LUCAS FALCÃO MONTEIRO

**Busca por alvos intranucleares da tirosina fosfatase de
especificidade dual 12 em mecanismos de resposta a danos no
DNA em células tumorais humanas**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia da Universidade de São
Paulo, Instituto Butantan e Instituto de
Pesquisas Tecnológicas para
obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia

SÃO PAULO

2018

LUCAS FALCÃO MONTEIRO

**Busca por alvos intranucleares da tirosina fosfatase de especificidade dual 12
em mecanismos de resposta a danos no DNA em células tumorais humanas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Fábio Luís Forti

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

SÃO PAULO

2018

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Monteiro, Lucas

Busca por alvos intranucleares da tirosina fosfatase de especificidade dual 12 em mecanismos de resposta a danos no DNA em células tumorais humanas / Lucas Monteiro; orientador Fábio Forti. -- São Paulo, 2018.
132 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Biologia celular. 2. Proteômica. 3. Bioquímica. 4. Estresse oxidativo. 5. Dano ao DNA. I. Forti, Fábio, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Lucas Falcão Monteiro

Título da Dissertação: Busca por alvos intranucleares da tirosina fosfatase de especificidade dual 12 em mecanismos de resposta a danos no DNA em células tumorais humanas

Orientador: Prof. Dr. Fábio Luís Forti

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

CERTIFICADO DE ISENÇÃO - CEUA

Universidade de São Paulo
Instituto de Química

DECLARAÇÃO

Declaro que o aluno LUCAS FALCÃO MONTEIRO, número USP 7155750, regularmente matriculado no curso de Pós-Graduação Interunidades, orientado pelo Prof. Dr. Fabio Luis Forti, não utilizou animais do Biotério do Instituto de Química da USP, supervisionado por este Comitê de Ética em Cuidados de Uso de Animais – CEUA.

São Paulo, 8 de outubro de 2018.

Prof. Dra. Leticia Labriola
Coordenadora CEUA

Dedico este trabalho à minha família, que sempre será uma constante na minha vida. Isto é o fruto de anos de apoio e investimento em mim, e tenho esperança num futuro cheio de frutos para todos nós.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar aos meus colegas de laboratório. Yuli, Lilian, Jessica, Juliana, Berê, Pault, Luiz e Arthur. Estendo os agradecimentos às colegas que fazem iniciação científica, apesar do pouco tempo convivido. A ajuda, as risadas, os conselhos e a companhia foram fundamentais para sobreviver a estes 3 anos.

Ao Professor Fábio agradeço pela confiança em mim, o apoio sempre que preciso, os estímulos para que eu fosse além, a paciência nos momentos em que discordamos, e pelos puxões de orelha, muitas vezes necessários.

Agradeço aos colegas de outros laboratórios que sempre estiveram dispostos a me socorrer, em especial o grupo da Prof.^a Daniela Bassères, da Prof.^a Bianca Zingales, da Prof.^a Ohara Augusto, e do Dr. Lei Iwai. Um abraço especial ao Marcelo Nunes, nosso vizinho de laboratório, que nunca hesita em estender a mão sempre que nosso grupo precisa. Também lembro aqui da Carolina Kiski, que dedicou prontamente um bom tempo para me auxiliar na preparação de amostras para o massas.

Agradeço à Central Analítica do IQ-USP pelo apoio com a espectrometria de massas, ao CADI da FMVZ-USP, e à Dra. Rose Eli Ricci pela ajuda com as análises de microscopia confocal. Agradeço à CAPES, que financiou meus estudos por meio de bolsa, e à FAPESP pelo financiamento do laboratório (Processos N°. 2008/58264-5, 2015/03983-0 e 2018/01753-6).

Ao meu melhor amigo, Paulo Roberto, agradeço pela lealdade e apoio há tantos anos. Isso sempre vai importar para mim.

Por fim, agradeço à minha família por sempre poder contar com eles. Fui sortudo desde o nascimento por ter pessoas tão especiais ao meu lado.

“Faça o melhor que você pode até que
saiba mais. Então, quando souber mais,
faça melhor.” (Dr. Maya Angelou)

RESUMO

MONTEIRO, L.F. **Busca por alvos intranucleares da tirosina fosfatase de especificidade dual 12 em mecanismos de resposta a danos no DNA em células tumorais humanas**. 2018. 132 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A fosfatase de especificidade dual 12 (DUSP12) é membro da família das proteína-tirosina fosfatases DUSPs atípicas. Ela pode desfosforilar resíduos de serina/treonina além de tirosina. Além de seu domínio catalítico, possui um domínio de dedo-de-zinco, um motivo comum nas proteínas, base para interação com outras biomoléculas. A DUSP12 tem expressão alta na maioria dos tecidos humanos, e localização predominantemente nuclear, participando de diversos processos já descritos, como o ciclo celular, a resposta ao estresse, a diferenciação celular, a maturação ribossômica e há indícios de que seja importante para o desenvolvimento embrionário humano. Porém, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares subjacentes. Neste projeto, buscamos identificar alvos nucleares da DUSP12, expondo as células tumorais de pulmão, A549, e de mama, MCF-7, a diferentes estímulos genotóxicos, a fim de observar mudanças no padrão de interação dos alvos capturados. Lançando mão de ensaios de co-precipitação e identificação por espectrometria de massas, identificamos uma lista de alvos potenciais da fosfatase. A partir de análises computacionais, destacamos na lista diversas proteínas e processos centrais às redes de interação já descritas na literatura. Encontramos proteínas ribonucleoproteínas envolvidas na maturação ribossômica e nos grânulos de estresse, e outras cuja relação seria menos óbvia, como proteínas da coesina e da regulação da estrutura da cromatina. Adicionalmente, identificamos processos cuja relação não havia sido proposta ou investigada, como a dinâmica do citoesqueleto e o splicing de mRNA. Comprovamos a presença de DUSP12 em regiões de heterocromatina, onde pode exercer influência regulatória. Estabelecemos a interação e colocalização com partículas ribonucleoproteicas que contêm a NOP56, proteína central das nossas análises. Enfim, também observamos sugestão de interação com NAT10, indicando possível influência nos processos de dinâmica de microtúbulos, relevantes para a separação cromossômica, e das histonas, relevante para a expressão gênica e ciclo celular.

Palavras-chave: Biologia celular. Proteômica. Bioquímica. Estresse oxidativo. Dano ao DNA.

ABSTRACT

MONTEIRO, L.F. **Search for intranuclear targets of dual specificity phosphatase 12 in mechanisms response to DNA damage in human cancer cell lines**. 2018. 132 p. Dissertation (Masters thesis in Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Dual Specificity Phosphatase 12 (DUSP12) is a member of the atypical DUSP protein-tyrosine phosphatases. It can dephosphorylate serine/threonine residues, besides tyrosine. In addition to its catalytic domain, it has a zinc finger domain, a common domain for proteins, and a starting point for the interaction with other biomolecules. DUSP12 displays high expression in most human tissues, and mostly nuclear localization, taking part in several known processes, such as cell cycle, stress response, differentiation, ribosomal maturation, and there are signs that it might be important for human embryonic development. However, little is known about the subjacent molecular mechanisms. In this project, we sought to identify nuclear targets of DUSP12, exposing lung (A549) and breast (MCF-7) tumoral cells to different genotoxic stimuli, aiming to identify shifts in the pattern of identified targets. Using co-precipitation followed by mass spectrometry, we identified a list of potential targets of this phosphatase. From computational analyses, we highlighted several proteins and processes which are central to the interaction networks that were already described in the literature. We found ribonucleoproteins involved in the ribosomal maturation and stress granules, and others whose relationship would be less obvious, such as cohesin proteins and regulators of chromatin structure. Additionally, we identified processes whose relation to DUSP12 had not been proposed or identified, such as the cytoskeleton dynamics and mRNA splicing. With biochemical validations, we showed the presence of DUSP12 in regions of heterochromatin, where it can exert regulatory influence. We established the interaction and colocalization with ribonucleoprotein particles that contain NOP56, central to our analyses. Lastly, we also observed a suggestion of interaction with NAT10, indicating a possible influence in the processes of microtubule dynamics, relevant to chromosomal segregation, and histone dynamics, relevant for gene expression and cell cycle.

Keywords: Cell Biology. Proteomics. Biochemistry. Oxidative stress. DNA damage.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismos clássicos de fosforilação e desfosforilação	26
Figura 2 – A família estendida de PTPs no genoma humano	28
Figura 3 – Estrutura do domínio catalítico da DUSP12	30
Figura 4 – Os mecanismos de Reparo por Excisão de Bases (BER) e Reparo por Excisão de Nucleotídeos (NER)	34
Figura 5 – Os mecanismos de Reparo por Excisão de Bases (BER) e Reparo por Excisão de Nucleotídeos (NER)	36
Figura 6 – Os mecanismos de Reparo por Recombinação Homóloga (HR), Anelamento de fitas simples (SSA) e Recombinação Não-homóloga (NHEJ)	37
Figura 7 – Reações mais comuns de detoxificação de ROS.....	38
Figura 8 – Esquemas gerais de espectrometria de massas para proteínas	42
Figura 9 – Imunofluorescência para verificação de localização celular de DUSP12	62
Figura 10 – Western Blot das frações do protocolo de extração nuclear	63
Figura 11 – Gel de agarose com produtos de PCR para verificação de inserto de DUSP12	64
Figura 12 – Gel de poliacrilamida com as proteínas recombinantes purificadas em resina de glutathiona-sepharose	65
Figura 13 – Atividade de DUSP12 sobre OMFP	66
Figura 14 – Teste de clivagem por trombina com lisados de A549 após pull-down	67
Figura 15 – Análise de duração da reação de clivagem por trombina e concentração das iscas	68

Figura 16 – Diagramas de Venn ilustrando a distribuição de alvos de acordo com as linhagens celulares ou com tratamentos	74
Figura 17 – Ilustração dos processos de análise de redes	92
Figura 18 – Imunofluorescência confocal.....	101
Figura 19 – Ensaio de pull-down utilizando DUSP12 como isca para validação de alvos	104
Figura 20 – Imunoprecipitação de HP1BP3	105
Figura 21 – Co-imunoprecipitação de de DUSP12 com NAT10	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequências dos primers utilizados para verificar inserto de DUSP12	50
Tabela 2 – Lisados submetidos a purificação por afinidade	53
Tabela 3 – Concentrações dos diferentes tampões de lavagem utilizados	53
Tabela 4 – Teste de super-representação de localização celular das proteínas identificadas	69
Tabela 5 – Tabela contendo alvos identificados por espectrometria de massas, com as proteínas com maior confiabilidade.....	70
Tabela 6 – Tabela contendo alvos identificados por espectrometria de massas, com critérios menos restritivos para inclusão.....	76
Tabela 7 – Análise de super-representação de alvos em A549	71
Tabela 8 – Análise de super-representação de alvos em MCF-7	72
Tabela 9 – Análise de super-representação de alvos comuns a A549 e MCF-7	73
Tabela 10 – Análise de super-representação de alvos em condições não-tratadas	74
Tabela 11 – Análise de super-representação de alvos em condições tratadas	75
Tabela 12 – Análise de super-representação de alvos (união entre as condições)	76
Tabela 13 – Análise de super-representação de alvos (união entre as condições, mais de três ocorrências)	78
Tabela 14 – Alvos centrais a partir de análise de redes	80
Tabela 15 – Proteínas não identificadas no massas, centrais nas análises de redes	81

Tabela 16 – Resíduos mais comumente identificados com fosforilação segundo o PhosphositePlus	98
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina Difosfato
APE1	Endonuclease apurínica/apirimidínica 1
ATM	Serina/Treonina Quinase mutada em ataxia-telangiectasia
ATP	Adenosina Trifosfato
ATR	Serina/Treonina Quinase relacionada a ATM e Rad3
APS	Persulfato de Amônio
BRCA	Breast Cancer, proteínas associadas ao câncer de mama
BSA	Albumina de soro bovino
CHK	Quinase de checkpoint
c-MET	Tirosina Quinase Met (Metástase)
DAPI	4'-6-diamino-2-fenilindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNA-PKCs	Proteína quinases dependentes de DNA
DTT	Ditiotreitol
DUSP	Fosfatase de Especificidade Dual
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERCC1	Proteína de reparo de DNA por excisão ERCC1
FDR	Taxa de Falsas Descobertas
FEN1	Endonuclease de <i>flaps</i> 1
GST	Glutathione-S-Transferase
hnRNP	Ribonucleoproteínas nucleares heterogêneas
Hsp70	Proteína de choque térmico de massa molecular 70 kDa
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
IPTG	Isopropiltiogalactosídeo
IQUSP	Instituto de Química da Universidade de São Paulo
ITGA1	Integrina Subunidade Alfa 1
LB	Luria-Bertani
LETA	Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada
MAPK	Quinases ativadas por mitógenos
mRNA	RNA mensageiro
ncRNA	RNA não codificador
O.D.	Densidade Óptica
OMFP	Fosfato de 3-orto-metilfluoresceína
PBS	Tampão Salino de Fosfato
PBSA	Tampão Salino de Fosfato com ausência de Cálcio
PCNA	Antígeno nuclear de células proliferativas
PMSF	Fluoreto de Fenilmetilsulfonila
p-Tyr	Fosfotirosina
q-ToF	Quadrupolo Time-of-Flight
RFC	Fator de Replicação C
RNA	Ácido ribonucléico
RNAi	RNA de interferência
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPA	Proteína de replicação A

RPMI Medium	Meio Roswell Park Memorial Institute
rRNA	RNA ribossômico
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
Ser	Serina
T.A.	Temperatura Ambiente
TFA	Ácido Trifluoracético
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
TFIIH	Fator de Transcrição II H
UVB	Radiação Ultravioleta B
XPA	Fator de reconhecimento e reparo de DNA XPA
XPC	Fator de reconhecimento e reparo de DNA XPC
XPF	Endonuclease XPF
XPG	Endonuclease XPG
XRCC1	Proteína de reparo de DNA XRCC1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1 Fosforilação de proteínas	25
2.2 As proteína fosfatases	27
2.3 As PTPs: Proteína Tirosina Fosfatases	28
2.4 A DUSP12	29
2.5 Estresses oxidativos e genotóxicos	33
2.6 Câncer e linhagens celulares	39
2.7 Purificação por afinidade e espectrometria de massas	40
2.8 Relevância biotecnológica	43
3 OBJETIVOS	45
3.1 Objetivo geral	45
3.2 Objetivos específicos	45
4 MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1 Linhagens celulares	47
4.2 Imunofluorescência e Microscopia Confocal	47
4.3 Estímulos genotóxicos e oxidantes	48
4.4 Fracionamento nuclear	48

4.5 Lisado Celular Total	50
4.6 PCR	50
4.7 Produção de proteína recombinante	51
4.8 Ensaio de atividade fosfatásica	51
4.9 Pull-down (purificação por afinidade)	52
4.10 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) / Western Blot	54
4.11 Immunoblot	55
4.12 Coloração por prata	56
4.13 Processamento das amostras para espectrometria de massas	56
4.14 Espectrometria de massas	57
4.15 Filtro estatístico das proteínas	57
4.16 Análise funcional das proteínas identificadas	59
4.17 Co-Imunoprecipitação	60
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1 Caracterização do modelo de estudo.....	61
5.2 Produção de proteína recombinante	63
5.3 Purificação por afinidade	63
5.4 Espectrometria de massas	69
5.5 Análise de Ontologia Gênica	75

5.6 Análise de redes	90
5.7 Validação de alvos	99
5.7.1 Microscopia confocal e de fluorescência	99
5.7.2 Pull-down / Co-imunoprecipitação	100
6 CONCLUSÃO	106
REFERÊNCIAS	108
APÊNDICE	115
ANEXO	127

1 INTRODUÇÃO

O laboratório de sinalização em sistemas biomoleculares (LSSB) estuda fosfatases de especificidade dual (DUSPs), entre outras proteínas sinalizadoras. Apesar dos avanços no estudo da DUSP3 no nosso grupo, há muito o que se contribuir para a compreensão das DUSPs de modo geral. No caso da DUSP12, a dramática falta de explicações moleculares para as várias funções biológicas já descritas nos motivou a identificar seus alvos de interação proteica. Com um enfoque na estabilidade genômica, propusemos a busca por alvos nucleares desta fosfatase.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Fosforilação de proteínas

A fosforilação de proteínas é uma das modificações pós-traducionais mais importantes e mais estudadas. Ela consiste na adição de um grupo fosforil ($-PO_3^{2-}$) a um resíduo de aminoácido, geralmente serina, treonina ou tirosina. Também já foram descritos muitos casos de histidinas, argininas e lisinas fosforiladas por meio de nitrogênios, formando uma ligação fosforamidato (1), que é muito lábil e difícil de ser estudada, justificando em parte o fato destas modificações serem menos descritas na literatura. A adição deste grupo fosforil pode influenciar dramaticamente a estrutura e função das proteínas, adicionando uma carga negativa e, portanto, possivelmente provocando distorções estruturais ou gerando/eliminando um sítio de acoplamento a um parceiro de interação, o que por fim altera a dinâmica funcional da proteína, e essa alteração pode ser drástica (e.g. a proteína totalmente ativa no estado fosforilado, inativa ao ser desfosforilada) ou pode ser um ajuste fino de sua atividade. A fosforilação também pode interferir nos mecanismos de transporte celular e degradação proteica, influenciando na localização e na estabilidade da proteína, respectivamente. Isto também leva a mudanças marcantes em sua função e atividade (2).

O mecanismo básico das células para o controle dos níveis de fosforilação são as enzimas proteína quinases e proteína fosfatases. As primeiras são responsáveis pela transferência do grupo fosforil a partir do fosfato- γ do ATP a uma proteína, ou outra biomolécula, e seguem um mecanismo similar, que envolve a

ligação do ATP e da proteína, seguido pela transferência do fosfato e liberação da proteína fosforilada e de ADP (3). Já as proteína fosfatases são mais diversas, e a remoção do fosfato pode prosseguir por meio de um intermediário fosfoenzima, como no caso das proteína tirosina fosfatases, ou com transferência direta assistida por um íon metálico, como no caso das serina/treonina fosfatases (4). A Figura 1 ilustra estes mecanismos.

Figura 1 – Mecanismos clássicos de fosforilação e desfosforilação. a) As proteína quinases transferem o grupo fosforil após ligarem-se ao substrato e ao ATP, e, posteriormente, liberam a proteína fosforilada e ADP. Ubersax et al., 2007. b e c) As proteína fosfatases podem ter dois mecanismos catalíticos diferentes, envolvendo intermediários fosfoenzima ou íons metálicos. Rusnak et al., 2000 (5).

Um mecanismo comum de sinalização nas células envolve cascatas de fosforilação, uma sequência de eventos em que quinases são ativadas e passam o sinal adiante, amplificando o sinal e mudando os níveis de fosforilação da célula inteira. Um exemplo bem conhecido é o da via das MAP quinases (Proteína Quinases Ativadas por Mitógenos). O sinal intra ou extracelular é recebido pelas MEKKs (Quinases de MEKs), que fosforilam as MEKs (Quinases de MAP e ERK quinases). Por sua vez, cada MEK fosforila uma (ou algumas poucas) MAP quinases, e estas agem sobre uma vasta gama de alvos celulares, modulando o comportamento celular. Em suma, muitos sinais podem ativar estas vias, como a falta (ou presença) de fatores de crescimento, citocinas, choque osmótico ou térmico etc., e os alvos afetados pela cascata vão desde outras quinases, passando por fatores de transcrição até enzimas de ciclos metabólicos, e outros (6).

Outro exemplo de vias envolvendo fosforilação é o da serina-proteína quinase ATM e serina/treonina-proteína quinase ATR, duas quinases envolvidas no reconhecimento de danos no DNA. Ao ser recrutada para regiões de DNA fita

simples, geradas a partir de danos e outros processos do DNA, a ATR é ativada em toda fase S e fosforila CHK1 e outros efetores, regulando a replicação e impedindo que a célula entre em mitose prematuramente, sendo essencial para a viabilidade de células em estado replicativo. Já a ATM é recrutada para locais de quebra dupla de DNA, onde ela é ativada e fosforila a variante de histona H2AX, a fim de sinalizar o dano. Isto leva ao recrutamento de mais cópias de ATM e outras proteínas de reparo, e mais fosforilação de H2AX. A ATM também fosforila a serina/treonina-proteína quinase CHK2 e outros efetores, efetivamente inibindo a replicação, parando o ciclo celular e promovendo o reparo de quebra dupla (7).

2.2 As proteína fosfatases

De acordo com Sacco et al (2012), existem aproximadamente 200 proteína fosfatases no genoma humano (8), enquanto já foram descritas mais de 500 proteína quinases (9). A menor quantidade de fosfatases pode ser explicada pelo fato de terem menor especificidade de substratos, em parte por mecanismos próprios de regulação por subunidades proteicas que, em alguns casos, modulam a especificidade de alvos.

Uma das famílias mais importantes de proteína fosfatases são as PPPs - Fosfoproteína Fosfatases –, que agem sobre resíduos de serina/treonina. Em humanos, há poucas subunidades catalíticas nesta família, em torno de 13, mas devido à combinação de subunidades catalíticas e regulatórias, há uma ampla gama de possibilidade de substratos. Desta forma, as PPPs conseguem identificar a variedade de proteínas fosforiladas em resíduos de serina e treonina nas células, que representam estimados 86,4 e 11,8 % dos aminoácidos fosforilados, respectivamente (10).

Apesar de os resíduos de tirosina fosforilada serem menos expressivos nas células – menos de 2 % – existe uma variedade maior de PTPs (Proteína Tirosina Fosfatases) ativas, aproximadamente 80 (11), o que indica importância biológica na regulação destes resíduos. Dentro da família, existem algumas fosfatases que agem sobre mRNA, sobre fosfolipídeos de inositol e ainda algumas proteínas cataliticamente inativas, e o que une esta família é a homologia do domínio catalítico, com o motivo (I/V)HCXAGXGR(S/T) (4).

