal*, 18(24), 7002-7010.
- Eckelman, B. P., Salvesen, G. S., & Scott, F. L. (2006). Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO reports*, 7(10), 988-994.
- Eilers, M. (1999). Control of cell proliferation by Myc family genes. *Molecules and cells*, 9(1), 1-6.
- Erales, J., Marchand, V., Panthu, B., Gillot, S., Belin, S., Ghayad, S. E., ... & Bertin, P. (2017). Evidence for rRNA 2'-O-methylation plasticity: Control of intrinsic translational capabilities of human ribosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(49), 12934-12939.
- Esposito, A. M., Mateyak, M., He, D., Lewis, M., Sasikumar, A. N., Hutton, J., ... & Kinzy, T. G. (2010). Eukaryotic polyribosome profile analysis. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (40), e1948.
- Evan, G. I., Wyllie, A. H., Gilbert, C. S., Littlewood, T. D., Land, H., Brooks, M., ... & Hancock, D. C. (1992). Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell*, 69(1), 119-128.
- Evan, G., & Littlewood, T. (1998). A matter of life and cell death. *Science*, 281(5381), 1317-1322.
- Fatica, A., & Tollervey, D. (2002). Making ribosomes. *Current opinion in cell biology*, 14(3), 313-318.
- Fromont-Racine, M., Senger, B., Saveanu, C., & Fasiolo, F. (2003). Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene*, 313, 17-42.
- Gao, M. Z., Wang, H. B., Chen, X. L., Cao, W. T., Fu, L., Li, Y., ... & Lou, L. G. (2019). Aberrant modulation of ribosomal protein S6 phosphorylation confers acquired resistance to MAPK pathway inhibitors in BRAF-mutant melanoma. *Acta pharmacologica Sinica*, 40(2), 268-278.
- Grummt, I. (2003). Life on a planet of its own: regulation of RNA polymerase I transcription in the nucleolus. *Genes & development*, 17(14), 1691-1702.
- Gu, L., Zhu, N., Zhang, H., Durden, D. L., Feng, Y., & Zhou, M. (2009). Regulation of XIAP translation and induction by MDM2 following irradiation. *Cancer cell*, 15(5), 363-375.
- Han, S. P., Tang, Y. H., & Smith, R. (2010). Functional diversity of the hnRNPs: past, present and perspectives. *Biochemical Journal*, 430(3), 379-392.
- Hardy, S. J. (1975). The stoichiometry of the ribosomal proteins of *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics MGG*, 140(3), 253-274.

- Hellen, C. U., & Sarnow, P. (2001). Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes & development*, 15(13), 1593-1612.
- Hellen, C. U., Witherell, G. W., Schmid, M., Shin, S. H., Pestova, T. V., Gil, A., & Wimmer, E. (1993). A cytoplasmic 57-kDa protein that is required for translation of picornavirus RNA by internal ribosomal entry is identical to the nuclear pyrimidine tract-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(16), 7642-7646.
- Henras, A. K., Plisson-Chastang, C., O'Donohue, M. F., Chakraborty, A., & Gleizes, P. E. (2015). An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 6(2), 225-242.
- Holčík, M., Gordon, B. W., & Korneluk, R. G. (2003). The internal ribosome entry site-mediated translation of antiapoptotic protein XIAP is modulated by the heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1 and C2. *Molecular and cellular biology*, 23(1), 280-288.
- Holcik, M., Lefebvre, C., Yeh, C., Chow, T., & Korneluk, R. G. (1999). A new internal-ribosome-entry-site motif potentiates XIAP-mediated cytoprotection. *Nature cell biology*, 1(3), 190.
- Horos, R., IJspeert, H., Pospisilova, D., Sendtner, R., Andrieu-Soler, C., Taskesen, E., ... & von Lindern, M. (2012). Ribosomal deficiencies in Diamond-Blackfan anemia impair translation of transcripts essential for differentiation of murine and human erythroblasts. *Blood*, 119(1), 262-272.
- Hoyt, R., Zhu, W., Cerignoli, F., Alonso, A., Mustelin, T., & David, M. (2007). Cutting edge: selective tyrosine dephosphorylation of interferon-activated nuclear STAT5 by the VHR phosphatase. *The Journal of Immunology*, 179(6), 3402-3406.
- Huez, I., Créancier, L., Audigier, S., Gensac, M. C., Prats, A. C., & Prats, H. (1998). Two independent internal ribosome entry sites are involved in translation initiation of vascular endothelial growth factor mRNA. *Molecular and cellular biology*, 18(11), 6178-6190.
- Hunt, S. L., Hsuan, J. J., Totty, N., & Jackson, R. J. (1999). unr, a cellular cytoplasmic RNA-binding protein with five cold-shock domains, is required for internal initiation of translation of human rhinovirus RNA. *Genes & development*, 13(4), 437-448.
- Huschtscha, L. I., & Holliday, R. (1983). Limited and unlimited growth of SV40-transformed cells from human diploid MRC-5 fibroblasts. *Journal of cell science*, 63(1), 77-99.
- Hwang, B., Lim, J. H., Hahm, B., Jang, S. K., & Lee, S. W. (2009). hnRNP L is required for the translation mediated by HCV IRES. *Biochemical and biophysical research communications*, 378(3), 584-588.
- IRESITE. Disponível em <http://www.iresite.org/>