2.3 As PTPs: Proteína Tirosina Fosfatases

De acordo com Alonso et al., consideramos a família estendida de PTPs aquelas que: (a) tenham um domínio catalítico homólogo de PTPs; (b) que tenham um motivo típico CxxxxxR em um domínio que não o catalítico de PTPs; (c) que tenham atividade fosfatásica sobre tirosinas; ou (d) alta homologia a membros com atividade de tirosina fosfatase comprovada (12). A Figura 2 ilustra esta classificação.

Figura 2 – A família estendida de PTPs no genoma humano (Adaptado de Alonso et al, 2015).

					Substrato
Baseadas em Cisteína CxxxxxR	Classe I	Subclasse I	Clássicas	37	pTyr, PIPs
		Subclasse II	VH1-like	63	pTyr, pSer, pThr, PIPs, outros
		Subclasse III	SACs	6	PIPs
		Subclasse IV	PALD1	1	? = substrato desconhecido
		Subclasse V	INPP4s	2	PIPs
		Subclasse VI	TMEM55s	2	PIPs
	Classe II	LMW-PTP		1	pTyr
		SSU72		1	pSer
	Classe III	CDC25s		3	pTyr, pThr
		HAD		4	pTyr, pSer
Baseadas em Aspartato	HAD		EYAs	4	pTyr, pSer
Baseadas em Histidina	PGM		UBASH3s	2	pTyr
	Fosfatases ácidas		ACPs	3	pTyr, pSer, pThr, outros

Dentre as PTPs com sítio ativo baseado em cisteína, a família mais expressiva é a das PTPs (classe I), que evoluíram de um ancestral comum (11). Ela pode ser subdivida em subclasses de acordo com a arquitetura do domínio catalítico e o nível homologia entre eles. As PTPs clássicas são, com poucas exceções, específicas para resíduos de p-Tyr e há membros transmembranares, com características de receptores, e membros intracelulares (Figura 2).

Já a subclasse II *VH1-like*, também conhecida como DUSPs - fosfatases de especificidade dual - é composta de membros menos homogêneos, cujos alvos variam desde resíduos de fosfotirosina, fosfoserina, fosfotreonina, fosfoinosítídeos e até mRNA, no caso da DUSP11. Elas são chamadas de *VH1-like* pela homologia à proteína VH1 do vírus *Vaccinia*, a primeira DUSP a ser clonada. Um dos subgrupos existentes são as ditas DUSPs típicas, que são caracterizadas pela especificidade por substratos contendo o motivo TxY, por conterem um domínio CH2 e outras regiões de ligação específica a MAP quinases, sendo importantes para a regulação

de diversas vias envolvendo essas proteínas, como proliferação e apoptose, por exemplo (11).

Outro subgrupo é o das DUSPs atípicas, um grupo menos homogêneo e menos caracterizado, cujas fosfatases não contêm motivos de identificação de MAP quinases e, portanto, não necessariamente interagem com elas. Alguns trabalhos, porém, indicam relação entre elas, e existe a hipótese de que proteínas adaptadoras sejam necessárias para mediar esta interação (13, 14).

2.4 A DUSP12

A primeira DUSP eucariótica conhecida foi a yVH1 (yeast VH1), clonada em *Saccharomyces cerevisiae* em 1992 por Guan et al (15). Ocorre um fenótipo de crescimento lento nas leveduras *yvh1Δ* e, em 1999, Muda et al. descobriram um ortólogo humano que consegue reverter este fenótipo (16). Esse ortólogo humano foi chamado de hYVH1. Em 2000, Zhang et al. isolaram o homólogo murino da hYVH1 e o nomearam Dusp12 (17). Desde então, essa fosfatase humana de especificidade dual é conhecida pelos dois nomes: hYVH1 e DUSP12: fosfatase de especificidade dual 12.

O gene da DUSP12 está localizado no cromossomo 1, dividido em 6 éxons e codifica uma proteína de 340 aminoácidos, até agora sem variantes de *splicing* identificadas. Todos os ortólogos da DUSP12 compartilham uma arquitetura similar, consistindo de um domínio catalítico de DUSPs (Figura 3) e um domínio de ligação a zinco, que se liga a dois mols de zinco por mol de proteína (16).

Quanto ao seu domínio catalítico, já foram descritos alguns mutantes inativos, o mais comum deles apresentando a mutação C115S (16), também referida como CS ou C/S. Em muitas das funções biológicas da DUSP12, como a da maturação ribossômica, essa atividade fosfatásica é irrelevante, indicando que o domínio C-terminal que se liga a zinco tenha grande importância.

Esse domínio, dito dedos-de-zinco, é um motivo comum em proteínas. O mais prevalente em humanos são os chamados C2H2, onde há duas cisteínas repetidas seguidas por duas histidinas, com espaçamento específico, e que se ligam a um átomo de zinco. Os domínios C2H2 se ligam prevalentemente a DNA, podendo regular a expressão gênica (18). Outro grupo muito prevalente é o de domínios

RING, que ligam dois átomos de zinco e já foram associados a diversas funções, incluindo interações proteína-proteína, ligação a RNA e, principalmente, função de ubiquitina ligase (19).

Figura 3 – Estrutura do domínio catalítico da DUSP12 (Uniprot, 4KI9, resolução de 2,0 Å). Há um fosfato localizado no sítio catalítico. (a) Modelo de superfície. (b) Modelo de fitas.

Apesar de não haver estrutura depositada para o domínio de ligação a zinco da DUSP12, a plataforma de predição de domínios proteicos PROSITE (20) prediz que seja um dedo-de-zinco do tipo C2H2. Já outros autores, como Muda, citaram a semelhança com domínios RING. Segundo o site de alinhamento entre proteínas blastP (21) o domínio apresenta certa homologia com a E3 ubiquitina-proteína ligase RNF180, que também contém o domínio RING e, assim como a DUSP12, liga-se a dois átomos de zinco.

A função mais bem descrita da DUSP12 e seus ortólogos é a maturação ribossômica. Um mecanismo proposto é que a DUSP12 substitua a proteína homóloga de turnover de mRNA 4 (MRTO4) no *stalk* ribossômico, e depois seja substituído pela proteína ácida ribossomal da subunidade 60S P0 (RPLP0), que é o parálogo de MRTO4 no ribossomo maduro, e parte essencial do *stalk*. A falha na maturação ribossômica pode explicar, por exemplo, o porquê de mutantes *yvh1Δ* terem fenótipo de crescimento lento em leveduras (22).

Outras observações sobre Yvh1 em leveduras incluem a relação com a expressão de Ime2 e Ime1, quinases envolvidas em esporulação e meiose (23). Yvh1 também interage com pescadillo homolog (Nop7), cuja superexpressão é capaz de reverter o fenótipo de crescimento lento de *yvh1Δ* e a expressão de Ime2 (24). Notaram que a deleção de Yvh1 causa localização incorreta de vários fatores de maturação ribossômica, incluindo Tif6 e Arx1. Em humanos, a localização incorreta observada foi do fator de iniciação de tradução eucariótico 6 (EIF6, ortólogo de Tif6) e MRTO4 (25). Por fim, também notaram que a deleção de Yvh1 influencia na integridade da parede celular, algo também causado pela deleção de Mrt4 (ortólogo de MRTO4) (26). Estes resultados, juntos, indicam que o fenótipo *yvh1Δ* em leveduras está diretamente relacionado com a falha na maturação ribossômica.

Em humanos, foi identificada função anti-apoptótica de DUSP12, que quando suprimida por RNAi, gera apoptose em células HeLa, confirmadas pela verificação de clivagem de caspase-9 (CASP9) e poli [ADP-ribose] polimerase (PARP) (27). A superexpressão de DUSP12, apesar de não promover a proliferação ou crescimento independente de ancoragem, levou a uma maior motilidade celular, e, quando as células foram expostas a estaurosporina e taspigargina, dois estímulos apoptóticos, levou a menor atividade de Caspase 3/7 e menor clivagem de PARP. Também viram que a superexpressão de DUSP12 gera aumento na expressão do proto-oncogene c-MET e do fator metastático ITGA1, indicando possível envolvimento de DUSP12 em câncer (28).

A DUSP12 também já foi relacionada ao ciclo celular. Sua supressão faz com que as células se acumulem em G₁/G₀, enquanto sua superexpressão leva a um aumento do número de células em G₂/M. Em camundongos, os níveis de mRNA de mVH1 se correlacionam com os níveis de mRNA de ciclina D1 (CCND1), uma proteína importante para a transição G₁/S. Também há uma possibilidade de envolvimento com a citocinese, pois a superexpressão de DUSP12 conseguiu liberar as células da parada do ciclo causada por nocodazol (um agente que inibe a polimerização de microtúbulos). A superexpressão de DUSP12 gera aumento do número de células poliploides, possivelmente em decorrência de uma separação problemática dos cromossomos. Também se observou que a fosforilação da Ser³³⁵

influencia na localização celular de DUSP12, resultando em perfis celulares com aumento em G₂/M (15,28).

Outra influência aparente de DUSP12 é no desenvolvimento dos organismos. Ela foi identificada como alvo de transcrição dos fatores Nanog, Oct4 e Sox2, três fatores chaves para o desenvolvimento de células embrionárias humanas. Notavelmente, menos de 200 proteínas foram identificadas simultaneamente como alvos dos três fatores, responsáveis por processos tão complexos e fundamentais (29). Em camundongos, identificaram uma diminuição dramática de expressão de Dusp12 após a diferenciação de preadipócitos marrons. Ao se superexpressar Dusp12 nestas células, ocorreu menor diferenciação, porém a superexpressão de Dusp12 cataliticamente inativa não influenciou no processo, indicando importância da atividade fosfatásica de Dusp12 na adipogênese (30).

Apesar de alguns ensaios iniciais não terem identificado a interação de DUSP12 com MAP quinases, estudos recentes em células do sistema imune demonstraram que ela desfosforila a MAPK p38 por meio da proteína adaptadora de transdução de sinais STAP2, modulando e atenuando a resposta inflamatória (31). Isto, junto com o fato de os níveis de fosforilação das MAP quinases flutuarem de acordo com o status de DUSP12 na célula, indica que possivelmente a STAP2 ou mesmo outras proteínas adaptadoras medeiam esta regulação de sinalização em outros contextos, mesmo que não haja interação física direta entre a fosfatase e as quinases.

A DUSP12 também já foi relacionada a resposta a danos oxidativos. Estudos mostraram que a DUSP12 age junto com proteínas de choque térmico e protege células HeLa de morte por choque térmico, ativação do receptor de fator de necrose tumoral (FAS) e peróxido de hidrogênio, mas não pôde protegê-las de morte por exposição à cisplatina. A presença da proteína de choque térmico de 70 kDa (HSPA), e também do domínio de ligação a zinco, ajudou a manter a atividade de DUSP12 em condições não redutoras e sob choque térmico (32). Em relação a outras DUSPs, como a DUSP3, a DUSP12 suporta maiores níveis de estresse oxidativo, por conta mecanismos de troca entre pontes dissulfeto, favorecidos pela presença de mais cisteínas na região C-terminal. Esta oxidação é reversível, mas notaram que, caso haja ejeção completa de zinco do domínio C-terminal, a proteína

não consegue recuperar sua atividade, mesmo retornando a condições redutoras (33). Outras consequências da ejeção completa de zinco são a inabilidade de se ligar à subunidade 60S do ribossomo, e foi identificada nessas condições uma clivagem no domínio de dedo-de-zinco, o que pode indicar o motivo de a proteína não conseguir recuperar sua atividade após danos oxidativos muito drásticos (34). Estes resultados indicam uma função importante da DUSP12 no monitoramento do estado redox da célula.

2.5 Estresses oxidativos e genotóxicos

A DUSP12 foi implicada na detecção de estresse redox, e alterações no seu comportamento podem causar aberrações cromossômicas. Dada a relação já estabelecida entre estas ofensas celulares e o envelhecimento, bem como doenças prevalentes na população, como câncer, problemas cardiovasculares e doenças neurodegenerativas, há grande interesse científico e tecnológico no estudo do efeito e do reparo de danos oxidativos e genotóxicos.

O dano no DNA é algo que as células enfrentam a todo momento, seja por reações espontâneas, pela reação com metabólitos ou pela influência de agentes físicos e químicos exógenos. Ocorrem problemas como a oxidação, redução ou fragmentação de bases nitrogenadas, dímeros de pirimidinas e (6-4) fotoprodutos. Também ocorrem danos na cadeia do DNA, como perda de bases nitrogenadas (sítios abásicos), quebras simples e quebras duplas. Também podem ocorrer ligações cruzadas entre as fitas de DNA, ou entre DNA e proteínas.

Exemplos de agentes que causam danos oxidativos/genotóxicos são a radiação UVB, que gera dímeros de pirimidina, oxidação de bases nitrogenadas e (6-4) fotoprodutos, além de espécies reativas de oxigênio (ROS) (35,36), a radiação Gama, conhecida por ser uma potente fonte geradora de quebras simples e duplas no DNA, além de também gerar espécies reativas de oxigênio (37,38), e toxinas como a bleomicina, uma droga radiomimética que também causa quebras simples e duplas, também liberando espécies reativas de oxigênio (39).

Em todos os casos, estes danos impedem ou dificultam a replicação correta do material genético e, caso não sejam corrigidos, podem gerar mutações

potencialmente danosas para o organismo ou para a prole. A Figura 4 exemplifica esses tipos de danos que recrutam maquinaria de reparo de DNA.

Há basicamente 5 classes gerais de reparo de danos do DNA: (a) reparo direto, como no caso das fotoliasas e metilguanina DNA metiltransferases, que revertem ciclobutanos de pirimidina/(6-4) fotoprodutos e O⁶-metilguaninas, respectivamente; (b) reparo por excisão de bases (BER); (c) reparo por excisão de nucleotídeos (NER); (d) reparo de quebra dupla e reparo recombinacional e (e), o reparo de ligações cruzadas, que usa diversos mecanismos para a resolução de ligações entre fitas de DNA.

Figura 4 – Exemplos de danos no DNA que recrutam a maquinaria de reparo. Na sequência temos forquilha de replicação colapsadas, metilação de guaninas, dímeros de timidinas, quebras simples, a falta de trechos simples fita, quebras duplas e ligações cruzadas. Figura adaptada de Sancar et al. (40).

O reparo por excisão de bases reconhece danos pouco volumosos, como bases oxidadas/reduzidas, alquiladas, desaminadas ou pareadas incorretamente. DNA glicosilases procedem com a remoção da base danificada ou incorreta, e o reparo pode prosseguir por um caminho curto, envolvendo liases associadas às glicosilases, que abrem a fita, e a DNA Polimerase β (POLB) insere o nucleotídeo correto com o auxílio de APE1 e da DNA Ligase III-XRCC1. O caminho longo também envolve APE1, que abre a fita, enquanto a combinação de DNA Polimerase δ/ϵ , PCNA e FEN1 desloca entre 2-10 nucleotídeos no lado 3' do corte, e novos nucleotídeos são adicionados à fita molde. O pedaço deslocado é cortado, e o novo pedaço é ligado pela DNA ligase I.

O reparo por excisão de nucleotídeos reconhece distorções volumosas na cadeia de DNA, formadas por exposição a radiação ou agentes químicos. Um sistema multiproteico faz duas incisões para remover a região com lesão, gerando oligômeros de 24-32 nucleotídeos em eucariotos. Posteriormente, este oligômero é liberado, e ocorre a síntese de DNA para completar a região excisada, seguido de ligação. Em humanos, este reparo é feito por 6 fatores de reparo, que somam 15 polipeptídeos: XPA, RPA e XPC (reconhecimento do dano), XPG (incisão a 3'), XPF-ERCC1 (incisão a 5') e TFIIH (separação do duplex). O vazio é preenchido pela DNA Polimerase δ/ϵ (POLD/POLE) com o auxílio de PCNA e RFC (40). A figura 5 exemplifica estes processos.

As quebras duplas no DNA ocorrem em decorrência de ofensas como radiação ionizante, a presença de espécies reativas de oxigênio (ROS) ou mesmo processos espontâneos como o colapso de forquilhas de replicação. Elas podem ser reparadas por recombinação com um cromossomo homólogo nas fases do ciclo celular onde estes estão disponíveis (após a replicação, antes da mitose). Isto é chamado de recombinação homóloga (*HR*), e mantém a informação genética. Em humanos, após a identificação da quebra dupla e a ativação das vias de reparo de DNA (*DDR*) por ATM e ATR, ocorre a ressecção das pontas na região da quebra, gerando DNA simples fita, o recrutamento de BRCA1/BRCA2 e a invasão da fita homóloga assistida por Rad51. A maquinaria de recombinação homóloga prossegue sintetizando DNA a partir da ponta 3' da fita invasora, seguido pela formação e resolução de junções de Holliday. Este processo pode ou não gerar *crossing-over* dos cromossomos homólogos.

Também pode ocorrer o anelamento de fitas simples (*SSA*), quando há sequências repetitivas em torno da quebra dupla. Após a ressecção, com auxílio de Rad52, os dois lados da quebra se anelam nas sequências repetitivas e, após deleção das pontas não aneladas, ocorre ligação, com perda da sequência interveniente (41).

Figura 5 – Os mecanismos de Reparo por Excisão de Bases (BER) e Reparo por Excisão de Nucleotídeos (NER), conforme descritos no texto. Figura adaptada de Tatum et al (38).

Por fim, também pode ocorrer a recombinação não-homóloga (*non homologous end-joining, NHEJ*) na ausência das condições citadas acima, principalmente na fase G₁ do ciclo celular. O heterodímero da proteína Ku liga-se às pontas da quebra e recruta DNA-PKcs e o heterodímero DNA Ligase 4-XRCC4, que junta as pontas independentemente de serem do mesmo cromossomo ou não (40). Estes mecanismos estão ilustrados na Figura 6.

Figura 6 – Os mecanismos de Reparo por Recombinação Homóloga (HR), Anelamento de fitas simples (SSA) e Recombinação Não-homóloga (NHEJ), conforme descritos no texto. DSB, quebras duplas. Figura adaptada de Wang et al. (43).

Nosso grupo identificou previamente interações da DUSP3 com o reparo de DNA, fornecendo *insights* sobre a influência de DUSPs neste processo. Em trabalho publicado em 2017, relatou-se que a perda de atividade de DUSP3 aumenta a susceptibilidade de células HeLa e MeWo a quebras duplas decorrentes de radiação gama (44), e análises proteômicas identificaram a interação dela com proteínas envolvidas no reparo, como hnRNP C1/C2 e nucleofosmina (NPM) (45).

Quanto ao estresse oxidativo, este é considerado o desequilíbrio da produção e eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Estas são geradas na célula pelo escape de elétrons da cadeia de transporte mitocondrial, que reagem com oxigênio molecular para gerar $O_2^{\cdot-}$, que é convertido espontaneamente para H_2O_2 ou $HO^{\cdot}$. Outras fontes de ROS são oxidases, que oxidam carboidratos, aldeídos, aminoácidos ou outros compostos presentes na célula, e também a auto-oxidação de moléculas pequenas de origem endógena ou exógena, como, por exemplo, a adrenalina. A Figura 7 ilustra os processos mais comuns de detoxificação.

Figura 7 – Reações mais comuns de detoxificação de ROS. (1) A transformação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular, facilitada pela enzima superóxido dismutase. (2) A conversão de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular pela enzima catalase. (3) A enzima glutathiona peroxidase utiliza glutathiona para detoxificar peróxido de hidrogênio ou (4) peróxidos lipídicos. (5) O estoque celular de glutathiona reduzida é repostado, em parte, pela ação da enzima glutathiona redutase e NADPH.

A liberação destas ROS, também chamadas de radicais livres, é importante para a sinalização de diversos processos, como a diferenciação (46) e resposta imune (47). Porém, quando em excesso, estas espécies são tóxicas para a célula, podendo danificar boa parte dos componentes celulares, como proteínas e DNA. Portanto, a célula possui muitos mecanismos para absorver e neutralizar estas espécies, como por exemplo as enzimas glutathiona peroxidases, que desintoxicam o peróxido de hidrogênio e peróxidos lipídicos. Outro exemplo é a vitamina C (ácido ascórbico), um antioxidante de baixa massa molecular que previne a propagação de radicais livres, evitando a oxidação de biomoléculas.

Portanto, caso haja maior produção de ROS, depleção da reserva pequenas moléculas antioxidantes, inativação de enzimas antioxidantes ou menor produção destas defesas celulares, ocorre o que se chama de estresse oxidativo, que atrapalha nos processos de sinalização celular e pode, em último caso, levar a doenças graves (48).

2.6 Câncer e linhagens celulares

Para se estudar vários dos fenômenos discutidos, desde a sinalização celular, passando pela interação entre proteínas e o efeito de ofensas genotóxicas, um dos modelos mais práticos e bem aceitos é o da cultura de linhagens celulares imortalizadas.

A cultura de células se iniciou no começo do século XX, e se popularizou na sua segunda metade, quando se começou a estabelecer e padronizar linhagens celulares que pudessem ser utilizadas em diferentes laboratórios. Este modelo experimental não replica fielmente vários aspectos biológicos de células *in vivo*, como a expressão gênica, sinalização, morfologia, interação entre células, disponibilidade de nutrientes e hormônios etc. Porém, muitas conclusões válidas podem ser tiradas a partir de células em cultura, que é uma alternativa mais barata e mais rápida do que o uso de animais, como camundongos – além de ser favorecida por questões éticas.

Quando se extraem células de um tecido duro e as submetem a crescer numa garrafa, ou placa, algumas delas sobreviverão ao processo e aderem à placa. Neste caso, são denominadas células primárias. Nem todas as células estão aptas a proliferar *in vitro*, indefinidamente, devido à apoptose, que naturalmente ocorre no organismo vivo. Porém, há células com maior capacidade proliferativa que resistem maior tempo em cultura, mantendo características genotípicas e fenotípicas do tecido original. Alternativamente, podem ocorrer mutações que façam a célula escapar de mecanismos antiproliferativos. Este processo pode ser induzido em cultura – o que é chamado de transformação – por agentes como vírus, ou mesmo radiação ultravioleta, e a célula deixa de reter suas características originais. Quando isto ocorre *in vivo*, mesmo que espontaneamente, podem ocorrer doenças complexas, como o câncer (49).

O câncer é um conjunto de doenças caracterizado, principalmente, pelo desbalanço no controle da proliferação. Hanahan e Weinberg, em seus famosos artigos *Hallmarks of Cancer*, apontam uma série de características que levam as células a um fenótipo tumoral: resistir à morte celular, desregular os processos de geração de energia, sustentar a sinalização proliferativa, evitar supressores de crescimento, evitar a destruição pelo sistema imune, evitar a perda de telômeros,

gerar inflamação local – que é pró-tumoral, ativar a invasão/metástase, induzir a angiogênese e manter níveis elevados de instabilidade genômica e mutações (50). Células tumorais são mais propensas a sobreviver em cultura, além de serem um modelo atraente do ponto de vista clínico, dada a importância do câncer na saúde humana, e os esforços para se encontrar tratamentos mais eficazes. A partir dessas células, pode-se extrair lisados e estudar diversas características moleculares, como, por exemplo, a interação entre proteínas.

2.7 Purificação por afinidade e espectrometria de massas

Um dos métodos tradicionais de identificação de interação proteína-proteína é a purificação por afinidade seguida por Espectrometria de Massas. O primeiro passo é essencialmente uma co-precipitação e consiste no isolamento de possíveis parceiros de interação da proteína. Um dos métodos, chamado de *pull-down*, consiste em imobilizar a proteína de interesse – a isca – em uma resina, utilizando-se de sequências específicas, como a de polihistidina, que liga-se a resinas de níquel, ou a glutathione S-transferase (GST), uma proteína que se liga à glutathione, um pequeno composto orgânico que pode ser ligado a resinas. A proteína de interesse pode ser endógena, produzida após transfecção das células, ou exógena, produzida em algum organismo mais primitivo, como *E. coli*. Posteriormente, incubase um lisado celular para que os parceiros de interação se liguem à proteína de interesse, e o resto seja descartado.

Outra técnica é a co-imunoprecipitação, muito similar ao *pull-down*. A resina, no caso, puxa as proteínas de interesse por meio de anticorpos imobilizados, cujo antígeno é a proteína de interesse ou alguma sequência, como o FLAG. Como a proteína é geralmente endógena, a técnica prioriza interações raras e fortes, e as interações mais transientes dependerão do nível de expressão da proteína. Já o *pull-down* consegue captar mais interações, e interações transientes, devida à alta concentração de proteína recombinante na resina. Porém, abdica das interações fortes e estáveis, que provavelmente serão feitas pela proteína endógena.

O protocolo dessas técnicas pode ser modificado para incluir lavagens mais agressivas, a fim de eliminar contaminantes, mas às custas de se eliminar parceiros com interação mais fraca e proteínas menos abundantes. Também pode-se fazer dois *pull-downs* em seguida, no que se chama de *TAP*, *tandem affinity purification*

(purificação por afinidade em sequência), quando se quer purificar complexos proteicos altamente estáveis e refinados, mas, também, às custas de interações transientes (51).

Após a purificação da fração de interesse, seja uma banda separada por gel de SDS-PAGE ou mesmo tudo o que foi eluído da resina, a amostra é digerida em peptídeos menores e enviada para análise de Espectrometria de Massas para descobrir a identidade das proteínas isoladas. Em termos gerais, o equipamento gera espectros com a relação massa/carga dos peptídeos identificados, e a análise deste resultado permite a identificação do peptídeo, pois cada um deles possui um padrão específico de massa e fragmentação. A Figura 8 ilustra esse processo.

O espectrômetro pode ter várias configurações diferentes para a análise de misturas complexas, como no caso de vários peptídeos provindos de uma purificação por afinidade. Por exemplo, a separação pode se iniciar em cromatógrafo líquido (nano-LC), que provê alta sensibilidade, e posteriormente ocorrer ionização por eletrospray, a forma mais comum de se ionizar amostras líquidas. Ao entrar no espectrômetro, os peptídeos, à medida que vão eluindo do cromatógrafo, podem ser selecionados por diversas configurações instrumentais que os diferenciam com base na sua razão massa/carga. No caso, por exemplo, de um equipamento *quadrupole time-of-flight*, um filtro de quadrupolos focaliza os íons ao variar o campo elétrico entre quatro barras metálicas. Posteriormente, os íons chegam a uma câmara de colisão, onde reagem com gases inertes com alta energia, sendo fragmentadas em peptídeos menores. Por fim, estes peptídeos são acelerados por um campo elétrico de intensidade conhecida, fazendo com que todos os íons com a mesma carga atinjam energias cinéticas muito próximas. Portanto, para se diferenciara massa destes peptídeos, mede-se o tempo que cada íon demora para chegar ao detector, que é proporcional à energia cinética e à raiz quadrada da razão massa/carga.

Figura 8 – Esquemas gerais de espectrometria de massas para proteínas. (a) Após a coleta da amostra, as proteínas podem (ou não) serem separadas em géis de SDS-PAGE, seguido pela digestão enzimática das proteínas, dado que o equipamento consegue detectar peptídeos menores com maior sensibilidade. Após separação por cromatografia líquida e ionização, ocorre a coleta do primeiro espectro de massas (espectro MS), onde o computador gera uma lista prioritária de peptídeos a serem enviados para a câmara de colisão, onde são fragmentados em peptídeos ainda menores, e cujo espectro é lido (espectro MS/MS), possibilitando que se deduza a identidade das proteínas. (b) Esquema de separação por cromatografia líquida e ionização por eletrospray. (c) Esquema do espectrômetro usado para nossas análises, um quadrupolo *time-of-flight* (explicado no texto). Figura adaptada de Aebersold et al (52).

O detector e o computador geram, então, espectros dos íons fragmentados (52). Este espectro pode ser transformado em uma lista de picos (*peak list*) e analisado por plataformas como o MASCOT (Matrix Science), que efetua buscas chamadas de *Ion Search*. Por conta da precisão do equipamento, que consegue diferenciar na faixa de 0,1-0,25 Da, os íons conseguem ser atribuídos a peptídeos únicos. Após o preenchimento dos parâmetros da busca (e.g. a base de dados a ser buscada, a enzima utilizada para a digestão etc.), o programa busca uma correspondência entre os íons da lista enviada e as proteínas da base de dados, resultando em uma lista de proteínas com correspondências significativas com a sua lista de íons, além de parâmetros de confiabilidade de cada alvo (53).

Devido às limitações da técnica de purificação, é essencial que haja um bom planejamento de experimento para levar em conta controles negativos, porque é quase inevitável o isolamento de falsos positivos no *pull-down*. Para a comparação de amostras com controles negativos – contaminantes – há plataformas bem estabelecidas, como o CRAPome, que oferece o algoritmo SAINTExpress para a análise estatística dos *hits*. O modelo estatístico deste algoritmo postula que uma presa identificada numa amostra de purificação por afinidade pode ser um parceiro de interação real da proteína de interesse (isca), um ligante não específico ou um contaminante. Se for uma interação verdadeira, a presa deve ser observada com abundância suficientemente alta e em níveis maiores do que no controle negativo. De modo análogo, se for um falso positivo, a proteína não deve estar significativamente mais abundante nas amostras provenientes da isca do que nos controles. Assim, o SAINTExpress compara algum valor quantitativo das proteínas (e.g. número de correspondências) entre as amostras controle e experimentais para fornecer pontuações que avaliam a probabilidade de uma interação ser falsa ou não (54).

2.8 Relevância Biotecnológica

A indústria biofarmacêutica é um ramo da indústria farmacêutica que utiliza de moléculas biológicas, como açúcares, proteínas, ácidos nucleicos ou combinações complexas destas, ou mesmo células e tecidos para o tratamento ou prevenção de doenças. O mercado de biofármacos movimentou 228 bilhões de dólares em 2016, e o desenvolvimento, produção ou alteração de produtos já estabelecidos, a fim de melhorar o desempenho ou preço. Esta área é estratégica mesmo para empresas farmacêuticas grandes, que desenvolveram nos últimos anos seus próprios programas de pesquisa ou compraram pequenas empresas de biotecnologia (56). No Brasil, esta tendência também tem sido observada, com menor intensidade, como no caso de empresas como a Cristália e a Bionovis, que produzem anticorpos, proteínas de fusão e hormônios, por exemplo.

De acordo com revisão publicada por nosso grupo, há muitos avanços ocorrendo no desenvolvimento de inibidores farmacológicos de DUSPs como a DUSP3 (57), e tal feito certamente será aproveitado pela indústria para a

comercialização de fármacos e até mesmo biofármacos que tenham potência e especificidade contra estas fosfatases.

Portanto, a compreensão de mecanismos de sinalização, a correspondência da atividade de enzimas com distúrbios de saúde, e o desenvolvimento de biomoléculas ativadoras ou inibidoras destas vias regulatórias são pontos chaves para a geração de valor e impulsionamento da nossa indústria. Ainda mais levando em conta que as quinases têm sido historicamente mais pesquisadas em nível científico e tecnológico (58), há um espaço enorme para descoberta da ação e regulação das fosfatases, dado que elas são igualmente importantes na regulação de sistemas biológicos. Por sua influência em processos de sinalização, sobrevivência celular e resposta a estresse, a DUSP12 é uma ótima candidata a inibição clínica, mas, para isso, precisamos de uma compreensão profunda de suas funções e interações em diferentes contextos, incluindo a radiação, importante para a radioterapia.

3 OBJETIVOS

3.1 *Objetivo Geral*

- Identificação e validação de alvos de DUSP12, mediante (ou não) o efeito de estímulos genotóxicos e oxidativos.

3.2 *Objetivos Específicos*

- Caracterização da expressão e localização da DUSP12 nas linhagens celulares que escolhemos como modelo;
- Isolamento e identificação por espectrometria de massas de parceiros de interação de DUSP12 a partir de lisados nucleares, sob condições de estresse ou não;
- Análise de redes dos parceiros identificados, com enfoque funcional;
- Validação destas interações por técnicas como co-imunoprecipitação.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Linhagens Celulares

A linhagem MCF-7 (adenocarcinoma ductal mamário) proveio do nosso banco de células, e A549 (adenocarcinoma epitelial pulmonar) foi doação da Professora Daniela Bassères.

As células foram mantidas em atmosfera úmida, com 5 % de CO₂ a 37 °C. O cultivo de MCF-7 foi feito em DMEM (Gibco) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (Cultilab), ampicilina (25 mg/L, Sigma-Aldrich), sulfato de estreptomicina (100 mg/L, Sigma-Aldrich) e ciprofloxacina (1 µg/mL, Sigma-Aldrich). A A549 foi cultivada em RPMI (Gibco) suplementado com 10 % de soro fetal bovino e as mesmas concentrações de ampicilina, ciprofloxacina e estreptomicina.

A A549 foi subcultivada aproximadamente 3 vezes por semana, quando atingia confluência alta na placa. MCF-7 foi subcultivadas aproximadamente 2 vezes por semana, pois suas colônias não se espalhavam muito e precisavam ser repicadas para aumentar a confluência. O método utilizado para todas elas era o de tripsinização (Sigma-Aldrich). As células foram congeladas utilizando 5 % de DMSO (Synth) a -80 °C, e descongeladas utilizando centrifugação para descartar o DMSO.

4.2 Imunofluorescência e Microscopia Confocal

Após os tratamentos das células plaqueadas sobre lamínulas, lavamo-las por 2 vezes com tampão PBS (8 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 1,44 g/L Na₂HPO₄, 0,24 g/L KH₂PO₄, 0,1 g/L CaCl₂, pH 7,4) à T.A., por 2'. Em seguida, fixamos com uma solução de 3 % paraformaldeído e 2 % sacarose em PBS por 10' à T.A, seguido por mais duas lavagens com PBS por 2'.

Efetuamos a permeabilização subsequentemente, com uma solução de 0,5 % TritonX-100, 6,85 % sacarose e 3 mM MgCl₂ em PBS, em gelo, por 5'. Efetuamos mais duas lavagens com PBS por 2' à T.A. antes de incubar a lamínula com uma solução bloqueadora contendo 3 % de BSA (Sigma-Aldrich) e 10 % de SFB (Cultilab) em PBS por 30' à T.A. em uma câmara úmida.

Lavamos as lamínulas por mais duas vezes por 2' à T.A. e incubamos com um mistura de anticorpos. Diluímos os anticorpos primários em 1:500 em uma

solução de 3 % BSA em PBS, e esta incubação foi feita por 2 h à T.A. na câmara úmida. Os anticorpos utilizados foram DUSP12 (Santa Cruz, sc-390760), TCOF1 (Santa Cruz, sc-374536), CENPJ (Santa Cruz, sc-166113) e HP1BP3 (Invitrogen, PA5-44637). Também utilizamos um soro de coelho contendo anticorpos policlonais anti-DUSP12, doado pelo laboratório do Prof. Tomas Mustelin (Burnham Institute, La Jolla, CA, EUA).

Enfim, lavamos por mais três vezes com PBS, à T.A., por 5', e incubamos as lamínulas por mais 1 h à T.A., na câmara úmida, com a mistura de anticorpos secundários, feito na solução de 3 % BSA em PBS e diluindo-os em 1:500. Utilizamos anticorpos anti-mouse (ThermoFisher, AlexaFluor 488) e anti-rabbit (ThermoFisher, AlexaFluor555). Após mais três lavagens com PBS por 5' à T.A., 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, e o no microscópio Olympus FluoView™ 1000 para as imagens de microscopia confocal, no aumento de 40x.

4.3 Estímulos genotóxicos e oxidantes

No caso da radiação UVB, utilizamos uma fonte com comprimento de onda constante (302 nm), dosada com o dosímetro VLX 3W (VilberLourmat), aplicando sobre as células 80 J/m² e coletando após meia hora.

Para a radiação gama, utilizamos a fonte de Cobalto-60 Gammacell 220 do IPEN, submetendo as células a uma dose de 15 Gy e coletando após meia hora.

No caso da bleomicina (Sigma-Aldrich), suplementamos o meio de cultura das células com uma concentração de 3 µg/mL da droga, cujo estoque estava diluído em solução salina (0,9 % NaCl) e as mantivemos na estufa por 2 h, seguido da coleta.

4.4 Fracionamento nuclear

O nosso protocolo de fracionamento nuclear foi adaptado de Mambetsariev et al (59). Partindo de células plaqueadas e tratadas em placas de 150 mm, coletamos

por tripsinização seguida de centrifugação (2', 10.000 x g), lavando o pellet com PBSA para remoção do excesso de tripsina.

Após descarte do PBSA, cuidadosamente ressuspendemos o pellet em 400 µL de um tampão hipotônico (10 mM HEPES pH 7,9, 10 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA mais inibidores de proteases e antioxidantes), incubando por 15' no gelo para que as células intumescam. Adicionamos, então, concentração final de 0,075 % de IGEPAL (Nonidet™ P-40) e vortexamos por 15 segundos, deste modo rompendo a membrana externa das células. Centrifugamos por 1' a 20.000 x g, a 4 °C, e o sobrenadante corresponde à fração citoplasmática, que pode ser descartada.

Ressuspendemos o pellet cuidadosamente em 400 µL de tampão hipotônico suplementado com 0,1 % de Triton X-100 a fim de solubilizar as frações lipídicas, rotacionando o microtubo a 4 °C de 15 a 30'. Prosseguimos com uma centrifugação de 1' a 20.000 x g a 4 °C e descartamos o sobrenadante.

Por fim, ressuspendemos este pellet em 100 µL de um tampão hipertônico (20 mM HEPES pH 7,9, 420 mM mais inibidores de proteases e antioxidantes), rotacionando o microtubo a 4 °C durante 15'. Centrifugamos por 5' a 20.000 x g a 4 °C, e o sobrenadante corresponde à fração nuclear.

A fim de prover boas condições de armazenamento para o lisado nuclear, diluímos esta fração em 200 µL de um tampão denominado "sem sal" (20 mM HEPES pH 7,9, 15 % glicerol). Deste modo, abaixamos a salinidade do meio e, com o glicerol, evitamos a precipitação de proteínas mediante o congelamento. Podemos, portanto, armazenar a -20 °C. Estas condições também ajudam nos passos seguintes de *pull-down*, já que a concentração final de NaCl é aquela recomendada pelo fabricante da resina, e a concentração de glicerol pode prevenir interações inespecíficas entre as proteínas (60).

Para este protocolo de fracionamento, utilizamos as seguintes concentrações de suplementos: 1mM DTT, 1mM PMSF, 2 µg/mL leupeptina, 2 µg/mL pepstatina e 2 µg/mL aprotinina.

4.5 Lisado Celular Total

Para a obtenção de lisados celulares totais, as células tratadas foram lavadas com PBS sobre gelo, e incubadas no gelo com tampão RIPA por 10' (500 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 50 mM Tris pH 7,2, 0,5 % Triton X-100, 0,5 % deoxicolato de sódio, 0,1 % SDS). Para uma placa de 55 cm², aplicamos 800 µL de tampão. Após raspamos a placa com rodinho e coletamos o líquido em um microtubo, seguimos com a centrifugação a 17 kG, 4 °C, por 10', e o sobrenadante foi separado e diluído com um tampão de menor salinidade, em proporção 1:1 (25 mM Tris pH 7,4, 1 % NP-40, 10 % glicerol). Ambos tampões foram suplementados com inibidores de fosfatases e proteases (1mM PMSF, 1mM NaF, 1mM Na₃VO₄, 2 µg/mL leupeptina, 2 µg/mL pepstatina e 2 µg/mL aprotinina. Os lisados destinados a ensaios de *pull-down* também foram suplementados com 1mM DTT). Os lisados foram armazenados a -20 °C.

4.6 PCR

Efetuamos o PCR em volume total de 25 µL utilizando a Taq Polimerase (Thermo Fisher Scientific). Utilizamos o tampão fornecido em concentração 1X, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada um dos dNTPs, 0,5 µM de dois primers, 1,0 µL de plasmídeo e 1 U de Taq Polimerase. As sequências e a descrição de cada primer constam na Tabela 1. O PCR foi efetuado com um primeiro passo de 3' a 94 °C, seguido por 30 ciclos de 45" a 94 °C, 30" a 54,3 °C e 1' a 72 °C. Um passo final de extensão a 72 °C finalizou o PCR, cujo produto foi verificado em gel de agarose (1,5 %).

Primer	Sequência	Descrição
DUSP12 (Forward)	5' - CAG CGC CAG AGT CAG - 3'	Início da DUSP12
DUSP12 (Reverse)	5' - TGT GAT CCC AAA ACA GGC AAT - 3'	Fim da DUSP12
N-terminal (Reverse)	5' - GGC TGA GTA GGT CCG TCT CG - 3'	Fim do domínio catalítico
C-terminal (Forward)	5' - CAG GGA GGC AAG CTC AAT GT - 3'	Início do domínio dedo-de-zinco
GST (Forward)	5' - TGT GCA ACC CAC TCG ACT TC - 3'	Sequência de GST

Tabela 1 – Sequências dos primers utilizados para verificar inserto de DUSP12.

4.7 Produção de proteína recombinante

Dispúnhamos de diversas construções de DUSP12 em plasmídeos pGEX, que possuem sequências de GST, sendo elas a proteína selvagem (WT) e um mutante cataliticamente inativo (C115S, C/S), gentilmente cedidas pelo Prof. Panayiotis Vacratsis, da Universidade de Windsor, Canadá, e mutantes com o domínio catalítico deletado (DUSP12 C-terminal) e com o domínio de dedo-de-zinco deletado (DUSP12 N-terminal), do banco de plasmídeos do Prof. Thomas Mustelin (Burnham Institute).

Transformamos *E. coli* da cepa BL21(DE3) com estes plasmídeos e as crescemos em 0,5 L de meio LB suplementado com ampicilina (100 µg/mL) e ZnCl₂ (10 µM) até a obtenção de uma O.D. de aproximadamente 0,6, quando adicionamos 1mM de IPTG ao meio para induzir a expressão da proteína recombinante. Coletamos alíquotas antes da indução e após determinados tempos para verificar, em gel de SDS-PAGE, a produção da proteína. Concluímos que 3 h seria um tempo adequado para a coleta de células.

Após a coleta, centrifugamos o meio por 9.800 x g por 10' a 4 °C e ressuspendemos o pellet em 5 mL de tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 10 µM ZnCl₂, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 10 µg/mL aprotinina, 10 µg/mL leupeptina). Posteriormente, utilizando o sonicador SONICS Vibra-Cell VC-505 com a caneta 630-0422 e amplitude de 60 %, lisamos as células com 10 pulsos de 1', intercalados por pausas de 1', em gelo. Centrifugamos o lisado por 30' a 4 °C sob 25.000 x g e ao sobrenadante adicionamos uma concentração final de 10 % de glicerol para congelamento a -80 °C.

4.8 Ensaio de atividade fosfatásica

Efetuamos um simples ensaio de atividade fosfatásica com OMFP, um fosfato de arila comumente usado na literatura que, mediante desfosforilação, fluoresce (61). Purificamos as nossas construções segundo o protocolo de *pull-down*, mencionado abaixo: incubando o lisado bacteriano com Glutathione Sepharose 4B, efetuando as lavagens e clivando entre a sequência de GST e a proteína de interesse com trombina.

Nosso ensaio foi feito em placas de 96 poços de fundo preto, onde adicionamos 1 µg de proteína recombinante e, para um volume final de 100 µL, adicionamos uma concentração final de 150 µM de OMFP, tudo em tampão de *pull-down* para emular as condições da purificação por afinidade. Medimos a reação por fluorimetria durante uma hora, coletando dados a cada um minuto, com excitação de 485 nm e leitura de emissão em 525 nm. Para montarmos a tabela, nós subtraímos os valores de emissão do branco.

4.9 Pull-Down (Purificação por Afinidade)

Para a preparação da resina contendo a DUSP12 recombinante, os chamados "*beads*", nós separamos 25 µL de pasta de resina a 80 % (com 20 % de etanol) para cada amostra, o que corresponde a 20 µL de leite cromatográfico. Nós efetuamos três lavagens com 5 volumes (100 µL) de tampão de *pull-down* (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 10 % glicerol, pH 7,3), seguidas por centrifugações de 2' sob 1.750 x g.