- Jackson, R. J., Hellen, C. U., & Pestova, T. V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature reviews Molecular cell biology*, 11(2), 113.
- Jackson, S. P., & Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 461(7267), 1071.
- Jang, S. K., & Wimmer, E. (2002). The role of RNA-binding proteins in IRES-dependent translation. In *RNA Binding Proteins* (pp. 1-33). Springer, Boston, MA.
- Jang, S. K., Kräusslich, H. G., Nicklin, M. J., Duke, G. M., Palmenberg, A. C., & Wimmer, E. (1988). A segment of the 5'nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *Journal of virology*, 62(8), 2636-2643.
- Jansa, P., & Grummt, I. (1999). Mechanism of transcription termination: PTRF interacts with the largest subunit of RNA polymerase I and dissociates paused transcription complexes from yeast and mouse. *Molecular and General Genetics MGG*, 262(3), 508-514.
- Jeon, Y. J., Kim, I. K., Hong, S. H., Nan, H., Kim, H. J., Lee, H. J., ... & Jung, Y. K. (2008). Ribosomal protein S6 is a selective mediator of TRAIL-apoptotic signaling. *Oncogene*, 27(31), 4344.
- Ji, Q., Zhang, L., Liu, X., Zhou, L., Wang, W., Han, Z., ... & Ren, J. (2014). Long non-coding RNA MALAT1 promotes tumour growth and metastasis in colorectal cancer through binding to SFPQ and releasing oncogene PTBP2 from SFPQ/PTBP2 complex. *British journal of cancer*, 111(4), 736.
- Kang, T. H., & Kim, K. T. (2006). Negative regulation of ERK activity by VRK3-mediated activation of VHR phosphatase. *Nature cell biology*, 8(8), 863.
- Kim, D. Y., Woo, K. C., Lee, K. H., Kim, T. D., & Kim, K. T. (2010). hnRNP Q and PTB modulate the circadian oscillation of mouse Rev-erb α via IRES-mediated translation. *Nucleic acids research*, 38(20), 7068-7078.
- Kim, J. H., Paek, K. Y., Choi, K., Kim, T. D., Hahm, B., Kim, K. T., & Jang, S. K. (2003). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C modulates translation of c-myc mRNA in a cell cycle phase-dependent manner. *Molecular and cellular biology*, 23(2), 708-720.
- Kim, Y. C., Kitaura, H., Iguchi-Ariga, S. M., & Ariga, H. (2010). DJ-1, an oncogene and causative gene for familial Parkinson's disease, is essential for SV40 transformation in mouse fibroblasts through up-regulation of c-Myc. *FEBS letters*, 584(18), 3891-3895.
- Kobylecki, K., Drązkowska, K., Kuliński, T. M., Dziembowski, A., & Tomecki, R. (2018). Elimination of 01/A'–A0 pre-rRNA processing by-product in human cells involves cooperative action of two nuclear exosome-associated nucleases: RRP6 and DIS3. *RNA*, 24(12), 1677-1692.

- Kopp, K., Gasiorowski, J. Z., Chen, D., Gilmore, R., Norton, J. T., Wang, C., ... & Huang, S. (2007). Pol I transcription and pre-rRNA processing are coordinated in a transcription-dependent manner in mammalian cells. *Molecular biology of the cell*, 18(2), 394-403.
- Kressler, D., Hurt, E., & Baßler, J. (2010). Driving ribosome assembly. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1803(6), 673-683.
- Kressler, D., Linder, P., & de la Cruz, J. (1999). Protein trans-acting factors involved in ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 19(12), 7897-7912.
- Kretzner, L., Blackwood, E. M., & Eisenman, R. N. (1992). Myc and Max proteins possess distinct transcriptional activities. *Nature*, 359(6394), 426.
- Kullmann, M., Göpfert, U., Siewe, B., & Hengst, L. (2002). ELAV/Hu proteins inhibit p27 translation via an IRES element in the p27 5' UTR. *Genes & development*, 16(23), 3087-3099.
- Khurts, S., Masutomi, K., Delgermaa, L., Arai, K., Oishi, N., Mizuno, H., ... & Murakami, S. (2004). Nucleolin interacts with telomerase. *Journal of Biological Chemistry*, 279(49), 51508-51515.
- Le, H., Tanguay, R. L., Balasta, M. L., Wei, C. C., Browning, K. S., Metz, A. M., ... & Gallie, D. R. (1997). Translation initiation factors eIF-iso4G and eIF-4B interact with the poly (A)-binding protein and increase its RNA binding activity. *Journal of Biological Chemistry*, 272(26), 16247-16255.
- Mäkelä, T. P., Koskinen, P. J., Väström, I., & Alitalo, K. (1992). Alternative forms of Max as enhancers or suppressors of Myc-ras cotransformation. *Science*, 256(5055), 373-377.
- Marcel, V., Ghayad, S. E., Belin, S., Therizols, G., Morel, A. P., Solano-González, E., ... & Bourdon, J. C. (2013). p53 acts as a safeguard of translational control by regulating fibrillarin and rRNA methylation in cancer. *Cancer cell*, 24(3), 318-330.
- Marcotrigiano, J., Gingras, A. C., Sonenberg, N., & Burley, S. K. (1999). Cap-dependent translation initiation in eukaryotes is regulated by a molecular mimic of eIF4G. *Molecular cell*, 3(6), 707-716.
- Meerovitch, K., Svitkin, Y. V., Lee, H. S., Lejbkiewicz, F., Kenan, D. J., Chan, E. K., ... & Sonenberg, N. (1993). La autoantigen enhances and corrects aberrant translation of poliovirus RNA in reticulocyte lysate. *Journal of virology*, 67(7), 3798-3807.
- Millard, S. S., Vidal, A., Markus, M., & Koff, A. (2000). A U-rich element in the 5' untranslated region is necessary for the translation of p27 mRNA. *Molecular and cellular biology*, 20(16), 5947-5959.