Portanto, seguindo a estimativa grosseira de 10 % m/m de proteína recombinante para o lisado bacteriano, incubamos 200 µg de lisado bacteriano da isca respectiva (DUSP12 selvagem, cataliticamente inativa, ou controle negativo – GST) por 1 h à T.A. sob rotação, completando o volume final com tampão de *pull-down* para 100 µL mais 20 µL de leite cromatográfico. Apesar de a concentração de iscas não ser a mesma entre as diferentes iscas, devido à aproximação grosseira, ela é próxima, e deve ser aproximadamente a mesma para as amostras da mesma isca.

Centrifugamos por 2' sob 1.750 x g, seguido de 1 lavagem de 15', e 2 lavagens de 5' à T.A. com tampão de *pull-down*, sob rotação. Posteriormente, incubamos com 200 µg de lisado nuclear das células A549 e MCF-7 tratadas sob diversas condições (Tabela 2), ajustando o volume final com tampão de *pull-down* de forma que todas as amostras tivessem o mesmo – aproximadamente 300 µL. Esta incubação foi feita sob rotação a 4 °C por 2 h.

Tratamento	Célula	Isclas (réplicas)
Não-tratadas	A549	WT (4), C/S (4), GST (2)
Não-tratadas	MCF-7	WT (3), C/S (3), GST (2)
Radiação UVB	A549	WT (3), C/S (2), GST (3)
Radiação UVB	MCF-7	WT (3), C/S (3), GST (2)
Radiação Gama	A549	WT (3), C/S (3), GST (2)
Radiação Gama	MCF-7	WT (3), C/S (3), GST (2)
Bleomicina	MCF-7	WT (3), C/S (3), GST (2)

Tabela 2 – Lisados submetidos a purificação por afinidade.

Posteriormente, fizemos 1 lavagem por 5' sob rotação a 4 °C com tampão de *pull-down*, seguida por outras duas lavagens, sempre centrifugando os *beads* por 2' sob 1.750 x g. Incubamos os beads de um dia para o outro com 1,6 U de trombina (Sigma-Aldrich) por amostra sob rotação à T.A. por 4 h, para clivar a DUSP12 e a sequência de GST. O volume de reação foi ajustado para 20 µL de solução de trombina em tampão de *pull-down* mais 20 µL de leito cromatográfico. Então coletamos o sobrenadante em três passos, adicionando 30 µL de tampão de *pull-down* seguido de centrifugação, para, no fim, ter 110 µL de purificado, que foi congelado a -20 °C.

Na fase de validação, efetuamos *pull-down* utilizando 500 µg de lisado total e 50 µg de proteína recombinante, como descrito acima. Testamos, a lavagem com os tampões descritos na Tabela 3, que continham diferentes proporções de tampões RIPA e Pierce (25 mM Tris HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 5 % glicerol). Testamos, também o bloqueio da resina e, além da eluição por trombina, também fizemos testes com eluição com tampão de amostra de eletroforese.

Tampão	Proporção Pierce	Proporção RIPA	Concentração NaCl (mM)
Pierce	1	0	150
1 RP	5	2	250
2 RP	8	5	285
3 RP	1	1	325

Tabela 3 – Concentrações dos diferentes tampões de lavagem utilizados.

Para o bloqueio, após a incubação do lisado bacteriano, incubamos a resina com 5 % de leite no tampão 1RP, por uma hora, seguido por uma lavagem, antes da incubação com o lisado total celular.

4.10 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) / Western Blot

A partir de uma solução de acrilamida:bis-acrilamida 29:1 (30 % m/m), fizemos géis de poliacrilamida. Para a preparação dos géis de tris-glicina, o gel de separação foi feito com a concentração desejada de acrilamida, 375 μ M Tris-HCl pH 8,8, 0,1 % SDS e polimerizado com 0,05 % de TEMED e 0,05 % de APS. O gel de empacotamento foi feito com 5 % de acrilamida, 250 μ M de Tris-HCl pH 6,8, 0,1 % de SDS e polimerizado com 0,1 % de TEMED e 0,05 % de APS.

As amostras foram diluídas em um tampão de amostra Laemmli (concentração final 60 mM Tris-HCl pH 6,8, 2 % SDS, 10 % glicerol, 5 % β -mercaptoetanol, 0,01 % azul de bromofenol) e foram fervidas a 100 °C durante 10'.

O tampão de corrida continha 3,02 g/L Tris base, 18,77 g/L glicina e 1 g/L SDS. As amostras foram aplicadas no gel e foi feita a eletroforese sob voltagem constante de 100 V até que o azul de bromofenol saísse do gel.

Para a transferência (Western Blot) para membranas de nitrocelulose (Millipore), utilizamos um tampão de transferência contendo 25 mM Tris Base, 200 mM glicina e 20 % metanol. No caso da transferência úmida, utilizamos uma amperagem constante de 350 mA durante 1,5 h. No caso da transferência semi-úmida, utilizamos uma amperagem constante de 0,8 mA/cm² de gel durante 2 h.

Por conta de melhor eficiência na transferência de proteínas pesadas, também fizemos géis de tris-acetato com gradiente de concentração de acrilamida (62). Para o gel de separação, fizemos três soluções separadas, uma com concentração final de 3 % de acrilamida, outra com concentração de 4,5 %, e outra com concentração de 12 %. As soluções continham 200 μ M Tris-acetato pH 7.0, e foram polimerizadas com 0,06 % de TEMED e 0,02 % de APS. O gradiente foi feito, grosseiramente, com um pipetador automático, puxando 4 mL da solução de 4,5 % e, depois, 4 mL da solução de 12 %. Puxaram-se 2 bolhas de ar para ocorrer uma leve mistura das soluções e, então, o volume foi despejado vagarosamente na fôrma. Para o gel de empacotamento, utilizamos a solução de 3 % de acrilamida.

O tampão de amostra para este gel continha, na concentração final, 250 μ M Tris-HCl pH 8,5, 2 % SDS, 0,015 % EDTA, 10 % glicerol, 100 mM DTT, 0,02 % Coomassie Brilliant Blue G e 0,006 % de vermelho de fenol. As amostras foram fervidas a 70 °C por 10 min.

A eletroforese foi feita com um tampão de corrida 8,95 g/L tricina, 6,06 g/L Tris base, 1 g/L SDS e 0,25 g/L bissulfito de sódio, sob voltagem constante de 130 V. Fez-se, então, transferência úmida para membrana de nitrocelulose, utilizando tampão de transferência com 4,08 g/L bicina, 5,24 g/L Bis-Tris, 0,3 g/L EDTA, 0,25 g/L bissulfito de sódio e 20 % metanol. Utilizamos amperagem constante de 25 V por 18 h.

4.11 Immunoblot

Para as transferências feitas a partir de gel de tris-glicina, nós bloqueamos a membrana com uma solução de 5 % de leite em pó desnatado em TBS-T (0,2 % Tween, 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl) por uma hora a T.A. Incubamos os anticorpos primários diluídos 1:1000 em TBS-T *overnight* a 4 °C (exceto no caso do GAPDH – 2 h a T.A.) Os anticorpos secundários (LI-COR Biosciences), diluídos 1:15000 em TBS-T, foram incubados por uma hora a T.A. Estes passos foram intercalados por três lavagens de 5' com TBS-T.

Utilizamos os anticorpos DUSP12 (Santa Cruz, sc-390760), TCOF1 (Santa Cruz, sc-374536), CENPJ (Santa Cruz, sc-166113), HP1BP3 (Invitrogen, PA5-44637), Histona H1 (Santa Cruz, sc-34464), APE1 (Cell Signaling, #4128), GAPDH (Cell Signaling, 14C10).

Para as transferências feitas a partir de gel de tris-acetato, bloqueamos a membrana com 3 % de leite em pó desnatado em TBS (20 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl) por 30'. As incubações com anticorpos foram idênticas às citadas acima, intercaladas por uma lavagem de 5' com água destilada, e duas lavagens com TBS-T, a primeira de 3', e a segunda de 5'. O resultado foi lido no equipamento Odyssey Classic (LI-COR) utilizando o comprimento de onda apropriado (700 ou 800 nm).

4.12 Coloração por prata

Após a corrida, incubamos o gel (tris-glicina) na solução I (30 % etanol, 10 % ácido acético em água deionizada) por 2 h, seguido por lavagem com água destilada. Posteriormente, incubamos o gel na solução II (30 % etanol, 0,5 % glutaraldeído, 68 g/L acetato de sódio, 2 g/L tiosulfato de sódio) por 90' para sensibilizá-lo, seguido por três lavagens com água destilada por 10'. Na sequência, incubamos na solução III (1 g/L nitrato de prata, 0,02 % formaldeído) por 30', lavando com água destilada para retirar o excesso de prata. Revelamos o gel na solução IV (24 g/L carbonato de sódio, 0,01 % formaldeído) até as bandas mais fracas aparecerem, e posteriormente paramos a reação na solução V (18,6 g/L EDTA).

4.13 Processamento das amostras para espectrometria de massas

Adicionamos ao purificado volume equivalente de hidrocloreto de guanidina 8 M para desnaturar as proteínas. Prosseguimos com a alquilação de cisteínas adicionando DTT em concentração final de 5 mM, e incubamos por 1 h a 65 °C. Então adicionamos ácido iodoacético em concentração final de 14 mM, incubando por 30' à T.A., protegido da luz. Por fim, adicionamos concentração adicional de 30 mM de DTT, incubando à T.A. por aproximadamente 45'.

Prosseguimos com a precipitação das proteínas para remoção de reagentes. Adicionamos 8 volumes de acetona e 1 volume de metanol, ambos gelados, e após homogeneização incubamos por 3 h a -80 °C. Posteriormente, centrifugamos por 10' a 4 °C sob 14.000 x g. Lavamos o pellet com 1 volume de metanol gelado, e repetimos a centrifugação.

Ressolubilizamos o pellet com 10 µL de NaOH 100 mM. Adicionamos 40 µL de água deionizada para auxiliar na solubilização, seguido de mais 40 µL e, por fim, 10 µL de tampão HEPES 500 mM pH 8,0. Quantificamos esta solução pelo método de Bradford. Adicionamos tripsina (Sequencing Grade Modified Trypsin, Promega) numa proporção de 1:50 de enzima:substrato. Incubamos *overnight* a 37 °C e interrompemos a reação com TFA, concentração final de 0,4 %.

Prosseguimos com a dessalinização dos peptídeos em StageTips com o auxílio da mestrandia Carolina Kiski do LETA, Instituto Butantan. O StageTip,

gentilmente cedido pelo LETA, é montado em uma ponteira de 1,0 mL, adicionando-se um *frit* de polipropileno e três camadas da membrana SDB-XC (3M) (o que é suficiente para 300 µg de proteína). Condicionamos a membrana com 1 mL de solução B (80 % acetonitrila, 0,5 % TFA em água deionizada), seguido de centrifugação. Posteriormente, condicionamos a membrana com 1 mL de solução A (4 % acetonitrila, 0,5 % TFA em água), seguido de centrifugação. Adicionamos as amostras aos StageTips, com volume ajustado para 500 µL com solução A, e centrifugamos. Efetuamos uma lavagem com 1,0 mL de solução A, seguida de centrifugação. Por fim, eluímos os peptídeos com 1,0 mL de solução B. Então, liofilizamos as amostras e as mantivemos em -20 °C.

4.14 Espectrometria de massas

As amostras foram processadas pela Central Analítica do IQUSP. Aproximadamente 1 µg de peptídeos foram injetados no cromatógrafo líquido, de acordo com a nossa quantificação pré-dessalinização. O trapping foi feito na coluna nanoAcquity UPLC® 2G-V/MTrap 5µm Symmetry® C18 180 µm x 20 mm num tempo de 3' e um fluxo de 7 µL/min. A corrida foi feita na coluna nanoAcquity UPLC® 1,7 µm BEH130 100 µm x 100 mm num fluxo de 0,3 µL/min, e os peptídeos foram eluídos num gradiente de água/acetonitrila com 0,1 % ácido fórmico. Os peptídeos foram ionizados pela fonte CaptiveSpray no equipamento MAXIS 3G (BrukerDaltonics), num fluxo de dry gas de 3 L/min, temperatura de 150 °C e alta voltagem de 2 kV.

4.15 Filtro estatístico das proteínas

Com os resultados da Espectrometria de Massas em mãos, nós salvamos o *MS/MS Ion Search* fornecido pelo MASCOT (53) para cada amostra, utilizando como base de dados o SwissProt (atualizado em julho de 2016) e *Homo sapiens* como a taxonomia desejada. Os parâmetros escolhidos foram 1 clivagem perdida como máximo aceitável, valores de massa monoisotópicos, tolerância de massa de peptídeos de 20 ppm, cargas dos peptídeos 2+, 3+ ou 4+, tolerância de massa de fragmento de 0,6 Da. O limite de p-valor significativo foi escolhido em cada caso automaticamente de forma a ajustar a FDR para 1 %.

Também efetuamos análises no MaxQuant, agrupando os resultados de acordo com a célula e o tratamento (e.g. lisado de A549 tratada com Gama constitui

um grupo). A FDR foi ajustada para 1 %, o tamanho mínimo dos peptídeos foi de 7 aminoácidos, a tolerância de massa foi de 40 ppm. Foi feita comparação entre as corridas diferentes, e a janela de comparação foi de 0,7 min, e a janela de alinhamento foi de 20 min.

Tabulamos os dados no formato aceito pelo CRAPome (63), utilizando uma coluna com o nome da isca, outra coluna com o nome de amostra, a terceira com o código da proteína e, por último, o dado quantitativo relevante. Os três parâmetros que utilizamos foram, do MaxQuant, a intensidade (*Extracted Ion Current*) somada atribuída a cada proteína (*Intensity*), e a intensidade LFQ (*Label-free Quantification*), que utiliza um algoritmo mais complexo para fazer uma comparação mais acurada das quantidades identificadas (64) e, do MASCOT, o número de identificações significativas de peptídeos (*significant matches*) de cada análise. No caso do parâmetro da intensidade, os valores foram normalizados de acordo com a intensidade total identificada em cada amostra. No caso das identificações de peptídeos, fizemos uma normalização referente ao número de identificações da trombina a fim de diminuir divergências decorrentes da massa de proteína injetada, afinal não se quantificou de novo após a dessalinização. Os valores de identificações de trombina estavam numa faixa próxima, o maior não ultrapassando o triplo do menor.

Submetemos estes arquivos, referentes às células A549 e MCF-7 à plataforma, e solicitamos análises de SAINTExpress (54), fazendo várias comparações cruzadas envolvendo amostras com iscas de DUSP12 e os controles negativos (i.e. isca de GST). Continuamos agrupando as amostras segundo o lisado celular utilizado, e utilizamos os parâmetros padrão para as pontuações.

Fizemos duas análises paralelas. Na primeira, mantivemos proteínas que aparecessem no controle negativo, e filtramos de modo a selecionar apenas aquelas que fossem detectadas em intensidade múltiplas vezes maior nas amostras. Como parâmetro, utilizamos o *Secondary Score (FC_B)* que compara os fatores de multiplicação de cada amostra em relação ao controle em uma média geométrica – levando em conta os dois maiores valores e excluindo-se o menor. Assim, permitimos proteínas que apareçam em mais de uma amostra. Como corte destes

valores, utilizamos 27 para os *matches* dos peptídeos, e 9 para a intensidade e 3 para o LFQ, seguindo uma ordem de robustez e confiabilidade dos parâmetros.

Na segunda análise, mantivemos as proteínas que tivessem sido identificadas apenas nas iscas de DUSP12 (no mínimo 2 réplicas), excluindo aquelas que aparecessem no controle de GST. Com estes dois *sets* de dados, fizemos múltiplas uniões e intersecções comparando as diferentes condições experimentais e os diferentes parâmetros de avaliação (i.e. *matches*, intensidade no cromatograma e LFQ). Utilizamos duas ferramentas online para combinar os dados, fazendo diagramas de Venn numa plataforma da Universidade de Ghent (65) e analisando intersecções entre as listas em uma plataforma da MolBioTools (66). Além disso, efetuamos uma filtragem para selecionar proteínas que já foram anotadas como nucleares (código de ontologia GO:0005634), além de checagem adicional no site GeneCards (67). Aceitamos proteínas com pontuação de localização nuclear maior ou igual a 2.

4.16 Análise funcional das proteínas identificadas

Processamos diferentes grupos de proteínas nas plataformas MSigDb (68) e PANTHER (69) a fim de identificar a super-representação de vias metabólicas, e também a localização intracelular destas, a fim de avaliar se nosso fracionamento celular realmente enriqueceu as proteínas nucleares.

Processamos os dados também no Cytoscape (70) utilizando o plugin cytoHubba (71) para analisar as redes e verificar parâmetros de centralidade, a fim de identificar os hits mais importantes de acordo com dados da literatura sobre interações proteína-proteína. Importamos a rede a partir das bases de dados IntAct e MINT usando a lista de entrada com as proteínas em questão.

Utilizamos o parâmetro MCC (Maximal Clique Centrality), indicado como o mais eficiente na publicação do próprio plugin, para verificar centralidade, escolhendo os nós mais importantes da rede e sua primeira camada de interação, de forma a manter aproximadamente 20 % do número total de nós. Na maioria dos casos, isto significou em torno de 15 nós principais.

A partir da rede resultante, identificamos os 5 nós principais que não foram identificados na nossa análise. Prosseguimos extraindo as proteínas da lista de

entrada – incluindo proteínas de outras espécies, e efetuamos outra análise de centralidade, puxando as 20 proteínas mais importantes, e identificamos as 10 proteínas mais centrais da lista de entrada.

Também analisamos as redes com o plugin MCODE (72) para a identificação de complexos moleculares. Utilizamos as configurações padrão do plugin, analisando a rede inicial a partir das proteínas da lista de entrada. Escolhemos os 3 complexos que continham quantidades interessantes de proteínas presentes na lista de entrada (e.g. ignoramos complexos com proteínas de outras espécies).

4.17 Co-Imunoprecipitação

A partir de 500 µg de lisado total, incubamos por 1 h, 4 °C, sob agitação, com 15 µL da resina Agarose A/G Plus (Santa Cruz Biotech), como etapa de *pre-cleaning*. Centrifugamos por 5min, 1 kG, e separamos a resina como controle negativo. Prosseguimos incubando o lisado por 2 h, 4 °C, sob agitação, com 2 µg de anticorpo, posteriormente adicionando 15 µL de resina para incubação *overnight*. No dia seguinte, lavamos a resina três vezes com diferentes tampões que variavam a proporção de mistura de RIPA e Pierce (Tabela 3).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do modelo de estudo

Buscamos linhagens celulares tumorais que expressassem DUSP12 e, de acordo com o The Human Protein Atlas (73), MCF-7, A549 apresentavam os critérios desejados de expressão de DUSP12. Além disso, dada a relevância clínica destes tipos de câncer, julgamos serem boas escolhas para verificarmos os alvos de interação dessa fosfatase. Antes de prosseguirmos com os experimentos, verificamos a presença de DUSP12 nos lisados por Western Blot, obtendo resultados positivos para as duas linhagens, como também ilustrado na Figura 9.

Efetuamos testes de imunofluorescência sob diversas condições de tratamento, variando dose e tempo de coleta após a exposição ao dano citotóxico (UV e Gama), como ilustrado na Figura 9. Em todos os casos, observamos DUSP12 localizada como já sido havia descrito na literatura: predominantemente nuclear, mas também dispersa no citoplasma, às vezes concentrada na região perinuclear. Este fato, observado sob todos os tratamentos, reforçou a nossa opção por investigar alvos nucleares de DUSP12.

A fim de verificar a efetividade do nosso protocolo de extração nuclear, nós efetuamos ensaio de Western Blot com as diferentes frações do protocolo: a fração citoplasmática, a lavagem intermediária e a fração nuclear. Utilizamos anticorpos anti-DUSP12 para verificar em que frações ela era extraída, bem como o marcador nuclear Histona H1 e o marcador citoplasmático GAPDH. Aplicamos 50 µg de proteína em cada poço, e fizemos o experimento em duplicata.

Conforme vemos na Figura 10, a DUSP12 é encontrada na fração nuclear e em diferentes intensidades na fração citoplasmática, dependendo da linhagem celular. O GAPDH é encontrado nas frações citoplasmáticas, com algum resíduo na fração nuclear. A Histona H1, por sua vez, é encontrada na fração nuclear, indicando que nosso fracionamento está sendo eficiente em enriquecer proteínas nucleares.

Figura 9 – Imunofluorescência para verificação de localização celular de DUSP12. Do canto superior esquerdo, em sentido horário: Na coluna da esquerda, DUSP12 (verde), e, à direita, superposição com o DAPI (azul). (a) A549, não tratada. (b) A549, tratada com 15 Gy de radiação gama, após 30'. (c) MCF-7, não tratada. (d) MCF-7, tratada com 15 Gy de radiação gama, após 30'.

Figura 10 – Western Blot das frações do protocolo de extração nuclear. Os poços “C” correspondem às frações citoplasmáticas, “I” às frações intermediárias (lavagem com Triton), e “N” corresponde às frações nucleares.

5.2 Produção de proteína recombinante

Fizemos o ensaio de PCR com os plasmídeos, utilizando os primers da Tabela 1, e o resultado indicou a presença do inserto e os tamanhos com migração eletroforética adequada. O tamanho esperado para o inserto da proteína selvagem (Figura 11, a) era de 960 pb, para a proteína truncada N-terminal (b), aproximadamente 950 bp. Já para a proteína truncada C-terminal (c), 232 bp. No caso, os primers utilizados para a proteína truncada N-terminal incluíram a sequência de GST, justificando o aumento no tamanho do amplicon. Essas construções truncadas foram utilizadas nos ensaios de atividade fosfatásica.