- Miyagawa, R., Tano, K., Mizuno, R., Nakamura, Y., Ijiri, K., Rakwal, R., ... & Akimitsu, N. (2012). Identification of cis-and trans-acting factors involved in the localization of MALAT-1 noncoding RNA to nuclear speckles. *Rna*, 18(4), 738-751
- Morfoisse, F., Tatin, F., Hantelys, F., Adoue, A., Helfer, A. C., Cassant-Sourdy, S., ... & Pyronnet, S. (2016). Nucleolin Promotes Heat Shock–Associated Translation of VEGF-D to Promote Tumor Lymphangiogenesis. *Cancer research*, 76(15), 4394-4405.
- Nanbru, C., Lafon, I., Audigier, S., Gensac, M. C., Vagner, S., Huez, G., & Prats, A. C. (1997). Alternative Translation of the Proto-oncogene c-myc by an Internal Ribosome Entry Site. *Journal of Biological Chemistry*, 272(51), 32061-32066.
- Nilsson, J. A., & Cleveland, J. L. (2003). Myc pathways provoking cell suicide and cancer. *Oncogene*, 22(56), 9007.
- Notarbartolo, M., Cervello, M., Poma, P., Dusonchet, L., Meli, M., & D'Alessandro, N. (2004). Expression of the IAPs in multidrug resistant tumor cells. *Oncology reports*, 11(1), 133-136.
- Odintsova, T. I., Müller, E. C., Ivanov, A. V., Egorov, T. A., Bienert, R., Vladimirov, S. N., ... & Karpova, G. G. (2003). Characterization and analysis of posttranslational modifications of the human large cytoplasmic ribosomal subunit proteins by mass spectrometry and Edman sequencing. *Journal of protein chemistry*, 22(3), 249-258.
- Omnus, D. J., Mehrtens, S., Ritter, B., Resch, K., Yamada, M., Frank, R., ... & Reboll, M. R. (2011). JKTBP1 is involved in stabilization and IRES-dependent translation of NRF mRNAs by binding to 5' and 3' untranslated regions. *Journal of molecular biology*, 407(4), 492-504.
- Pardee, A. B. (1989). G1 events and regulation of cell proliferation. *Science*, 246(4930), 603-608.
- Pavic, K., Rios, P., Dzek, K., Koehler, C., Lemke, E. A., & Köhn, M. (2014). Unnatural amino acid mutagenesis reveals dimerization as a negative regulatory mechanism of VHR's phosphatase activity. *ACS chemical biology*, 9(7), 1451-1459.
- Pelletier, J., & Sonenberg, N. (1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature*, 334(6180), 320.
- Petretti, C., Savoian, M., Montembault, E., Glover, D. M., Prigent, C., & Giet, R. (2006). The PITSLRE/CDK11p58 protein kinase promotes centrosome maturation and bipolar spindle formation. *EMBO reports*, 7(4), 418-424.
- Powley, I. R., Kondrashov, A., Young, L. A., Dobbyn, H. C., Hill, K., Cannell, I. G., ... & Wek, R. (2009). Translational reprogramming following UVB irradiation is mediated by DNA-PKcs and allows selective recruitment to the polysomes of mRNAs encoding DNA repair enzymes. *Genes & development*, 23(10), 1207-1220.

- Preiss, T., & Hentze, M. W. (1999). From factors to mechanisms: translation and translational control in eukaryotes. *Current opinion in genetics & development*, 9(5), 515-521.
- Pyronnet, S., Dostie, J., & Sonenberg, N. (2001). Suppression of cap-dependent translation in mitosis. *Genes & development*, 15(16), 2083-2093.
- Pyronnet, S., Pradayrol, L., & Sonenberg, N. (2000). A cell cycle-dependent internal ribosome entry site. *Molecular cell*, 5(4), 607-616.
- Raff, M. C. (1992). Social controls on cell survival and cell death. *Nature*, 356(6368), 397.
- Raught, B., & Gingras, A. C. (2007). 14 Signaling to Translation Initiation. Cold Spring Harbor Monograph Archive, 48, 369-400.
- Raveh, A., Margaliot, M., Sontag, E. D., & Tuller, T. (2016). A model for competition for ribosomes in the cell. *Journal of The Royal Society Interface*, 13(116), 20151062.
- Reinhardt, H. C., & Yaffe, M. B. (2009). Kinases that control the cell cycle in response to DNA damage: Chk1, Chk2, and MK2. *Current opinion in cell biology*, 21(2), 245-255.
- Saitoh, N., Spahr, C. S., Patterson, S. D., Bubulya, P., Neuwald, A. F., & Spector, D. L. (2004). Proteomic analysis of interchromatin granule clusters. *Molecular biology of the cell*, 15(8), 3876-3890.
- Saitoh, N., Sakamoto, C., Hagiwara, M., Agredano-Moreno, L. T., Jiménez-García, L. F., & Nakao, M. (2012). The distribution of phosphorylated SR proteins and alternative splicing are regulated by RANBP2. *Molecular biology of the cell*, 23(6), 1115-1128.
- Satokata, I., Tanaka, K., Miura, N., Narita, M., Mimaki, T., Satoh, Y., ... & Okada, Y. (1992). Three nonsense mutations responsible for group A xeroderma pigmentosum. *Mutation Research/DNA Repair*, 273(2), 193-202.
- Schepens, B., Tinton, S. A., Bruynooghe, Y., Parthoens, E., Haegman, M., Beyaert, R., & Cornelis, S. (2007). A role for hnRNP C1/C2 and Unr in internal initiation of translation during mitosis. *The EMBO journal*, 26(1), 158-169.
- Schoenberg, D. R., & Maquat, L. E. (2012). Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nature Reviews Genetics*, 13(4), 246.
- Sella, O., Gerlitz, G., Le, S. Y., & Elroy-Stein, O. (1999). Differentiation-induced internal translation of c-sis mRNA: analysis of the cis elements and their differentiation-linked binding to the hnRNP C protein. *Molecular and Cellular Biology*, 19(8), 5429-5440.
- Shen, Y., Liu, S., Fan, J., Jin, Y., Tian, B., Zheng, X., & Fu, H. (2017). Nuclear retention of the lncRNA SNHG1 by doxorubicin attenuates hnRNPC-p53 protein interactions. *EMBO reports*, 18(4), 536-548.
- Sherr, C. J., & Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & development*, 13(12), 1501-1512.

- Sherrill, K. W., Byrd, M. P., Van Eden, M. E., & Lloyd, R. E. (2004). BCL-2 translation is mediated via internal ribosome entry during cell stress. *Journal of Biological Chemistry*, 279(28), 29066-29074.
- Shuck, S. C., Short, E. A., & Turchi, J. J. (2008). Eukaryotic nucleotide excision repair: from understanding mechanisms to influencing biology. *Cell research*, 18(1), 64.
- Slavov, N., Semrau, S., Airoidi, E., Budnik, B., & van Oudenaarden, A. (2015). Differential stoichiometry among core ribosomal proteins. *Cell reports*, 13(5), 865-873.
- Sonenberg, N., & Hinnebusch, A. G. (2009). Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell*, 136(4), 731-745.
- Stepanchick, A., Zhi, H., Cavanaugh, A. H., Rothblum, K., Schneider, D. A., & Rothblum, L. I. (2013). DNA binding by the ribosomal DNA transcription factor *rrn3* is essential for ribosomal DNA transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 288(13), 9135-9144.
- Stoneley, M., Paulin, F. E., Le Quesne, J. P., Chappell, S. A., & Willis, A. E. (1998). C-Myc 5' untranslated region contains an internal ribosome entry segment. *Oncogene*, 16(3), 423.
- Stoneley, M., Subkhankulova, T., Le Quesne, J. P., Coldwell, M. J., Jopling, C. L., Belsham, G. J., & Willis, A. E. (2000). Analysis of the c-myc IRES; a potential role for cell-type specific trans-acting factors and the nuclear compartment. *Nucleic acids research*, 28(3), 687-694.
- Tafforeau, L., Zorbas, C., Langhendries, J. L., Mullineux, S. T., Stamatopoulou, V., Mullier, R., ... & Lafontaine, D. L. (2013). The complexity of human ribosome biogenesis revealed by systematic nucleolar screening of Pre-rRNA processing factors. *Molecular cell*, 51(4), 539-551.
- The Human Protein Atlas. Disponível em <http://www.proteinatlas.org>
- Thomas, G. (2000). An encore for ribosome biogenesis in the control of cell proliferation. *Nature cell biology*, 2(5), E71.
- Tinton, S. A., Schepens, B., Bruynooghe, Y., Beyaert, R., & Cornelis, S. (2005). Regulation of the cell-cycle-dependent internal ribosome entry site of the PITSLRE protein kinase: Roles of Unr (upstream of N-ras) protein and phosphorylated translation initiation factor eIF-2 α . *Biochemical Journal*, 385(1), 155-163.
- Tong, Q. S., Zheng, L. D., Wang, L., Zeng, F. Q., Chen, F. M., Dong, J. H., & Lu, G. C. (2005). Downregulation of XIAP expression induces apoptosis and enhances chemotherapeutic sensitivity in human gastric cancer cells. *Cancer gene therapy*, 12(5), 509.
- Torres, T. E., Russo, L. C., Santos, A., Marques, G. R., Magalhaes, Y. T., Tabassum, S., & Forti, F. L. (2017). Loss of DUSP3 activity radiosensitizes human tumor cell lines via attenuation of DNA repair pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1861(7), 1879-1894.

Tschochner, H., & Hurt, E. (2003). Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends in cell biology*, 13(5), 255-263.

UNIPROT. Disponivel em <https://www.uniprot.org>

Vafa, O., Wade, M., Kern, S., Beeche, M., Pandita, T. K., Hampton, G. M., & Wahl, G. M. (2002). c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability. *Molecular cell*, 9(5), 1031-1044.