Após a produção de proteína em *E. coli*, purificamos com resina de glutathione-sepharose e corremos em um gel de poliácridamida para verificar a presença de bandas nas alturas corretas, o que podemos observar na Figura 12. Nosso plasmídeo pGEX vazio, quando induzido, rendeu uma banda na posição equivalente a 20 kDa. A DUSP12 tem massa em torno de 38 kDa, portanto a construção GST + DUSP12 (o segundo bloco da Figura 12) tem massa em torno de 60 kDa. Já as construções truncadas, em torno de 40 kDa. Apesar de observarmos uma indução fraca da construção N-terminal, todas as proteínas foram expressas. Posteriormente, obtivemos o plasmídeo com a DUSP12 cataliticamente inativa, cuja expressão pudemos conferir em outros experimentos (não mostrados), como, por exemplo, quando fizemos a estimativa da concentração da isca nos *beads* utilizando curva de

BSA em gel de poliacrilamida, a partir do qual pudemos estimar um rendimento de em torno de 10 % de proteína recombinante por proteína total no lisado, segundo a intensidade da coloração por Coomassie.

Figura 11 – Gel de agarose com produtos de PCR para verificação de inserto de DUSP12. (a) Proteína selvagem. (b) Proteína truncada N-terminal. Amplicon inclui a sequência de GST. (c) Proteína truncada C-terminal.

A fim de verificar se nossas construções de DUSP12 tinham – ou não – atividade catalítica, efetuamos um ensaio de atividade fosfatásica. Pudemos comparar as atividades das nossas construções, utilizando VHR (DUSP3, 500 µg) como controle positivo. Todas elas exibiram atividade fosfatásica, exceto o domínio de dedo-de-zinco sozinho e a DUSP12 cataliticamente inativa (Figura 13). Como apenas a parte N-terminal da DUSP12 exibe atividade catalítica, a construção truncada C-terminal não gerou sinal de fluorescência a partir da desfosforilação de OMFP, bem como o mutante C/S. As outras construções estavam ativas, e com atividade muito similar.

No caso, também testamos uma mistura entre os domínios C- e N-terminal, a fim de verificar se ocorre algum aumento de atividade em relação ao domínio N-terminal isoladamente. Porém, bem como em relação à DUSP12 selvagem, as diferenças de atividade se deram apenas em função das diferenças molares – foi aplicada a mesma massa de cada proteína. Portanto, o domínio N-terminal isolado apresenta atividade maior, pois se encontra em maior concentração.

Figura 12 – Gel de poliácridamida com as proteínas recombinantes purificadas em resina de glutationa-sepharose. A entrada corresponde ao lisado bacteriano que foi aplicado à resina. A saída corresponde ao lisado após incubação com a resina, e o eluato são três frações sequenciais eluídas da resina.

5.3 Purificação por afinidade

Como nossas proteínas recombinantes possuem sequências de GST, é possível sua purificação por afinidade em resinas contendo glutathione, no nosso caso a Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare Life Sciences). Por consequência, nossa abordagem para a obtenção dos alvos de DUSP12 é a co-precipitação de parceiros.

Para avaliar nosso protocolo de purificação por afinidade, fizemos testes referentes à clivagem por trombina e à eluição da resina. A fim de detectar quantidades diminutas de proteína no gel de SDS-PAGE, nós fazemos coloração

utilizando nitrato de prata. Nosso primeiro teste comparativo com gel de SDS-PAGE com coloração por prata indicou que a trombina, de fato, consegue clivar nossa construção, também demonstrando diferenças no padrão de pesca entre o lisado citoplasmático e nuclear de A549 (Figura 14).

Figura 13 – Atividade de DUSP12 sobre OMFP. Excitação a 485 nm, emissão a 515 nm.

Repetimos o teste variando concentrações da proteína recombinante (1:5 e 1:10 em relação ao lisado) e tempos de incubação com trombina, 4 ou 16 h. Nós aplicamos no gel o lisado bacteriano após a incubação com a resina, para ver se restava muita proteína recombinante. Aplicamos os lisados de A549 após o *pull-down* para ver se havia alguma diferença visível entre a incubação com uma quantidade maior ou menor de isca. Aplicamos o que ficou retido nas resinas para ver a quantidade de GST clivado, a quantidade de GST-DUSP12 e a presença de DUSP12 solta. Por fim, aplicamos os eluatos para verificar diferenças entre as diferentes incubações. (Figura 15).

Figura 14 – Teste de clivagem por trombina com lisados de A549 após pull-down, em gel de SDS-PAGE 12 % corado com prata. As flechas indicam a DUSP12 clivada.

A partir desse teste pudemos concluir que a quantidade remanescente de DUSP12 recombinante no lisado de *E. coli* é similar nos dois casos. Também notamos que a reação por 4 h é suficiente para clivar boa parte da proteína recombinante, e que o uso de beads menos concentrados (1:10) também consegue pescar basicamente a mesma quantidade de presas. Como o nosso rendimento do fracionamento nuclear era relativamente baixo, optamos por usar a combinação de 20 µg de proteína recombinante para 200 µg de lisado nuclear

Figura 15 – Análise de duração da reação de clivagem por trombina e concentração das iscas, em gel de SDS-PAGE 10 % corado com prata. Na legenda, a concentração da isca "+" é de 1:5 em relação ao lisado (200 µg) e a concentração "-" é de 1:10. A reação de 16 h foi feita na câmara fria, e a reação de 4 h foi feita à T.A. A flecha na posição de maior massa molecular indica a GST-DUSP12, a flecha na massa molecular intermediária indica a DUSP12 clivada no eluato, e a flecha na menor massa molecular indica o GST clivado que ficou retido na resina.

Efetuada o ensaio por 4 h, resgataríamos mais rápido as proteínas, evitando sua degradação ou agregação, e, utilizando uma proporção de 1:10 teríamos um menor sinal da isca, evitando que ele oclua sinais mais fracos na espectrometria de massas. Outra conclusão deste gel foi que deveríamos efetuar a eluição em mais etapas, já que havia proteína recombinante presa na resina, o que nos levou a padronizar um total de 3 lavagens na resina para extrair melhor a proteína recombinante.

Portanto, efetuamos o *pull-down* utilizando estas condições, obtendo potenciais alvos de DUSP12 isolados. Submetemos posteriormente essas amostras aos tratamentos necessários para aplicação no espectrômetro de massas e as enviamos para análise.

5.4 Espectrometria de massas

Com os dados do MASCOT e do MaxQuant, nossa primeira análise foi a de super-representação no conjunto de todas as proteínas identificadas no massas: 1310 para as análises de A549, e 1525 para as de MCF-7. De acordo com a Tabela 4, houve enriquecimento em proteínas nucleares e, principalmente, nucleolares, indicando, novamente, uma efetividade no nosso processo de fracionamento. A análise também mostrou decréscimo relativo em proteínas de membrana e extracelulares.

Localização celular	Linhagem celular	Enriquecimento	p-valor
Núcleo	A549	2,40	$5,64 \cdot 10^{-41}$
Núcleo	MCF-7	1,73	$1,30 \cdot 10^{-14}$
Nucléolo	A549	6,73	$8,51 \cdot 10^{-22}$
Nucléolo	MCF-7	4,12	$1,09 \cdot 10^{-10}$
Membrana Plasmática	A549	0,37	$3,31 \cdot 10^{-12}$
Membrana Plasmática	MCF-7	0,59	$4,53 \cdot 10^{-6}$
Região Extracelular	A549	0,62	$1,38 \cdot 10^{-2}$
Espaço Extracelular	MCF-7	0,39	$4,24 \cdot 10^{-5}$

Tabela 4 – Teste de super-representação de localização celular das proteínas identificadas.

Das várias análises que fizemos, a lista mais robusta de identificação se encontra na Tabela 5. A escolha de cortes e a atribuição de importância entre os valores experimentais é subjetiva, mas, neste caso, unimos as listas de proteínas cuja pontuação foi substancialmente maior nas amostras de DUSP12 do que no controle, e das proteínas que não apareceram no controle.

Proteína (Código)	Occ.	Nuclear	A549	MCF-7	NT	UV	G	B	Tratamentos
RTRAF	6	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	NT, G, B
APEX1	5	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	NT, UV, G
CTNND1	5	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	NT, UV, G
RPS28	5	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
ASCC3	4	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	NT, UV, G
ATP2A2	4	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
CDC73	4	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B
CKB	4	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
CPSF6	4	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B
MSI2	4	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	NT, UV, G
MYOF	4	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	NT, G, B
PCBP2	4	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B
PSIP1	4	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
RRP12	4	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	NT, UV, G
TXLNA	4	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
ACADVL	3	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
APOA1	3	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
ATP5B	3	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	NT, G, B
BAZ1A	3	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não	NT, UV
BTF3	3	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
CPSF7	3	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B
DDX47	3	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
DDX52	3	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
DDX54	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	B
ESYT1	3	Não	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Não	UV, G
EXOC4	3	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	UV, B
GNAS	3	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não	G
GPX3	3	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
HIST1H1C	3	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Não	UV, G
NAT10	3	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Sim	UV, B
NID1	3	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	NT, UV, G
NOP56	3	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	NT, UV, B
OAS3	3	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
RAB10	3	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Não	UV, G
RNF213	3	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não	NT, UV, G
RPL29	3	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	UV, G, B
SART1	3	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B
SLC25A3	3	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	Sim	B
SMC1A	3	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não	NT, UV
THBS4	3	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
TPM3	3	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	NT, G, B
TRIM28	3	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B
TUBB	3	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	UV, B
ZC3HAV1	3	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	NT, G

Proteína (Código)	Occ.	Nuclear	A549	MCF-7	NT	UV	G	B	Tratamentos
ACTA1	2	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
ALDH3A2	2	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
AMOT	2	Sim	Não	Sim	Não	Não	Sim	Não	G
ANAPC7	2	Sim	Não	Sim	Não	Não	Sim	Não	G
AP1B1	2	Não	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
AP2B1	2	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	G, B
AP3B1	2	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
ATP5O	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
BCAS2	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
BRI3BP	2	Não	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B
C7orf50	2	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Não	UV, G
CANX	2	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não	G
CCDC124	2	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não	G
CD3EAP	2	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Não	UV, G
CD44	2	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	G, B
CFL1	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
CHERP	2	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Não	UV, G
CALM	2	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G
CLTA	2	Não	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Não	UV, G
CNOT1	2	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não	G
CSNK1A1	2	Sim	Não	Sim	Não	Não	Sim	Sim	G, B
CSNK2B	2	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Não	UV, G
CTNNB1	2	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
DDOST	2	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não	G
DDX27	2	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Não	UV, G
DDX46	2	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não	UV
DDX6	2	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G
DHX29	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
DNAH7	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
EEF1A2	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
EEF1D	2	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Não	UV, G
EEF1G	2	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G
EIF4A3	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B
EXOC2	2	Não	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
FBL	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
FTSJ3	2	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não	G
GAR1	2	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Não	UV, G
GCN1	2	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Não	UV, G
GEMIN5	2	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	NT
GNAI1	2	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	NT
GOLGA2	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
GTF3C1	2	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G
HADHA	2	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	G, B
HDAC1	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT

Proteína (Código)	Occ.	Nuclear	A549	MCF-7	NT	UV	G	B	Tratamentos
HMGB3	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
HNRNPDL	2	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	G, B
HP1BP3	2	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Não	UV, G
HSP90B1	2	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Não	UV, G
IQGAP1	2	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Não	UV, G
KIF23	2	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
KLHL35	2	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Não	UV, G
KNOP1	2	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não	G
LGALS3	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
MRT04	2	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	G, B
MSH6	2	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
MYH9	2	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Não	UV, G
NAP1L1	2	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não	UV
NCKAP1	2	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	G, B
NIPSNAP1	2	Não	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
NMT1	2	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
NOP16	2	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	NT, UV
PCBP1	2	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G
PEBP1	2	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	NT
PLEC	2	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B
POLR1E	2	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
PPIA	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
PPP1R10	2	Sim	Não	Sim	Não	Não	Sim	Sim	G, B
PRDX3	2	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
PRPF40A	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
PYCR1	2	Não	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	UV, B
RBM10	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
RBM15	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
RBM28	2	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Não	UV, G
RBM3	2	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	Sim	B
RBX1	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
RPL38	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
SLC3A2	2	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
SMARCA5	2	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	G, B
SMC2	2	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	Sim	B
SRBD1	2	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Não	UV, G
SRP14	2	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
SRRM1	2	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	Sim	B
SRSF11	2	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	NT
SRSF6	2	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B
SRSF7	2	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
SSBP1	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
SUB1	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
TARDBP	2	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G

Proteína (Código)	Occ.	Nuclear	A549	MCF-7	NT	UV	G	B	Tratamentos
TCF25	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
TCOF1	2	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	G, B
TMED10	2	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
TMED2	2	Não	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B
TRIM25	2	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
TRMT1L	2	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Não	UV, G
TUBB2A	2	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Não	UV, G
TUBB4A	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B
WBP11	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B
WWP2	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
YWHAB	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
ZC3H15	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT

Tabela 5 – Tabela contendo alvos identificados por espectrometria de massas, com as proteínas com maior confiabilidade. Occ: Número de ocorrências detectadas.

Demos um maior peso aos dados de *Label Free Quantification*, aceitando tanto proteínas com pontuação alta quanto as ausentes no controle. Como os valores numéricos desse parâmetro eram muito altos, o algoritmo do SAINTExpress cortava drasticamente a pontuação quando a proteína não aparecia em uma das amostras – mesmo que estivesse ausente no controle. No caso dos dados de *matches* e da intensidade no cromatograma, consideramos apenas as proteínas na intersecção das duas listas: pontuação alta (reprodutibilidade nas amostras) e ausência do controle (menor chance de ser falso positivo).

Em boa parte das análises, outra decisão que tomamos foi a de agrupar as proteínas identificadas nas análises da isca selvagem e da isca mutada, a partir da análise dos dados e do que já foi descrito na literatura, onde atribui-se ao *zinc finger* praticamente todas as interações já descritas de DUSP12. Portanto, pudemos considerar como se as duas iscas fossem conjuntos de dados complementares e praticamente equivalentes. Porém, não deixamos de dar maior peso a proteínas que apareceram com confiança nos dois conjuntos.

A partir de várias listas, comparamos estes grupos e geramos a Tabela 5, onde constam proteínas que apareceram com certo nível de confiança em, no mínimo, duas condições. A partir dela, montamos diagramas de Venn expressando

superposição entre as duas células, e entre os tratamentos. Também filtramos as proteínas nucleares para repetir as intersecções (Figura 16).

A partir da filtragem de localização nuclear, conferimos manualmente no GeneCards (67) para não descartar nenhuma proteína erroneamente. Vimos que, com esse filtro, não houve redução drástica no número de *hits* potenciais, indicando que nosso protocolo de fracionamento foi efetivo.

Analizando os diagramas de Venn, houve identificação de maior número de proteínas na linhagem de MCF-7 – talvez em partes por termos com ela efetuado a análise de um tratamento a mais, bleomicina, mas houve superposição em torno de 35 % dos *hits*, indicando uma série de proteínas presentes nas duas células e que possam estar desempenhando funções essenciais não só nestas linhagens, mas em outras. Em grande parte, estas proteínas em questão estão relacionadas ao nucléolo, à maturação ribossômica ou à ligação a RNAs.

Figura 16 – Diagramas de Venn ilustrando a distribuição de alvos de acordo com as linhagens celulares (A, C) ou com tratamentos (B, D). Nos diagramas inferiores (C, D), apenas as proteínas nucleares foram consideradas. Destacamos os códigos das proteínas com, no mínimo, três ocorrências, segundo a Tabela 5.

Entre os tratamentos, não houve proteína que fosse identificada em todas as condições no nível de segurança proposto. As maiores superposições ocorreram com a condição não tratada: dentre as proteínas que apareceram em, no mínimo, 3 condições, mais de 90 % apareceram na condição não tratada. Levando em conta todas as outras proteínas da Tabela 5 (Figura 16, B), 55 % das proteínas foram identificadas na condição não tratada. Isto indica que a DUSP12 deva estar envolvida em processos basais do núcleo, que não precisam de nenhum estímulo para serem desencadeados. Isto condiz com dados da literatura a respeito da deleção de DUSP12, que causa fenótipos de menor sobrevivência e proliferação independentes de estímulos.

Muitas proteínas foram, porém, identificadas apenas em condições tratadas. O maior número foi identificado nos tratamentos utilizando radiação Gama, o estímulo mais drástico que utilizamos, e que gera quebras no DNA e, inclusive, pode ionizar a própria água, além de outras moléculas importantes. As proteínas identificadas nestas condições com maior confiança foram a sinaptogamina estendida 1 (ESYT1) e a proteína relacionada a Ras Rab-10, ambas envolvidas no transporte intracelular de moléculas. A primeira está relacionada à resposta aos níveis de cálcio no citosol (74), e a segunda participa da digestão de gotículas lipídicas (75), e ambos processos já foram ligados à presença de espécies reativas de oxigênio (76, 77).

5.5 Análise de Ontologia Gênica

Para análises gerais de ontologia gênica entre os *hits*, elaboramos uma lista menos restrigente (Tabela 6), tal como a Tabela 5, mas considerando tanto proteínas com pontuação alta segundo o SAINTExpress quanto aquelas que não apareciam no controle, para os três parâmetros analisados, e não só para o LFQ. Destas, 85 % já foram anotadas como proteínas presentes no núcleo, mais uma vez demonstrando a eficácia do nosso protocolo de fracionamento.

Proteína (Código)	Occ.	Nuclear	A549	MCF-7	NT	UV	G	B	Tratamentos
RRP12	8	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	NT, UV, G, B
CTNND1	7	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	NT, UV, G
CUTA	7	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	NT, UV, G, B
APEX1	6	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	NT, UV, G
EIF6	6	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	NT, UV, G, B
RPS28	6	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	NT, G, B
RTRAF	6	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	NT, G, B
TXLNA	6	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	NT, G, B
APOA1	5	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
ASCC3	5	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	NT, UV, G
ATP2A2	5	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	NT, G, B
BRIX1	5	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	NT, G, B
C7orf50	5	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Não	UV, G
CCDC25	5	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	NT, G, B
CD44	5	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	NT, G, B
ESYT1	5	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	NT, UV, G
EXOC4	5	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	UV G B
HADHA	5	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	UV G B
HNRNPH3	5	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	NT, UV, G, B
KNOP1	5	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
MRT04	5	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	NT, G, B
MYOF	5	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	NT, G, B
RAB1A	5	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B
RNF213	5	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	NT, UV, G
RPL22L1	5	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	NT, UV, B
S100A13	5	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	NT, G, B
SRSF7	5	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	NT, G, B
TPM3	5	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	NT, G, B
TRIM25	5	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	NT, UV, G
USP39	5	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	NT, UV, G
ACADVL	4	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
ATP5B	4	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	NT, G, B
BTF3	4	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
CALM1	4	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
CANX	4	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
CD3EAP	4	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	NT, UV, G
CDC73	4	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B
CKB	4	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
CNOT1	4	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	G, B
CPSF6	4	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B
CTNBL1	4	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
DDX27	4	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Não	UV, G
DDX47	4	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	NT, G, B
DDX50	4	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B

Proteína (Código)	Occ.	Nuclear	A549	MCF-7	NT	UV	G	B	Tratamentos
DHX29	4	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	NT, G, B
DNAJA1	4	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	NT, G, B
DYNLL1	4	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	NT, UV, G
EEF1D	4	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	NT, UV, G
GPX3	4	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
HIST1H1C	4	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	NT, UV, G
HP1BP3	4	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	UV, G, B
HSP90B1	4	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Não	UV, G
IQGAP1	4	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Não	UV, G
MOGS	4	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	NT, G, B
MSI2	4	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	NT, UV, G
NAP1L1	4	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	UV, B
NAT10	4	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	NT, UV, B
OAS3	4	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
PEBP1	4	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
POLR1C	4	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	NT, UV, G
PSIP1	4	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
RAB10	4	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Não	UV, G
RBX1	4	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B
RFC1	4	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	NT, UV, G
RPL29	4	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	UV G B
SRBD1	4	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Não	UV, G
SRP14	4	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
SRRM1	4	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	NT, UV, B
STAG2	4	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	NT, UV, G
TARDBP	4	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
TIAL1	4	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
TMED10	4	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
TRIM28	4	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	NT, G, B
VPS33B	4	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	NT, G, B
ABCF1	3	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
ACTA1	3	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
ADAR	3	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
ALDH3A2	3	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
AP2B1	3	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	G, B
AP3B1	3	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
ARL6IP4	3	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	NT, G, B
ATP5O	3	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
BAZ1A	3	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não	NT, UV
BRI3BP	3	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	G, B
CAPZA1	3	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	NT, UV, B
CD59	3	Não	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
CHID1	3	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	G, B
CPSF7	3	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B

Proteína (Código)	Occ.	Nuclear	A549	MCF-7	NT	UV	G	B	Tratamentos
CSNK1A1	3	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	NT, G, B
CSNK2A3	3	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	G, B
CTTN	3	Sim	Não	Sim	Não	Não	Sim	Sim	G, B
DDOST	3	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não	G
DDX24	3	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	NT, UV, B
DDX52	3	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
DERL1	3	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B
DHX30	3	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
DNAJC1	3	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B
DNAJC10	3	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	G, B
DYNC1LI1	3	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
EIF3B	3	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não	NT, UV
EIF4G2	3	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	G, B
EIF5	3	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
ERH	3	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	NT, UV, G
EXOC2	3	Não	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
FTSJ3	3	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não	G
GAR1	3	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Não	UV, G
GCN1	3	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Não	UV, G
GLG1	3	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
GMCL1	3	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não	UV
GNAS	3	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não	G
GOLGA2	3	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B
GOLM1	3	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	NT, UV
GTF3C1	3	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	G, B
GTPBP4	3	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	NT, G, B
H2BFS	3	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não	NT, UV
HBA1	3	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B
HNRNPDL	3	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	G, B
HNRNPUL2	3	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Não	UV, G
INF2	3	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	NT, UV, G
KIAA0391	3	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B
KIF23	3	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
LIG3	3	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não	G
MCM3	3	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
MED23	3	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	NT, UV, B
MICU2	3	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
MRPS34	3	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
MSH6	3	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
MYH9	3	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Não	UV, G
MYO1B	3	Não	Não	Sim	Não	Não	Sim	Sim	G, B
NCKAP1	3	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	G, B
NHP2	3	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
NID1	3	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	NT, UV, G