Vagner, S., Galy, B., & Pyronnet, S. (2001). Irresistible IRES. *EMBO reports*, 2(10), 893-898.

Vagner, S., Gensac, M. C., Maret, A., Bayard, F., Amalric, F., Prats, H., & Prats, A. C. (1995). Alternative translation of human fibroblast growth factor 2 mRNA occurs by internal entry of ribosomes. *Molecular and cellular biology*, 15(1), 35-44.

Velusamy, T., Shetty, P., Bhandary, Y. P., Liu, M. C., & Shetty, S. (2008). Posttranscriptional regulation of urokinase receptor expression by heterogeneous nuclear ribonuclear protein C. *Biochemistry*, 47(24), 6508-6517.

Vladimirov, S. N., Ivanov, A. V., Karpova, G. G., Musolyamov, A. K., Egorov, T. A., Thiede, B., ... & Otto, A. (1996). Characterization of the human small-ribosomal-subunit proteins by N-terminal and internal sequencing, and mass spectrometry. *European journal of biochemistry*, 239(1), 144-149.

Volarević, S., Stewart, M. J., Ledermann, B., Zilberman, F., Terracciano, L., Montini, E., ... & Thomas, G. (2000). Proliferation, but not growth, blocked by conditional deletion of 40S ribosomal protein S6. *Science*, 288(5473), 2045-2047.

von der Haar, T. (2012). Mathematical and computational modelling of ribosomal movement and protein synthesis: an overview. *Computational and structural biotechnology journal*, 1(1), e201204002.

Warner, J. R. (1999). The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends in biochemical sciences*, 24(11), 437-440.

Weber, H. J. (1972). Stoichiometric measurements of 30S and 50S ribosomal proteins from *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics MGG*, 119(3), 233-248.

Weingarten-Gabbay, S., Khan, D., Liberman, N., Yoffe, Y., Bialik, S., Das, S., ... & Kimchi, A. (2014). The translation initiation factor DAP5 promotes IRES-driven translation of p53 mRNA. *Oncogene*, 33(5), 611.

Westermann, P., Heumann, W., & Bielka, H. (1976). On the stoichiometry of proteins in the small ribosomal subunit of hepatoma ascites cells. *FEBS letters*, 62(2), 132-135.

Xue, S., & Barna, M. (2012). Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology. *Nature reviews Molecular cell biology*, 13(6), 355.

- Yang, D. Q., Halaby, M. J., & Zhang, Y. (2006). The identification of an internal ribosomal entry site in the 5'-untranslated region of p53 mRNA provides a novel mechanism for the regulation of its translation following DNA damage. *Oncogene*, 25(33), 4613.
- Yang, F., Yi, F., Han, X., Du, Q., & Liang, Z. (2013). MALAT-1 interacts with hnRNP C in cell cycle regulation. *FEBS letters*, 587(19), 3175-
- Zaher, H. S., & Green, R. (2009). Fidelity at the molecular level: lessons from protein synthesis. *Cell*, 136(4), 746-762.
- Zarai, Y., Margaliot, M., & Tuller, T. (2016). On the ribosomal density that maximizes protein translation rate. *PLoS One*, 11(11), e0166481.
- Zheng, Y., & Miskimins, W. K. (2011). Far upstream element binding protein 1 activates translation of p27Kip1 mRNA through its internal ribosomal entry site. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 43(11), 1641-1648.

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 - Presença de dímeros de primers e eficiência dos primers

Avaliação da presença de dímero de primers através da curva de dissociação e menor Ct para os primers forward e reverse dos genes 5.8S, 18S, 28S e 45S. Duas concentrações de primers foram testadas para observar a diferença em picos inespecíficos. Não teve maior impacto a concentração maior de primers, e o menor Ct obtido foi na concentração maior.

Anexo 2 - Eficiências de todos os pares de primers

Determinação da eficiência (Ef) dos primers 5.8S, 18S, 28S, 45S e GAPDH. Após a determinação da menor concentração de primers com somente um pico e o menor Ct, as eficiências absolutas foram calculadas pela fórmula: $10^{\left(\frac{-1}{\alpha}\right)} - 1$, onde α é o coeficiente angular da curva da eficiência de cada par de primers obtida pelo número de ciclos necessários para amplificar uma amostra qualquer em função do logaritmo da concentração de primers.

Anexo 3 - Integridade do RNA total e síntese de cDNA

2100 expert_Eukaryote Total RNA Nano_DE04105463_2019-04-05_11-27-55.xad

Page 1 of 19

Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano
Data Path: C:\...Eukaryote Total RNA Nano_DE04105463_2019-04-05_11-27-55.xad

Created: 4/5/2019 11:27:54 AM
Modified: 4/5/2019 12:24:03 PM

Electrophoresis File Run Summary

2100 Expert (B.02.08.SI648)

© Copyright 2003 - 2009 Agilent Technologies, Inc.

Printed: 4/5/2019 12:25:00 PM

Qualidade das amostras usadas nos ensaios de síntese de cDNA. O RIN>9 é considerado uma amostra ideal para ensaios subsequentes. *Falha no chip do Bioanalyzer. A qualidade das amostras foi assumida como ótima. Foram analisadas três réplicas biológicas, duas através do kit Agilent RNA 6000 Nano (Bioanalyzer) e eletroforese em gel de agarose, e a terceira só foi analisada em gel de agarose. Foram aceitas as amostras com um número de Integridade do RNA (RIN) maior a 9 e bandas definidas (íntegras) para os rRNAs 28S e 18S.

Anexo 4 – Qualidade dos rRNA do extrato total feito com Trizol

Anexo 5 – Região reconhecida pelos primers dos genes ribossômicos

Anexo 6 - Presença de HNRNPC nas subunidades ribossomais, monossomas e polissomos

Presença de HNRNPC1/C2 nas frações

Presença de RPS6 nas frações

Anexo 7 – Valores obtidos do ensaio RT-qPCR para os genes c-myc e xiap.

Poço	Amostra	Primer	Ct	Ct mean
D2	M c RNAm 3	c-myc	18,96354	19,05353
D6	2a c RNAm 3	c-myc	19,11073	19,44688
E2	M c RNAm 3	c-myc	19,14603	
E6	2a c RNAm 3	c-myc	19,88681	
F2	M c RNAm 3	c-myc	19,05103	
F6	2a c RNAm 3	c-myc	19,34308	
G1	ntc	c-myc	36,93604	
D1	M c RNAm 3	xiap	23,10096	22,85827
D5	2a c RNAm 3	xiap	22,16321	22,19424
E1	M c RNAm 3	xiap	22,79134	
E5	2a c RNAm 3	xiap	22,03573	
F1	M c RNAm 3	xiap	22,68252	
F5	2a c RNAm 3	xiap	22,38377	
G2	ntc	xiap	36,99303	
D4	M c RNAm 3	GAPDH	12,87974	13,04018
D8	2a c RNAm 3	GAPDH	12,90091	12,85588
E4	M c RNAm 3	GAPDH	12,93873	
E8	2a c RNAm 3	GAPDH	12,71998	
F4	M c RNAm 3	GAPDH	13,30208	
F8	2a c RNAm 3	GAPDH	12,94675	
H5	ntc	GAPDH	36,03156

SÚMULA CURRICULAR

Dados pessoais

Pault Yeison Minaya Ferruzo

Lima-Perú 19/01/1987

Formação acadêmica/titulação

- 2016 Mestre em Bioquímica. Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Estudos funcionais e biológicos associados à interação de proteínas DUSP3-HNRNPC.
Orientador: PhD. Fabio Luis Forti
Bolsista de: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES. Bolsista de Mestrado, CAPES PROEX, 03/2016 – 02/2018
- 2009 - 2013 Graduação em Genética e Biotecnologia. Universidade Nacional Maior de San Marcos, UNMSM, Lima, Peru