Proteína (Código)	Occ.	Nuclear	A549	MCF-7	NT	UV	G	B	Tratamentos
NIPSNAP1	3	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
NOL10	3	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Não	UV, G
NOP16	3	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	NT, UV
NOP56	3	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	NT, UV, B
PCBP2	3	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B
PLEC	3	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B
PPIA	3	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B
PPP1CC	3	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	NT, UV, G
PPP1R10	3	Sim	Não	Sim	Não	Não	Sim	Sim	G, B
PRDX3	3	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
PROS1	3	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não	NT, UV, G
PRPF40A	3	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B
PTRH2	3	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
PYCR1	3	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	NT, UV, B
RAE1	3	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não	NT, UV
RBM15	3	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
RBM25	3	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	UV G B
RBM3	3	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B
RFC2	3	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	G, B
RPL38	3	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B
SART1	3	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B
SEC23B	3	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B
SGPL1	3	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	G, B
SHMT2	3	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B
SLC1A5	3	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B
SLC25A3	3	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	Sim	B
SLC3A2	3	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
SLC9A3R1	3	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
SLC9A3R2	3	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
SMARCA5	3	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	G, B
SMC1A	3	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não	NT, UV
SNRPD1	3	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
SNRPG	3	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
SQRDL	3	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Não	UV, G
SRSF6	3	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B
SURF4	3	Não	Não	Sim	Não	Não	Sim	Sim	G, B
TCF25	3	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	NT, UV
THBS4	3	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
TMED4	3	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
TMED7	3	Não	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B
TMEM33	3	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B
TRMT1L	3	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Não	UV, G
TUBB	3	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	UV, B
TXLNG	3	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT

Proteína (Código)	Occ.	Nuclear	A549	MCF-7	NT	UV	G	B	Tratamentos
VDAC1	3	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
VIM	3	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	NT
WBP11	3	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	G, B
WDR61	3	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
XRN2	3	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Não	UV, G
YTHDF1	3	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	NT, G, B
ZC3HAV1	3	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
ACOT9	2	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	G, B
ACTN1	2	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Não	UV, G
AMBP	2	Não	Sim	Não	Não	Sim	Não	Não	UV
AMOT	2	Sim	Não	Sim	Não	Não	Sim	Não	G
ANAPC7	2	Sim	Não	Sim	Não	Não	Sim	Não	G
AP1B1	2	Não	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
AP1S1	2	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não	G
AP2S1	2	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	NT
APOC3	2	Não	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G
ARCN1	2	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Sim	B
ARGLU1	2	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G
ARPC2	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B
BAG3	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B
BASP1	2	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não	NT, UV
BCAS2	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
BCLAF1	2	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	Sim	B
BRD9	2	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
C4A	2	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não	NT, UV
C9	2	Não	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
CBR1	2	Sim	Não	Sim	Não	Não	Sim	Não	G
CBX3	2	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	Sim	B
CCDC124	2	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não	G
CCNL1	2	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G
CD2BP2	2	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não	G
CETN2	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
CFL1	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
CHERP	2	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Não	UV, G
CIRBP	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B
CKMT1A	2	Não	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
CLPB	2	Não	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
CLPTM1	2	Não	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
CLTA	2	Não	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Não	UV, G
COPB1	2	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	NT
COPB2	2	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	NT
COPG2	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B
CPSF1	2	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	UV, B
CSDE1	2	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não	NT, UV

Proteína (Código)	Occ.	Nuclear	A549	MCF-7	NT	UV	G	B	Tratamentos
CSNK2B	2	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Não	UV, G
CTHRC1	2	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G
CTR9	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
CYB5B	2	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não	NT, UV
DAZAP1	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
DCAF7	2	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	UV, B
DDB1	2	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	Sim	B
DDX39A	2	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não	G
DDX41	2	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Não	UV, G
DDX46	2	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não	UV
DDX54	2	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	Sim	B
DDX55	2	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G
DDX6	2	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G
DNAH11	2	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	NT
DNAH7	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
DOCK5	2	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G
DPYSL2	2	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não	Não	UV
DYNC1LI2	2	Não	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
DYNLRB1	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B
EEF1A2	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
EEF1B2	2	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
EEF1G	2	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G
EIF2AK2	2	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
EIF3D	2	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não	NT, UV
EIF3E	2	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	G, B
EIF3G	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
EIF4A3	2	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	Sim	B
EIF4G1	2	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G
EPCAM	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B
EXOC5	2	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	NT, UV
EXOC7	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
EXOSC5	2	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G
FAM186A	2	Sim	Não	Sim	Não	Não	Sim	Não	G
FAM83H	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B
FANCI	2	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	G, B
FBL	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
FGF2	2	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G
FMR1	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
FUS	2	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G
FXR2	2	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
GALNT2	2	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G
GDI2	2	Não	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
GEMIN5	2	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	NT
GFPT1	2	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G

Proteína (Código)	Occ.	Nuclear	A549	MCF-7	NT	UV	G	B	Tratamentos
GNAI1	2	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	NT
GRSF1	2	Não	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
GTF2I	2	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	NT
HACD3	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B
HBA1	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
HDAC1	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
HELLS	2	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B
HIST1H4A	2	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	NT
HMCN1	2	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não	UV
HMGB3	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
HMGNI	2	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
HNRNPA0	2	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	UV, B
HNRNPAB	2	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
HNRNPLL	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
HNRNPUL1	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
HSPA1A	2	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G
HSPD1	2	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	NT
IQGAP3	2	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	Sim	B
KAT7	2	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G
KATNAL2	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
KDM1A	2	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não	UV
KIAA1211L	2	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	NT
KLHL35	2	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Não	UV, G
KRI1	2	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G
LGALS3	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
LLGL2	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B
LMAN1	2	Não	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
LMNA	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
MCM3AP	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
METAP2	2	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G
MISP	2	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G
MSN	2	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G
MYL12A	2	Não	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G
MYL6	2	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
MYO18A	2	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G
NAPA	2	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	UV, B
NCBP1	2	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Não	UV, G
NFIC	2	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G
NLRP9	2	Não	Sim	Não	Não	Sim	Não	Não	UV
NME4	2	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	NT
NMNAT1	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
NMT1	2	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
NUDT21	2	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
NUMA1	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT

Proteína (Código)	Occ.	Nuclear	A549	MCF-7	NT	UV	G	B	Tratamentos
ORC5	2	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G
PABPC4	2	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
PCBP1	2	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G
PCYT1A	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
PDS5B	2	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
PELP1	2	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G
PFKP	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
PHB	2	Sim	Não	Sim	Não	Não	Sim	Não	G
PLK1	2	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G
POLR1E	2	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
POLR2E	2	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G
POLR2H	2	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G
PPIL4	2	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G
PRPF4	2	Sim	Não	Sim	Não	Não	Sim	Sim	G, B
PTBP3	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
PYCR2	2	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não	NT, UV
RAB1B	2	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G
RAD21	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B
RAP1A	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
RAP1B	2	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não	UV
RBM10	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
RBM28	2	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Não	UV, G
RBM4	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B
RFC3	2	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G
RFC4	2	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
RPL19	2	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G
RPL23A	2	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G
RPL31	2	Não	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G
RPL34	2	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não	UV
RPL35A	2	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	NT
RPL36A	2	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	NT, UV
RPN1	2	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	G, B
RPS26	2	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G
RPS27A	2	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G
RRP1B	2	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G
S100A1	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
S100A10	2	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	NT
S100B	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
SAP30BP	2	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G
SBDS	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
SCAF1	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
SCAF4	2	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	Sim	B
SCD	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B
SEPT2	2	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	G, B

Proteína (Código)	Occ.	Nuclear	A549	MCF-7	NT	UV	G	B	Tratamentos
SEPT9	2	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	Sim	B
SERPINH1	2	Não	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
SF3B2	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B
SF3B5	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
SKIV2L2	2	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	Sim	B
SLC25A1	2	Sim	Não	Sim	Não	Não	Sim	Não	G
SLC25A5	2	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G
SLC25A6	2	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	NT
SMC2	2	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	Sim	B
SMC4	2	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não	G
SNRPB2	2	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	G, B
SNRPC	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B
SNRPE	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
SPARC	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
SRRM2	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
SRRT	2	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G
SRSF11	2	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	NT
SSBP1	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
STX12	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
SUB1	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
TCOF1	2	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	G, B
TFRC	2	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não	UV
THRAP3	2	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	NT, UV
TMA16	2	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	Sim	B
TMCO1	2	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	Sim	B
TMED2	2	Não	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B
TMEM14C	2	Não	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
TPM1	2	Não	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
TPM4	2	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	NT, UV
TRIM4	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
TRMT10C	2	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	Sim	B
TRMT61A	2	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G
TSR1	2	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	NT, G
TTN	2	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não	UV
TUBB2A	2	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Não	UV, G
TUBB4A	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	NT, B
U2AF1	2	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G
UHRF1	2	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G
VAPB	2	Sim	Não	Sim	Não	Não	Sim	Não	G
VCP	2	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G
WASHC5	2	Não	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
WDR33	2	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G
WDR82	2	Sim	Não	Sim	Não	Não	Sim	Sim	G, B
WWP2	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT

Proteína (Código)	Occ.	Nuclear	A549	MCF-7	NT	UV	G	B	Tratamentos
YBX3	2	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	UV, B
YWHAB	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
YWHAG	2	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	G
YWHAQ	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT
ZC3H15	2	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	NT

Tabela 6 – Tabela contendo alvos identificados por espectrometria de massas, com critérios menos restritivos para inclusão. Occ: Número de ocorrências detectadas.

Elaboramos tabelas comparando o enriquecimento de proteínas anotadas com determinada função entre os hits da Tabela 6 e as proteínas identificadas nos controles de GST das respectivas condições. Assim, só selecionamos funções cujo enriquecimento foi, no mínimo, 15 % maior do que no controle, e cujo FDR foi menor do que 1 %. Assim, excluímos funções cujas proteínas são naturalmente pescadas pela resina (e.g. proteínas de splicing estavam muito presentes no controle negativo) e aquelas que não possuíam valor estatístico relevante.

Analisando as proteínas advindas de amostras de lisados da linhagem A549 e da MCF-7, chegamos às tabelas 7 e 8, e com as proteínas que foram identificadas em ambas simultaneamente, montamos a tabela 9. Comparando-se os resultados, notamos que algumas funções biológicas foram encontradas super-representadas em ambas as linhagens: reparo de DNA, replicação de DNA e ciclo celular.

Observa-se com A549 a identificação de processos de transporte celular, algo que não foi atribuído com confiança aos *hits* de MCF-7, mas que é atribuído ao grupo resultante da intersecção entre as duas células. Por outro lado, identificam-se processos de splicing em MCF-7, algo também presente na intersecção entre esta linhagem e A549.

Nome do processo	Enriquecimento	- Log ₁₀ FDR (de 0 a 3,16)
Transporte mediado por vesículas <i>AP2S1, AP3B1, VPS33B, ACTA1, TXLNA, RAB10, CANX, CLTA, EXOC4, COPB1, TMED4, AP1S1, COPB2, TMED10, EXOC5, AP2B1, RAB1A, RAB1B</i>	2,11	1,39
Exocitose <i>VPS33B, ACTA1, RAB10, CANX, EXOC4, EXOC5, RAB1A, RAB1B</i>	4,12	1,86
Replicação de DNA <i>MCM3, HMGN1, RFC2, LIG3, RFC3, RFC4, S100A10, ORC5, MCM2</i>	5,11	2,72
Resposta a estresse <i>HSPA1A, CSNK2B, FANCI, PPP1CC, HSP90B1, MSH6, PDS5B, APEX1, RFC2, EIF2AK2, APOA1, LIG3, RFC3, RFC4, ASCC3, VCP, GPX3</i>	2,32	1,66
Transporte de proteínas intracelular <i>AP2S1, AP3B1, VPS33B, ACTA1, TXLNA, RAB10, CANX, EXOC4, TMED4, AP1S1, COPB2, TMED10, SRP14, AP2B1, RAB1A, PCBP1, VCP, PCBP2, RAB1B</i>	2,44	2,21
Reparo de DNA <i>MSH6, PDS5B, APEX1, RFC2, LIG3, RFC3, RFC4, ASCC3, SRBD1</i>	4,81	2,56
Transporte de Proteínas <i>AP2S1, AP3B1, VPS33B, ACTA1, TXLNA, RAB10, CANX, EXOC4, TMED4, AP1S1, COPB2, TMED10, SRP14, AP2B1, RAB1A, PCBP1, VCP, PCBP2, RAB1B</i>	2,3	1,90
Processo catabólico <i>HSPA1A, GNAS, MRT04, DHX30, ACADVL, GNAI1, SEPT2, RAB10, ATP2A2, KIF23, MSH6, RFC2, APOA1, KLHL35, CNOT1, RFC3, RFC4, RPS27A, HADHA, RAB1A, ASCC3, VCP, TSR1, RNF213, EXOSC5, RAB1B</i>	1,97	1,74
Ciclo celular <i>CSNK2B, IQGAP1, SEPT2, PPP1CC, ACTA1, PLK1, KIF22, MSH6, PDS5B, MCM2, HMGN1, EIF2AK2, RTRAF, YWHAG, FGF2, ADAR</i>	2,71	3,16
Processo metabólico de DNA <i>MSH6, PDS5B, MCM3, HMGN1, APEX1, RFC2, UHRF1, LIG3, RFC3, RFC4, ASCC3, S100A10, ORC5, SRBD1, MCM2</i>	3,42	2,98

Tabela 7 - Análise de super-representação de alvos em A549.

Nome do processo	Enriquecimento	- Log ₁₀ FDR (de 0 a 13,16)
Contração muscular	4,04	1,74
<i>TPM4, MYO1B, TPM1, MYL6, MYOF, TPM3, TTN</i>		
Replicação de DNA	4,61	3,19
<i>S100A1, PHB, MCM3, HMGN1, S100B, RFC2, S100A13, NAP1L1, LIG3, RFC4, SSBP1</i>		
Biogênese de complexo proteico	3,22	2,27
<i>ARPC2, TMEM33, GOLGA2, SEPT2, SURF4, KIF23, EXOC2, NAPA, CFL1, SUB1, SEPT9, TTN</i>		
Montagem de complexo proteico	3,23	2,26
<i>ARPC2, TMEM33, GOLGA2, SEPT2, SURF4, KIF23, EXOC2, NAPA, CFL1, SUB1, SEPT9, TTN</i>		
Organização do citoesqueleto	2,93	3,04
<i>ARPC2, GOLGA2, SEPT2, TUBB2A, DYNC1LI1, TPM4, KIF23, TUBB4A, DYNC1LI2, KATNAL2, TPM1, TUBB, AMOT, NCKAP1, TPM3, SEPT9, TTN, LLGL2</i>		
Reparo de DNA	3,54	1,93
<i>RAD21, PDS5B, APEX1, RFC2, DDB1, LIG3, RFC4, ASCC3, SRBD1</i>		
Ciclo celular	3,09	6,45
<i>IQGAP3, RAD21, CSNK2B, S100A1, GOLGA2, SEPT2, IQGAP1, TUBB2A, PPP1CC, PHB, ACTA1, KIF23, PDS5B, MYO1B, MCM3, HMGN1, S100B, HDAC1, EIF2AK2, S100A13, RTRAF, TUBB4A, NAP1L1, YWHAB, TUBB, SMC1A, YWHAQADAR, CALM1, SEPT9</i>		
Processamento de mRNA	7,82	13,46
<i>SNRPD1, CPSF1, SNRPE, SCAF4, SNRPC, PPP1CC, SNRPD1, SF3B5, RBM3, PRPF4, NCBP1, SF3B2, GRSF1, CIRBP, FMR1, SRSF7, WBP11, SART1, NUDT21, SNRPB2, PRPF40A, SNRPG, RBM15, SRRM1, CDC73, PCBP2</i>		
Splicing de RNA, via transesterificação	8,85	10,64
<i>SNRPD1, SNRPE, SNRPC, SNRPD2, SF3B5, RBM3, PRPF4, NCBP1, SF3B2, CIRBP, FMR1, SRSF7, WBP11, SART1, SNRPB2, PRPF40A, SNRPG, RBM15, PCBP2, SRSF6, RBM4</i>		
Splicing de mRNA, via spliceossomo	8,5	11,27
<i>SNRPD1, SNRPE, SNRPC, SNRPD2, SF3B5, RBM3, PRPF4, NCBP1, SF3B2, GRSF1, CIRBP, FMR1, SRSF7, WBP11, SART1, SNRPB2, PRPF40A, SNRPG, RBM15, PCBP2, SRSF6, RBM4, HNRNPH3</i>		

Tabela 8 - Análise de super-representação de alvos em MCF-7.

Quando analisamos a tabela da intersecção (Tabela 9), observamos o desaparecimento da função de replicação de DNA – as proteínas identificadas nas duas linhagens eram diferentes. Por outro lado, em linhas gerais, mantêm-se os processos de resposta a estresse, ciclo celular, splicing e transporte de proteínas.

Nome do processo	Enriquecimento	- Log ₁₀ FDR (de 0 a 4,19)
Resposta a estresse	2,85	1,84
<i>CSNK2B, FANCI, PPP1CC, HSP90B1, PDS5B, APEX1, RFC2, EIF2AK2, APOA1, LIG3, RFC4, ASCC3, GPX3</i>		
Reparo de DNA	6	2,28
<i>PDS5B, APEX1, RFC2, LIG3, RFC4, ASCC3, SRBD1</i>		
Exocitose	5,79	2,23
<i>VPS33B, ACTA1, RAB10, CANX, EXOC4, EXOC5, RAB1A</i>		
Processo catabólico	2,19	1,51
<i>GNAS, MRT04, DHX30, ACADVL, SEPT2, RAB10, ATP2A2, KIF23, RFC2, APOA1, KLHL35, CNOT1, RFC4, HADHA, RAB1A, ASCC3, TSR1, RNF213</i>		
Ciclo celular	2,77	1,90
<i>CSNK2B, IQGAP1, SEPT2, PPP1CC, ACTA1, KIF23, PDS5B, MCM3, HMGN1, EIF2AK2, RTRAF, ADAR</i>		
Processo metabólico de DNA	3,29	1,50
<i>PDS5B, MCM3, HMGN1, APEX1, RFC2, LIG3, RFC4, ASCC3, SRBD1</i>		
Processo metabólico de rRNA	7,6	2,30
<i>MRT04, FTSJ3, RPS28, EIF6, NHP2, TSR1</i>		
Splicing de mRNA, via spliceossomo	8,04	4,19
<i>SNRPD1, SNRPD2, SF3B5, SRSF7, WBP11, SNRPB2, SNRPG, RBM15, SRSF6, PCBP2, HNRNPH3</i>		
Splicing de RNA, via transesterificação	8,26	3,95
<i>SNRPD1, SNRPD2, SRSF7, WBP11, SNRPB2, SNRPG, RBM15, SRSF6, PCBP2</i>		

Tabela 9 - Análise de super-representação de alvos comuns a A549 e MCF-7.

Levando-se em conta a diferença entre as condições tratadas (Tabela 10) e não tratadas (Tabela 11), vemos que parte dos processos estão representados pelas proteínas identificadas na condição sem tratamento: ciclo celular, transporte proteico e processos metabólicos de DNA. Em compensação, as proteínas identificadas exclusivamente nas condições tratadas participam da replicação de DNA e ciclo celular, além de processos de degradação de RNA. Sabe-se das implicações de DUSP12 no ciclo celular (28), e possivelmente ela esteja atuando sobre isso também em condições de estresse. Quanto à degradação de RNA, sabe-se da influência da DUSP12 sobre grânulos de estresse no contexto de estresse (78), diminuindo a estabilidade dos grânulos e, por consequência, alterando a sobrevivência do mRNA: talvez esse seja um mecanismo relevante.

Nome do processo	Enriquecimento	- Log ₁₀ FDR (de 0 a 4,50)
Replicação de DNA	4,22	2,01
<i>S100A1, MCM3, HMGN1, S100B, S100A13, RFC4, S100A10, SSBP1</i>		
Transporte proteico	2,81	3,95
<i>AP2S1, AP3B1, VPS33B, EXOC7, ACTA1, TXLNA, CANX, STX12, TXLNG, TMED7, TMED4, RAE1, COPB2, TMED10, SRP14, RAP1A, RAB1A, MCM3AP, TMED2, GDI2, AP1B1, SEC23B, PCBP2, COPG2, LLGL2</i>		
Ciclo celular	2,98	4,50
<i>RAD21, S100A1, GOLGA2, PPP1CC, ACTA1, KIF23, MSH6, PDS5B, MCM3, HMGN1, S100B, HDAC1, EIF2AK2, S100A13, RTRAF, TUBB4A, YWHAB, SMC1A, YWHAQ, ADAR, S100A10, CALM1, SSBP1, CETN2, STAG2, LLGL2</i>		
Transporte mediado por vesículas	2,72	3,75
<i>AP2S1, AP3B1, VPS33B, ACTA1, TXLNA, CANX, COPB1, STX12, TXLNG, TMED7, TMED4, EXOC2, RAE1, COPB2, TMED10, LMAN1, EXOC5, RAP1A, RAB1A, TMED2, GDI2, AP1B1, SEC23B, COPG2, LLGL2</i>		
Processo metabólico de DNA	2,97	2,28
<i>RAD21, H2BFS, S100A1, MSH6, PDS5B, MCM3, HMGN1, APEX1, S100B, S100A13, RFC4, ASCC3, S100A10, SSBP1</i>		
Transporte proteico intracelular	2,75	3,47
<i>AP2S1, AP3B1, VPS33B, EXOC7, ACTA1, TXLNA, CANX, STX12, TXLNG, TMED7, TMED4, RAE1, COPB2, TMED10, SRP14, RAP1A, RAB1A, MCM3AP, TMED2, GDI2, AP1B1, SEC23B, PCBP2</i>		
Transporte	1,8	2,04
<i>AP2S1, AP3B1, VPS33B, EXOC7, ACTA1, TXLNA, WASHC5, CANX, COPB1, STX12, TXLNG, TMED7, TMED4, EXOC2, RAE1, COPB2, FXR2, TMED10, APOA1, EIF6, LMAN1, FMR1, SRP14, SLC1A5, EXOC5, EXOC5, RAP1A, RAB1A, MCM3AP, VDAC1, TMED2, GDI2, AP1B1, SEC23B, PCBP2</i>		

Tabela 10 - Análise de super-representação de alvos em condições não tratadas.