Formação complementar

- 2018 Escola de Modelagem de Biomoléculas (80h). Departamento de Química Inorgânica. Universidade de Buenos Aires (UBA), Buenos Aires, Argentina
- 2017 - 2017 Biologia Molecular de Transformação Maligna. (150h). Núcleo de Terapia Celular e Molecular - NUCEL. Universidade de São Paulo, USP, Brasil
- 2014 - 2014 III Curso de clonagem e expressão de proteínas (73h). Universidade Peruana Cayetano Heredia - UPCH, UPCH, Lima, Peru
- 2013 - 2013 X Técnicas em Biologia Molecular (56h). Universidade Peruana Cayetano Heredia - UPCH, UPCH, Lima, Peru
- 2013 I Curso de Células-Tronco e Terapia Celular GETCEL - Sociedade de Técnicas Médicas (SOCIELAB), Lima, Peru
- 2013 - 2013 VI CURSO INTERNACIONAL DE CAMPUS: PERSPECTIVAS DE TECNOLOGIAS REPRODUTIVAS EM SAÚDE GLOBAL NA REGIÃO

ANDINA. (30h) Universidade Nacional Prefeito de San Marcos, UNMSM, Lima, Peru

Estágios

- 2018 - 2018 Grupo de Modelagem Molecular, DQIAQF-FCEN-UBA / INQUIMAE-CONICET, Departamento de Química Inorgânica. Universidade de Buenos Aires (UBA), Buenos Aires, Argentina
- 2012 - 2012 Laboratório de Neurocisticercose e Histopatologia INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS NEUROLÓGICAS, INCN, Lima, Peru.
- 2012- 2013 Laboratório de Fisiologia da Reprodução (LFRA), Universidade Nacional Prefeito de San Marcos, UNMSM, Lima, Peru.
- CRIOPRESERVAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO ESPERMATOGONIAIS DE ALPACAS MASCULINAS

Publicações / trabalhos apresentados em congresso

- 2018 Russo, L. C., Farias, J. O., Ferruzo, P. Y. M., Monteiro, L. F., & Forti, F. L. (2018). Revisiting the roles of VHR/DUSP3 phosphatase in human diseases. *Clinics*, 73(Suppl 1). doi: 10.6061/clinics/2018/e466s
- 2018 Russo, L. C., Minaya, P. Y., Silva, L. E., & Forti, F. L. (2018). Assessing the Roles of Rho GTPases in Cell DNA Repair by the Nucleotide Excision Repair Pathway. In *Rho GTPases* (pp. 319-338). Humana Press, New York, NY.
- 2018 Monteiro, L. F., Ferruzo, P. Y. M., Russo, L. C., Farias, J. O., & Forti, F. L. (2018). DUSP3/VHR: A Druggable Dual Phosphatase for Human Diseases.
- 2017 Velloso, F. J., Bianco, A. F., Farias, J. O., Torres, N. E., Ferruzo, P. Y., Anschau, V., ... & Correa, R. G. (2017). The crossroads of breast cancer progression: insights into the modulation of major signaling pathways. *OncoTargets and therapy*, 10, 5491. doi: 10.2147/OTT.S142154
- 07/2017 POSTER: FUNCTIONAL AND BIOLOGICAL STUDIES ASSOCIATED TO THE INTERACTION OF DUSP3 WITH THE NUCLEAR PROTEINS

CONTROLLING RIBOSOME BIOGENESIS UNDER CELLULAR DNA DAMAGE Ferruzo, P; Forti. F., Columbano, C. : Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq

07/2013 POSTER: ISOLATION, MOLECULAR CHARACTERIZATION, AND FREEZING/THAWING OF ALPACA Vicugna pacos SPERMATOGONIAL STEM CELLS Valdivia, M, Ferruzo., P. et al.,: 46th ANNUAL MEETING REPRODUCTIVE HEALTH: NANO TO GLOBAL PROGRAM MONTRÉAL, QUÉBEC

05/2012 POSTER: "GENES DE IMPORTANCIA EN REPRODUCCIÓN DE CAMÉLIDOS CO-AUTHOR, II ENCUESTRO INTERNACIONAL DE GRUPOS Y SEMILLEROS DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

Prêmios:

12/07/2018 Bolsa de estudos CELFI. "Beca para estudos de investigação nos Centros CELFI", Centro Latinoamericano de Formação Interdisciplinar. Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação Produtiva (MinCyT), Argentina.

07/2017 Recebeu o "SBBq AWARD" de melhor pôster apresentado durante a 46ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq)

"Estudos funcionais e biológicos associados à interação do DUSP3 com as proteínas nucleares que controlam a biogênese do ribossomo sob danos celulares ao DNA"