Nota-se que os processos de resposta a estresse não são super-representados de acordo com esta divisão, apesar de os tratamentos evocarem este tipo de resposta. Isto indica que as proteínas envolvidas neste processo potencialmente interagem com DUSP12 mesmo em condições não tratadas (e.g. APE1, PDBS5B, MSH6 etc.).

Nome do processo	Enriquecimento	- Log ₁₀ FDR (de 0 a 2,40)
Replicação de DNA	6,09	2,16
<i>PHB, RFC2, NAP1L1, LIG3, RFC3, ORC5, MCM2</i>		
Processo catabólico de RNA	7,81	1,50
<i>SKIV2L2, NCBP1, CNOT1, EXOSC5</i>		
Ciclo celular	3,02	2,40
<i>IQGAP3, CSNK2B, IQGAP1, SEPT2, TUBB2A, PHB, PLK1, MYO1B, NAP1L1, YWHAG, TUBB, FGF2, VCP, SEPT9, KAT7, MCM2</i>		
Processo metabólico de DNA	3,49	1,84
<i>PHB, RFC2, DDB1, UHRF1, NAP1L1, LIG3, RFC3, ORC5, SRBD1, MCM2</i>		

Tabela 11 - Análise de super-representação de alvos exclusivos de condições tratadas.

Quando levamos em conta apenas as proteínas que apareceram com mais confiança nas análises (3 ou mais ocorrências, Tabela 13), evidencia-se a presença de proteínas envolvidas no transporte de proteínas, explicitando-se a exocitose, por exemplo. Também constam processos metabólicos de rRNA e biogênese de componentes celulares, algo que já se havia atribuído à DUSP12 no caso da maturação ribossômica.

5.6 Análise de redes

A partir da Tabela 6, montamos diferentes redes no Cytoscape a partir das bases de dados MINT e IntAct (79), utilizando agrupamentos similares aos utilizados para as análises de super-representação. A Figura 17 ilustra esse processo e as análises posteriores. Quanto à análise de centralidade, a escolha do parâmetro MCC refletiu a indicação do próprio artigo do cytoHubba (71), que indica que este é o melhor método para aferir as proteínas mais centrais, na faixa utilizada. Também optamos por fazer dois filtros, de forma a não ignorar proteínas centrais que não tenham sido identificadas no massas. A partir disto, ordenamos os 10 nós mais centrais de cada grupo (Tabela 14). A escolha de 10 nós, e não mais ou menos, foi arbitrária.

Nome do processo	Enriquecimento	- Log ₁₀ FDR (de 0 a 7,57)
Contração muscular	4,06	2,22
<i>MYL12A, TPM4, MYO1B, MYO18A, TPM1, MYL6, MYOF, TPM3, TTN</i>		
Replicação de DNA	5,24	4,76
<i>S100A1, PHB, MCM3, HMGN1, S100B, RFC2, S100A13, NAP1L1, LIG3, RFC3, RFC4, S100A10, MCM2, SSBP1, ORC5</i>		
Ciclo celular	3,06	7,57
<i>IQGAP3, RAD21, CSNK2B, S100A1, GOLGA2, SEPT2, IQGAP1, TUBB2A, PPP1CC, PHB, ACTA1, PLK1, KIF23, MSH6, PDS5B, MYO1B, MCM3, HMGN1, S100B, HDAC1, EIF2AK2, S100A13, RTRAF, TUBB4A, NAP1L1, YWHAB, YWHAG, TUBB, SMC1A, YWHAQ, FGF2, ADAR, VCP, MCM2, SEPT9, SSBP1, CETN2, KAT7, STAG2, LLGL2</i>		
Montagem de complexo proteico	2,74	1,93
<i>ARPC2, TMEM33, GOLGA2, SEPT2, SURF4, KIF23, CLTA, EXOC2, NAPA, CFL1, SUB1, SEPT9, TTN</i>		
Biogênese de complexo proteico	2,73	1,93
<i>ARPC2, TMEM33, GOLGA2, SEPT2, SURF4, KIF23, CLTA, EXOC2, NAPA, CFL1, SUB1, SEPT9, TTN</i>		
Reparo de DNA	3,39	2,20
<i>RAD21, MSH6, PDS5B, APEX1, RFC2, DDB1, LIG3, RFC3, RFC4, ASCC3, SRBD1</i>		
Transporte proteico	2,59	5,21
<i>AP2S1, AP3B1, VPS33B, EXOC7, SURF4, ACTA1, TXLNA, RAB10, CANX, EXOC4, MYO1B, STX12, TXLNG, TMED7, TMED4, AP1S1, RAE1, COPB2, TMED10, VAPB, NAPA, SRP14, RAP1A, RAP1B, AP2B1, RAB1A, PCBP1, MCM3AP, TMED2, VCP, GDI2, AP1B1, SEC23B, PCBP2, , COPG2, LLGL2, RAB1B</i>		
Transporte mediado por vesículas	2,37	4,08
<i>AP2S1, ARCN1, AP3B1, VPS33B, ACTA1, TXLNA, RAB10, CANX, CLTA, COPB1, EXOC4, MYO1B, STX12, TXLNG, TMED7, TMED4, EXOC2, AP1S1, RAE1, COPB2, TMED10, LMAN1, VAPB, EXOC5, RAP1A, RAP1B, AP2B1, RAB1A, TMED2, GDI2, AP1B1, SEC23B, COPG2, LLGL2, RAB1B</i>		
Transporte intracelular de proteínas	2,59	5,01
<i>AP2S1, AP3B1, VPS33B, EXOC7, SURF4, ACTA1, TXLNA, RAB10, CANX, EXOC4, MYO1B, STX12, TXLNG, TMED7, TMED4, AP1S1, RAE1, COPB2, TMED10, VAPB, NAPA, SRP14, RAP1A, RAP1B, AP2B1, RAB1A, PCBP1, MCM3AP, TMED2, VCP, GDI2, AP1B1, SEC23B, PCBP2, RAB1B</i>		
Organização citoesquelética	2,42	2,12
<i>ARPC2, GOLGA2, SEPT2, TUBB2A, DYNC1LI1, TPM4, KIF23, TUBB4A, DYNC1LI2, KATNAL2, TPM1, TUBB, AMOT, VCP, NCKAP1, TPM3, SEPT9, TTN, LLGL2</i>		
Processo metabólico de DNA	3,29	4,65
<i>RAD21, H2BFS, S100A1, PHB, MSH6, PDS5B, MCM3, HMGN1, APEX1, S100B, RFC2, S100A13, DDB1, UHRF1, NAP1L1, LIG3, RFC3, RFC4, ASCC3, S100A10, MCM2, SSBP1, ORC5, SRBD1</i>		

Tabela 12 - Análise de super-representação de alvos (união entre as condições).

Figura 17 – Ilustração dos processos de análise de redes. (a) Importação de redes a partir das bases de dados. (b) Identificação de nós centrais. (c) Identificação de complexos moleculares.

A partir de uma análise destes nós no MSigDb, destaca-se a proteína quinase induzida por interferons e ativada por RNA dupla fita (EIF2AK2), identificada em ambas as células. Segundo o UniProt (80) ela está envolvida com a regulação de transdução de sinais, apoptose, proliferação celular e diferenciação. Ela é ativada por auto-fosforilação após ligação a RNA dupla fita, e regula a produção de citocinas e interferons, cujo contexto inflamatório também já foi relacionado a DUSP12. Caso haja interação da fosfatase com EIF2AK2, em que DUSP12 a desfosforilasse, este seria um outro ponto de regulação anti-inflamatória da DUSP, que sabidamente age sobre efetores *downstream* da cascata, como p38.

Outra proteína destacada pelo MSigDb, que foi identificada apenas no contexto de dano, é a proteína associada a receptor de hormônio da tireoide (THRAP3), um fator de transcrição relacionado a danos no DNA, de forma que se exclui de sítios de dano numa maneira que parece inibir a transcrição. Ademais, no silenciamento de THRAP3, ocorre uma hipersensibilidade a danos no DNA (81). Também foi relacionada à diferenciação de adipócitos (82), bem como DUSP12.

De modo geral, as organizações de acordo com as linhagens celulares e de acordo com os tratamentos destacam eixos funcionais muito similares. Os nós

centrais da linhagem A549 apontam majoritariamente para proteínas do citoesqueleto, e no caso da MCF-7 são nós relacionados ao complexo de coesina. Também se destacam proteínas nucleolares e ribonucleares, e esses eixos se repetem quando da organização por tratamentos.

Nome do processo	Enriquecimento	- Log ₁₀ FDR (de 0 a 5,20)
Exocitose	5,18	2,34
<i>ACTA1, RAB10, CANX, EXOC4, EXOC2, RAB1A, SEC23B</i>		
Transporte de proteínas intracelular	3,06	3,23
<i>AP3B1, VPS33B, SURF4, ACTA1, TXLNA, RAB10, CANX, EXOC4, MYO1B, TXLNG, TMED7, TMED4, RAE1, TMED10, SRP14, AP2B1, RAB1A, SEC23B, PCBP2</i>		
Transporte de proteínas	2,89	2,98
<i>AP3B1, VPS33B, SURF4, ACTA1, TXLNA, RAB10, CANX, EXOC4, MYO1B, TXLNG, TMED7, TMED4, RAE1, TMED10, SRP14, AP2B1, RAB1A, SEC23B, PCBP2</i>		
Transporte mediado por vesículas	2,50	1,97
<i>AP3B1, VPS33B, ACTA1, TXLNA, RAB10, CANX, EXOC4, MYO1B, TXLNG, TMED7, TMED4, EXOC2, RAE1, TMED10, AP2B1, RAB1A, SEC23B</i>		
Processo metabólico de rRNA	7,92	3,40
<i>MRTO4, FTSJ3, RPS28, EIF6, SART1, NHP2, NOL10, GAR1</i>		
Biogênese de componente celular	3,61	5,20
<i>SNRPD1, TMEM33, MRTO4, NOP16, H2BFS, GOLGA2, FTSJ3, SURF4, SNRPD1, RAB10, CTNND1, KIF23, EXOC2, APOA1, RPS28, EIF6, SART1, BRX1, RAB1A, NHP2, NOL10, NCKAP1, GAR1, RPL38, CDC73</i>		

Tabela 13 - Análise de super-representação de alvos (união entre as condições, mais de três ocorrências).

Utilizando o plugin MCODE, pudemos identificar alguns complexos de interação proteica (Anexo). Em termos gerais, os mesmos eixos funcionais citados acima predominam entre esses complexos. Temos entre os nós centrais dos complexos, adicionalmente, a presença de proteínas de splicing, de estrutura e replicação de DNA, quinases regulatórias, fatores de transcrição e até uma enzima metabólica.

Destacamos, também, na Tabela 15, os nós centrais das análises de rede que não foram identificados por nós via espectrometria de massas. Destacamos a o fator de transcrição AP-1 (JUN), identificado em todas as condições, que participa do

processo de ciclo celular e sobrevivência à apoptose, sendo ativada pela MAP quinase JNK (83). Acompanhado a ele em quase todas as condições está a subunidade A do complexo de iniciação de tradução eucariótico eIF3, que regula a tradução de diversos mRNAs relacionados ao ciclo celular, diferenciação e apoptose, incluindo o de JUN (84). Nós identificamos várias outras subunidades deste complexo, como p. ex. a subunidade B. Já a proteína RRP1B, curiosamente, é apontada como nó importante nas condições em que foi identificada, e, nas outras condições, é puxada para as redes de interação – como nó importante – pelas proteínas que identificamos, incluindo aquelas que apresentam alta confiabilidade.

As proteínas envolvidas com o citoesqueleto apresentam curiosidades relacionadas às funções já descritas da DUSP12. A proteína similar a GAP IQGAP1 foi identificada em condições tratadas e é destacada como nó principal em quase todas as condições, já tendo sido ligada à progressão do ciclo celular após parada da replicação, apresentando acumulação nuclear neste caso (85). A superexpressão de DUSP12, por sua vez, também afeta o ciclo e faz as células progredirem para G₂/M. A IQGAP1 também interage com a calmodulina (CALM), integrando a sinalização de cálcio com a de MAP quinases (86). A CALM está envolvida na estabilidade genômica participando do ciclo centrossomal, necessário para a divisão de cromossomos na mitose (87).

Um dos complexos identificados em torno do polipeptídeo leve da miosina 6 (MYL6), em condições não-tratadas, apresenta a proteína de ligação a poli(rC) 2 (PCBP2), que já foi identificada como componente de grânulos de estresse (88). A DUSP12 interfere no desmonte desses grânulos, e sabe-se que os microtúbulos também, e ambos não são necessários para a persistência deles (89). Adicionalmente identificada em complexos citoesqueléticos e ribonucleoproteicos está a RNA citidina acetiltransferase (NAT10), que consegue acetilar histonas (90) e tubulina (91), regulando a estrutura cromossômica e estabilizando microtúbulos, fato importante pra a divisão celular. Isso suscita dúvidas sobre interação de DUSP12 com NAT10 com os processos supracitados de mitose e dinâmica de grânulos de estresse, possivelmente sugerindo uma explicação para os fenótipos observados.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
#1	RRP1B	RAD21	NOP56	RAD21	MYO18A	MYH9	RRP1B	NOP56	RRP1B	VDAC1
#2	MYO18A	SMC1A	IQGAP1	SMC1A	MYH9	IQGAP1	MYO18A	EIF4A3	RAD21	MYH9
#3	MYH9	STAG2	FBL	STAG2	EIF4A3	DDX41	MYH9	EIF6	SMC1A	IQGAP1
#4	IQGAP1	PDS5B	PPP1CC	PDS5B	IQGAP1	NOP56	IQGAP1	GTPBP4	STAG2	NOP56
#5	NOP56	VDAC1	CALM	FBL	DDX41	PPP1CC	VDAC1	NAT10	PDS5B	CANX
#6	DDX41	FBL	EIF2AK2	PTBP3	RRP1B	TPM4	EIF6	TRAP2	MYO18A	EIF6
#7	EIF2AK2	PTBP3	RFC2	NOP56	MYO1B	HNRNP3	DDX41	THRAP3/ BCLAF1	IQGAP1	CALM
#8	EIF6	NOP56	TPM4	VDAC1	CLTA	SMC1A	EIF2AK2	BAG3/ TUBB4A	MYH9	PPP1CC
#9	CALM	IQGAP1	RFC1/4	CANX	MISP	INF2/ NAP22	CANX	RFC2/ BRIX1	FBL	TPM3
#10	CANX	EIF4A3	NOG1/ NAT10	CALM	THRAP3/ SRSF10	CLTA / ACTN1	PPP1CC	TRMT10C SF3B2/ SHMT2	DDX41	DDOST / PLEC / ATP50

Tabela 14 – Alvos centrais a partir de análise de redes. Condições : A – A549, B – MCF7, C – Intersecção A549 e MCF7, D – Não Tratada, E – Exclusivo de Condições Tratadas, F – UVB, G – Gama, H – Bleomicina, I – Total, J – Total (acima de 3 ocorrências). Em negrito as proteínas presentes na Tabela 5, identificadas com maior confiança.

Outro eixo de proteínas relevante para divisão celular são as coesinas, que participam da coesão de cromátides irmãs e dos centrossomos. A esse eixo foi atribuída importância nas nossas análises de rede, e sabe-se que a proteína de manutenção da estrutura dos cromossomos 1A (SMC1A) interage com os microtúbulos mitóticos (92) e pode sofrer acetilação (93). Isso suscita hipóteses sobre o mecanismo pelo qual a DUSP12 interfere na separação de cromossomos, se pela coesina cromossomal, pela coesina centrossomal, pelos microtúbulos, ou uma combinação destes fatores.

Encontramos em complexo identificado em células não-tratadas a proteína relacionada a Ras Rab-1A (RAB1A), também relacionada a MYL6. Esta proteína regula a migração celular em camundongos (94) e promove a hipertrofia cardíaca,

também em camundongos (95). A DUSP12 também promove a migração em células humanas (27) e previne a hipetrofia em células murinas (96). Sabe-se que a localização de RAB1A é regulada pela fosforilação na Ser¹⁹⁴, afetando sua habilidade de se ligar a membranas (97), e pode ser que seja um alvo de desfosforilação de DUSP12, explicando os fenótipos observados.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
#1	JUN	SMC3	EIF3A	SMC3	EIF3A	JUN	JUN	EIF3A	SMC3	JUN
#2	EIF3A	WAPL	JUN	WAPL	JUN	PPP1CB	EIF3A	JUN	WAPL	VCAM1
#3	PPP1CB	EIF3A	HNRNPU	JUN	SNW1	MYO18A	PPP1CB	RPL10	JUN	RRP1B
#4	HNRNPU	JUN	RPL10	PDS5A	PPP1CB	PLEKHA7	DBN1	NPM1	EIF3A	PPP1CB
#5	LIMA1	EIF3H	RRP1B	STAG1	PLEKHA7	LIMA1/ CAPZA2	VCAM1	HNRNPU	PPP1CB	CAPZA2

Tabela 15 – Proteínas não identificadas no massas, centrais nas análises de redes. Condições : A – A549, B – MCF7, C – Intersecção A549 e MCF7, D – Não Tratada, E – Exclusivo de Condições Tratadas, F – UVB, G – Gama, H – Bleomicina, I – Total , J – Total (acima de 3 ocorrências).

O nó mais importante dentre as proteínas identificadas em mais de 3 ocorrências é a proteína de canais ânion-seletivos e voltagem-dependentes 1 (VDAC1). Apesar de se encontrar na membrana mitocondrial externa, ela também é encontrada no núcleo e na membrana plasmática, e interage com uma variedade de proteínas, incluindo a proteína nucleolar NOP56 (98), importante nos eixos ribonucleoproteicos. Quando a VDAC1 leva a um maior aumento na abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (mPTP), a apoptose é desencadeada (99). Também, já se identificou a relação de VDAC1 e suas isoformas em patologias cardíacas (100), sendo que estas levam a uma menor fosforilação de VDAC1 e uma maior abertura do mPTP (101). Pode-se supor que a DUSP12, por ter ação anti-apoptótica e anti-cardiomiopática, seja um regulador negativo da desfosforilação de VDAC1 e/ou da abertura do mPTP.

Muitas proteínas relevantes na análise, tanto por centralidade quanto por confiabilidade da identificação, são relacionadas ao splicing. A mais importante delas é o fator de transcrição, tradução e transporte de RNA (RTRAF), que foi a proteína que identificamos com maior confiabilidade. Ela é um componente da ligase de splicing do tRNA e participa de processos como reparo de RNA e splicing de mRNA induzido por estresse (102), além de se relocar para os grânulos de estresse após tratamento com arsenito (103), bem como a DUSP12. Também identificamos a proteína parceira de PC4 e SFRS1 (PSIP1) em complexos relacionados ao splicing e a ribonucleoproteínas. A PSIP1 já foi ligada ao splicing (104, 105) e a uma citoproteção antiapoptótica em contextos de estresse (106). Em complexos identificados em condições tratadas com radiação gama, também centrados ao redor de ribonucleoproteínas, está a proteína associada a U4/U6.U5 tri-snRNP 2 (USP39), envolvida no splicing e reguladora do *checkpoint* do fuso mitótico (107). Também mencionamos EIF4A3, proteínas Sm (SNRPD1/2), hnRNPH3 e SRSF7. Caso DUSP12 influencie esse processo, algumas de suas funções biológicas poderão ser explicadas, em especial sua influência na diferenciação e na sobrevivência. Será interessante avaliar a influência da expressão dessa fosfatase no splicing de mRNAs.

No caso do fator de transcrição JUN, também observamos diversas semelhanças a processos efetuados por DUSP12. JUN é ativada por radiação UV (108) e gama (109), e oferece funções anti ou pró-apoptóticas, dependendo do contexto (110, 111). DUSP12, por sua vez, também oferece efeitos anti-apoptóticos, e sua deleção causa apoptose. Alta expressão de JUN bloqueia a diferenciação adipocítica de sarcomas (112), mesmo efeito observado em preadipócitos murinos com alta atividade catalítica de DUSP12 (30). Tanto JUN quanto DUSP12 são necessárias para a progressão através da fase G1 do ciclo celular (113). JUN regula isto por meio do controle da expressão de ciclina D1, ao passo que em camundongos os níveis de mRNA de Dusp12 acompanham os níveis de mRNA de ciclina D1 (17).

Será interessante analisar se a variação nos níveis de expressão e atividade de JUN e de DUSP12 causam mudanças de padrão expressão gênica semelhantes. Também será necessário estudar a fundo, em humanos, a relação entre ciclina D1 e a atividade ciclo-dependente de DUSP12, visto que uma das proteínas identificadas,

a parafibromina (CDC73), e outro nó importante para células tratadas, proteína com domínio SNW 1 (SNW1), também controlam a expressão de ciclina D1 (114-116), oferecendo talvez um loop regulatório entre proteínas do ciclo celular e expressão de DUSP12.

Outros nós importantes que perseguimos na validação foram a proteína Treacle (TCOF1), cujo gene, quando mutado, leva à síndrome de Treachers Collins, e a proteína 3 ligada a proteína de heterocromatina 1 (HP1BP3). A TCOF1 não foi identificada com destaque nas análises de redes, mas sabe-se que ela está ligada a complexos ribonucleoproteicos onde se liga à proteína NOP56 (117), esta sim um nó central das nossas análises. Já a HP1BP3 foi identificada em diversos complexos relacionados a ribonucleoproteínas, que também participa da progressão do ciclo celular (118) e da regulação da estrutura da cromatina (119).

Em análise na plataforma de dados sobre modificações pós-traducionais PhosphositePlus (120), vemos que alvos cuja regulação por fosforilação parece interessante, como RAB1A e VDAC1, e alvos que decidimos perseguir, e que também podem ser passíveis de fosforilação, como HP1BP3 e NAT10, apresentam, todos eles, resíduos de tirosina fosforilados com frequência, bem como outros resíduos fosforiláveis de serina e treonina. Isso reforça a possibilidade de regulação por DUSP12, e esse exercício pode ser estendido a outros alvos. A Tabela 16 lista os resíduos cuja fosforilação foi identificada com mais frequência para um conjunto de proteínas.

Nome da proteína	Resíduo de Y	Resíduo de S	Resíduo de T
HP1BP3	379 (209)	142 (42)	51 (59)
NAT10	416 (16)	934 (24)	223 (3)
RAB1A	8 (8)	114 (12)	75 (29)
RTRAF	11, 40 (2)	107 (1)	7 (2)
TUBB	340 (382), 222 (102)	339 (6)	221 (99)
VDAC	67 (56), 195 (40)	104 (83)	107 (21)

Tabela 16 – Resíduos mais comumente identificados com fosforilação segundo o PhosphositePlus. Entre parênteses encontra-se o número de experimentos onde a modificação foi identificada.

5.7 Validação de alvos

5.7.1 Microscopia confocal e de fluorescência

A partir de dados preliminares das nossas análises do massas, e da disponibilidade de anticorpos, escolhemos alguns alvos interessantes a serem validados. Em primeiro lugar, escolhemos a proteína relacionada à cromatina HP1BP3, que aparecia em várias amostras tratadas. Também nos chamou a atenção o fato de estar envolvida com o ciclo celular e a capacidade proliferativa (118), algo com a qual a DUSP12 já havia sido relacionada. Interessantemente, a HP1BP3 media a condensação de cromatina durante a hipóxia, algo clinicamente relevante e atrelado a resistência à radioterapia (119).

Outra escolha foi a proteína centriolar CENPJ/CPAP, que já foi ligada ao controle da estabilidade dos fusos mitóticos, por meio da polimerização da tubulina (121). Além da tubulina também ter sido identificada nas nossas amostras, o fato da superexpressão de DUSP12 influenciar no processo de segregação cromossômica torna este alvo chamativo. Entretanto, esta proteína só foi identificada nas nossas amostras tratadas com bleomicina.

Por fim, a proteína nucleolar TCOF1, identificada em ambas as células, participante do processo de processamento ribossômico e, potencialmente, na diferenciação celular (122). Também se sabe que esta proteína está presente em complexos pré-ribossomais que contêm NOP56 (123).

O anticorpo comercial de DUSP12 da qual dispúnhamos era feito em camundongos, bem como as amostras grátis de anti-CENPJ e anti-TCOF1 que recebemos da Santa Cruz Biotechnology. Portanto, lançamos mão de um soro de coelho anti-DUSP12, que, apesar de ligar-se com maior inespecificidade, conseguiu ao menos captar, na maioria dos casos, o padrão de localização da fosfatase.

Organizamos na Figura 18 as imagens representativas do ensaio de microscopia de fluorescência que fizemos com as duas células, e marcação dupla de DUSP12 com as 3 proteínas citadas acima. Notamos que a localização de DUSP12, TCOF1 e HPB1P3 não sofre grandes mudanças após a exposição aos

tratamentos genotóxicos, mas a CENPJ, que, na condição não-tratada apresenta localização focalizada nas células, aparenta sofrer uma pulverização após os tratamentos, refletindo provavelmente um mecanismo de parada no ciclo celular após o dano. A partir destas imagens, presume-se que as proteínas ocupam os mesmos lugares na célula, sendo possível que interajam fisicamente num contexto *in vivo*.

Investigamos mais profundamente a questão da colocalização com a leitura das lâminas no microscópio confocal, cujas figuras representativas estão inclusas na Figura 18. Para a proteína HP1BP3, observamos forte colocalização, que se mantém após tratamento com radiação gama. Mesmo que isto não signifique interação física, observamos focos de DUSP12 em regiões de cromatina, onde a HP1BP3 se concentra, abrindo a possibilidade da fosfatase estar regulando processos na estrutura, estabilidade e dinâmica do DNA.

Quanto à TCOF1, aparentemente ocorre maior colocalização na linhagem de mama MCF-7 do que na de pulmão, A549, onde os focos da proteína nucleolar tendem a apresentar menor concentração de DUSP12. No caso da proteína centriolar CENPJ, os focos (ou a distribuição “pulverizada” após tratamento) aparecem em locais onde há presença de DUSP12, porém demonstrando uma colocalização menos intensa do que no caso de HP1BP3. Ressaltamos, de novo, que a qualidade do anticorpo de DUSP12 utilizado nestes dois casos é menor.

5.7.2 Pull-down / Co-imunoprecipitação

Repetimos os ensaios de *pull-down* e efetuamos co-imunoprecipitação com diferentes anticorpos, utilizando lisados totais, para confirmar algumas das interações. Após testes, utilizamos uma mistura dos tampões RIPA e Pierce com concentração de NaCl de 250 mM, igual à das amostras. Nós fizemos lavagens superficiais e não ressuspendemos as resinas, de forma a preservar as interações.

No ensaio de *pull-down*, utilizamos a isca mutada de DUSP12 – não haveria diferença, pois nesta etapa o tampão continha inibidores de fosfatase, a fim de preservar eventuais mudanças no padrão de fosforilação entre os tratamentos. Também, nossa conclusão da espectrometria de massas foi de que não há mudanças relevantes no padrão de interação das duas iscas.

Figura 18 – Imunofluorescência confocal. Microscópio Olympus FluoView™ 1000, objetiva de 40x.

A549 Não tratada
Vermelho: DUSP12
Verde: CENPJ

A549 Não tratada
Vermelho: HP1BP3
Verde: DUSP12

MCF-7 Não tratada
Vermelho: DUSP12
Verde: CENPJ

MCF-7 Não tratada
Vermelho: HP1BP3
Verde: DUSP12

A549 Não tratada
Vermelho: DUSP12
Verde: TCOF1

A549, Gama 15 Gy, 30'
Vermelho: HP1BP3
Verde: DUSP12

MCF-7 Não tratada
Vermelho: DUSP12
Verde: TCOF1

MCF-7, Gama 15 Gy, 30'
Vermelho: DUSP12
Verde: CENPJ

Na Figura 19 ilustramos nosso experimento representativo de *pull-down*, no qual também incubamos anticorpos para a proteína APE1, que havia aparecido com certa importância nas análises. Em resultados não mostrados, também havíamos

incubado contra proteínas como MSH2, SMC2 e PARP1, que não eram puxadas pela resina, e hnRNPC e MCM7, que foram puxadas em quantidades similares pelo controle negativo e pelas iscas.

Observamos que há uma banda clara de TCOF1 na altura dos 250 kDa que é puxada no *pull-down*, em especial na célula MCF-7, e mais intensamente na condição tratada. Unindo estes dados com os resultados de imunofluorescência confocal, há indícios convincentes de que DUSP12 interaja com TCOF1 e, portanto, com partículas ribonucleoproteicas que contêm NOP56, um dos nós mais importantes das nossas análises.

Os resultados para NAT10 e HP1BP3 foram inconclusivos, pois as proteínas também foram puxadas pela resina. Porém, na condição tratada, há indícios de que os sinais sejam substancialmente mais fortes do que no controle. Para tirar mais conclusões, fizemos ensaios de co-imunoprecipitação com estes anticorpos.

Apesar de não termos obtido resultados conclusivos para HP1BP3, observamos um fato interessante: a proteína é atraída pela resina fortemente após exposição a radiação gama, e isso não se dá por diferenças de expressão (Figura 20). Como havíamos observado anteriormente que a concentração de DTT influencia a ligação de HP1BP3 à resina (dados não mostrados), pressupõe-se que haja modificações redox na proteína em resposta à radiação, o que poderia explicar sua função em contextos de hipóxia, onde há aumento de ROS, bem como no caso de radiação gama.

Caso haja alguma dinâmica da atividade de HP1BP3 em relação ao estado redox da célula, pode haver alguma conexão com os mecanismos de troca de disulfeto que a DUSP12 apresenta, nos quais utiliza cisteínas do domínio de dedo de zinco para manter a cisteína catalítica ativa (33). Neste caso, a DUSP12 poderia modular a ação de HP1BP3 nos contextos de alteração de níveis de ROS.

Figura 19 – Ensaio de pull-down utilizando DUSP12 como isca para validação de alvos.

Não conseguimos bandas fortes para CENPJ, uma proteína pouco abundante. Porém, podemos observar duas bandas na região dos 120-130 kDa, que aparecem fracas no lisado total, mas são escurecidas no *pull-down*, e não são puxadas pela resina. Com estes resultados, junto à imunofluorescência confocal, há grande indicação de que DUSP12 esteja interagindo com os centrôssomos, possivelmente afetando sua dinâmica e interferindo no ciclo celular, bem como a segregação cromossômica na mitose.

Figura 20 – Imunoprecipitação de HP1BP3.

No caso da NAT10 (Figura 21), conseguimos observar bandas fortes do co-IP, especialmente a banda superior da DUSP12 no blot. A existência de interação física entre as duas pode explicar processos de regulação da cromatina e da polimerização de microtúbulos.

Figura 21 – Co-imunoprecipitação de DUSP12 com NAT10.

6 CONCLUSÃO

Nas células que estudamos, A549 e MCF-7, a DUSP12 tem alta expressão e é localizada prioritariamente no núcleo, fato observado na maioria dos tecidos estudados na literatura (73). Nosso protocolo de extração nuclear foi eficiente, de acordo com os nossos resultados, e pudemos isolar muitas proteínas nucleares como potenciais alvos de DUSP12.

A partir de dados filtrados estatisticamente, observamos perfis diferenciais de alvos potenciais após exposição a agentes genotóxicos, apesar de a maior parte das proteínas ter sido identificada na condição não-tratada. Isto indica que a DUSP12 provavelmente interage com a maioria de seus parceiros sob condições basais, mas é capaz de responder a estresses celulares.

Com os dados filtrados, identificamos proteínas relacionadas à maturação ribossômica e a grânulos de estresse, cuja conexão já era conhecida, também encontramos proteínas da cromatina e do complexo coesina, cujos processos biológicos são relacionados facilmente aos fenótipos observados pela alteração no nível de expressão de DUSP12. Em um nível menos óbvio, também identificamos eixos de proteínas do citoesqueleto e da maquinaria de splicing.

Partimos para a validação de alguns alvos, encontrando colocalização de DUSP12 com HP1BP3, o que assegura a presença da fosfatase em regiões de heterocromatina, e possibilita que as duas interajam fisicamente. Também observamos colocalização e indícios de interação física com CENPJ, indicando altas chances de a DUSP12 estar relacionadas aos centrossomos, influenciando o processo de divisão de cromossomos.

No caso da NAT10, apesar de não termos feito o ensaio de imunofluorescência, vimos indícios de interação bioquímica por co-imunoprecipitação, o que sugere que a DUSP12 possa regular esta proteína em seus processos de modulação da cromatina e dos microtúbulos, processos relevantes para os fenótipos observados, relacionados a ela. Por fim, também observamos colocalização e interação de DUSP12 com TCOF1, e concluímos que essa fosfatase interage com partículas que contêm a NOP56, alvo importante das nossas análises.

Com uma maior compreensão dos mecanismos biológicos de ação da DUSP12, pode-se identificar potenciais relações com distúrbios celulares e, conhecendo-se melhor as interações subjacentes ao processo patológico, sugerir terapias que interfiram na atividade dessa fosfatase.

Sabendo-se que a DUSP12 está alterada em patologias como cardiopatias e inflamações, e que sua desregulação causa distúrbios como aberrações cromossômicas, definitivamente há espaço para que, futuramente, desenvolvam-se terapias baseadas na sua inibição ou ativação. Estabelecida a importância clínica de DUSP12, ficará a cargo da indústria e da academia o desenvolvimento de compostos cada vez mais específicos e potentes e a verificação da eficácia e segurança de seu uso farmacêutico.

REFERÊNCIAS

- [1] MATTHEWS, Harry R. Protein kinases and phosphatases that act on histidine, lysine, or arginine residues in eukaryotic proteins: a possible regulator of the mitogen-activated protein kinase cascade. **Pharmacology & therapeutics**, v. 67, n. 3, p. 323-350, 1995.
- [2] HUMPHREY, Sean J.; JAMES, David E.; MANN, Matthias. Protein phosphorylation: a major switch mechanism for metabolic regulation. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 26, n. 12, p. 676-687, 2015.
- [3] UBERSAX, Jeffrey A.; FERRELL JR, James E. Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 8, n. 7, p. 530, 2007.
- [4] BARFORD, David; DAS, Amit K.; EGLOFF, Marie-Pierre. The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation. **Annual review of biophysics and biomolecular structure**, v. 27, n. 1, p. 133-164, 1998.
- [5] RUSNAK, Frank; MERTZ, Pamela. Calcineurin: form and function. **Physiological reviews**, v. 80, n. 4, p. 1483-1521, 2000.
- [6] PEARSON, Gray et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. **Endocrine reviews**, v. 22, n. 2, p. 153-183, 2001.
- [7] CIMPRICH, Karlene A.; CORTEZ, David. ATR: an essential regulator of genome integrity. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 9, n. 8, p. 616, 2008.
- [8] SACCO, Francesca et al. The human phosphatase interactome: An intricate family portrait. **FEBS letters**, v. 586, n. 17, p. 2732-2739, 2012.
- [9] MANNING, Gerard et al. The protein kinase complement of the human genome. **Science**, v. 298, n. 5600, p. 1912-1934, 2002.
- [10] OLSEN, Jesper V. et al. Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. **Cell**, v. 127, n. 3, p. 635-648, 2006.
- [11] ALONSO, Andres et al. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. **Cell**, v. 117, n. 6, p. 699-711, 2004.
- [12] ALONSO, Andrés; PULIDO, Rafael. The extended human PTPome: a growing tyrosine phosphatase family. **The FEBS journal**, v. 283, n. 8, p. 1404-1429, 2016.
- [13] AUGER-MESSIER, Mannix et al. Unrestrained p38 MAPK activation in Dusp1/4 double null mice induces cardiomyopathy. **Circulation research**, p. CIRCRESAHA. 112.272963, 2012.
- [14] ZHANG, Yongliang. Dual specificity phosphatase 12 targets p38 MAP kinases to regulate macrophage response to intracellular bacterial infection. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1259, 2017.
- [15] GUAN, KunLiang et al. A yeast protein phosphatase related to the vaccinia virus VH1 phosphatase is induced by nitrogen starvation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 24, p. 12175-12179, 1992.
- [16] MUDA, Marco et al. Identification of the human YVH1 protein-tyrosine phosphatase orthologue reveals a novel zinc binding domain essential for in vivo function. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 34, p. 23991-23995, 1999.
- [17] ZHANG, Xin-Min et al. mVH1, a dual-specificity phosphatase whose expression is cell cycle regulated. **Mammalian Genome**, v. 11, n. 12, p. 1154-1156, 2000.
- [18] IUCHI, S. Three classes of C2H2 zinc finger proteins. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 58, n. 4, p. 625-635, 2001.

- [19] POYUROVSKY, Masha V. et al. The Mdm2 RING domain C-terminus is required for supramolecular assembly and ubiquitin ligase activity. **The EMBO journal**, v. 26, n. 1, p. 90-101, 2007.
- [20] ExpASY - PROSITE. Disponível em: <http://prosite.expasy.org/>
- [21] NCBI BLAST® blastP suite. Disponível em: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- [22] LO, Kai-Yin. **Nuclear export and cytoplasmic maturation of the large ribosomal subunit**. The University of Texas at Austin, 2009.
- [23] PARK, Heui-Dong et al. The *S. cerevisiae* nitrogen starvation-induced Yvh1p and Ptp2p phosphatases play a role in control of sporulation. **Yeast**, v. 12, n. 11, p. 1135-1151, 1996.
- [24] SAKUMOTO, Naoko et al. Dual-specificity protein phosphatase Yvh1p, which is required for vegetative growth and sporulation, interacts with yeast pescadillo homolog in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 289, n. 2, p. 608-615, 2001.
- [25] SACRISTÁN-REVIRIEGO, Almudena; MARTÍN, Humberto; MOLINA, María. Identification of putative negative regulators of yeast signaling through a screening for protein phosphatases acting on cell wall integrity and mating MAPK pathways. **Fungal Genetics and Biology**, v. 77, p. 1-11, 2015.
- [26] MACKEIGAN, Jeffrey P.; MURPHY, Leon O.; BLENIS, John. Sensitized RNAi screen of human kinases and phosphatases identifies new regulators of apoptosis and chemoresistance. **Nature cell biology**, v. 7, n. 6, p. 591, 2005.
- [27] CAIN, Erica L.; BRAUN, Sterling E.; BEESER, Alexander. Characterization of a human cell line stably over-expressing the candidate oncogene, dual specificity phosphatase 12. **PloS one**, v. 6, n. 4, p. e18677, 2011.
- [28] KOZAROVA, Anna; HUDSON, John W.; VACRATIS, Panayiotis O. The dual-specificity phosphatase hYVH1 (DUSP12) is a novel modulator of cellular DNA content. **Cell Cycle**, v. 10, n. 10, p. 1669-1678, 2011.
- [29] BOYER, Laurie A. et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. **Cell**, v. 122, n. 6, p. 947-956, 2005.
- [30] CHOI, Hye-Ryung et al. Protein tyrosine phosphatase profiling studies during brown adipogenic differentiation of mouse primary brown preadipocytes. **BMB reports**, v. 46, n. 11, p. 539, 2013.
- [31] CHO, SharolSu Lei et al. Dual-specificity phosphatase 12 targets p38 MAP kinase to regulate macrophage response to intracellular bacterial infection. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 1259, 2017.
- [32] SHARDA, Priya R. et al. The dual-specificity phosphatase hYVH1 interacts with Hsp70 and prevents heat-shock-induced cell death. **Biochemical Journal**, v. 418, n. 2, p. 391-401, 2009.
- [33] BONHAM, Christopher A.; VACRATIS, Panayiotis O. Redox regulation of the human dual specificity phosphatase YVH1 through disulfide bond formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 34, p. 22853-22864, 2009.
- [34] MAILLOUX, Colleen. **Structure-Function Characterization of the Human Dual Specificity Phosphatase hYVH1**. 2010.
- [35] KULMS, Dagmar et al. DNA damage, death receptor activation and reactive oxygen species contribute to ultraviolet radiation-induced apoptosis in an essential and independent way. **Oncogene**, v. 21, n. 38, p. 5844, 2002.
- [36] PFEIFER, Gerd P.; BESARATINIA, Ahmad. UV wavelength-dependent DNA damage and human non-melanoma and melanoma skin cancer. **Photochemical & photobiological sciences**, v. 11, n. 1, p. 90-97, 2012.

- [37] RILEY, P. A. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. **International journal of radiation biology**, v. 65, n. 1, p. 27-33, 1994.
- [38] OLIVE, Peggy L. The role of DNA single-and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation. **Radiation research**, v. 150, n. 5s, p. S42-S51, 1998.
- [39] DELLA LATTA, Veronica et al. Bleomycin in the setting of lung fibrosis induction: From biological mechanisms to counteractions. **Pharmacological research**, v. 97, p. 122-130, 2015.
- [40] SANCAR, Aziz et al. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. **Annual review of biochemistry**, v. 73, n. 1, p. 39-85, 2004.
- [41] TATUM, D.; LI, S.; STORICI, F. **DNA Repair - On the Pathways to Fixing DNA Damage and Errors**. 2011.
- [42] LOK, Benjamin H.; POWELL, Simon N. Molecular pathways: understanding the role of Rad52 in homologous recombination for therapeutic advancement. **Clinical cancer research**, v. 18, n. 23, p. 6400-6406, 2012.
- [43] WANG, Alethea D.; AGRAWAL, Aneil F. DNA repair pathway choice is influenced by the health of *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, p. genetics. 112.143321, 2012.
- [44] TORRES, Thompson EP et al. Loss of DUSP3 activity radiosensitizes human tumor cell lines via attenuation of DNA repair pathways. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, 2017.
- [45] PANICO, Karine; FORTI, Fabio Luis. Proteomic, cellular, and network analyses reveal new DUSP3 interactions with nucleolar proteins in HeLa cells. **Journal of proteome research**, v. 12, n. 12, p. 5851-5866, 2013.
- [46] SAUER, Heinrich; WARTENBERG, Maria; HESCHELER, Juergen. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. **Cellular physiology and biochemistry**, v. 11, n. 4, p. 173-186, 2001.
- [47] SEGAL, Anthony W. How neutrophils kill microbes. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 23, p. 197-223, 2005.
- [48] LUSHCHAK, Volodymyr I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-biological interactions**, v. 224, p. 164-175, 2014.
- [49] ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A.C.R. Cultivo Celular. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde, v. 2. Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2010. v. 2.**
- [50] HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.
- [51] MORRIS, John H. et al. Affinity purification–mass spectrometry and network analysis to understand protein-protein interactions. **Nature protocols**, v. 9, n. 11, p. 2539-2554, 2014.
- [52] AEBERSOLD, Ruedi; MANN, Matthias. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 198-207, 2003.
- [53] "Searching uninterpreted MS/MS data". Disponível em: http://www.matrixscience.com/help/mis_help.html
- [54] TEO, Guoci et al. SAINTexpress: improvements and additional features in Significance Analysis of INTERactome software. **Journal of proteomics**, v. 100, p. 37-43, 2014.

- [55] MITEVA, Yana V.; BUDAYEVA, Hanna G.; CRISTEA, Ileana M. Proteomics-based methods for discovery, quantification, and validation of protein–protein interactions. **Analytical chemistry**, v. 85, n. 2, p. 749-768, 2012.
- [56] MOORKENS, Evelien et al. The market of biopharmaceutical medicines: a snapshot of a diverse industrial landscape. **Frontiers in pharmacology**, v. 8, 2017.
- [57] MONTEIRO, Lucas Falcão et al. DUSP3/VHR: A Druggable Dual Phosphatase for Human Diseases. 2018.
- [58] NGUYEN, Lan K. et al. Signalling by protein phosphatases and drug development: a systems-centred view. **The FEBS journal**, v. 280, n. 2, p. 751-765, 2013.
- [59] MAMBETSARIEV, Nurbek et al. Nuclear TRAF3 is a negative regulator of CREB in B cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 4, p. 1032-1037, 2016.
- [60] VAGENENDE, Vincent; YAP, Miranda GS; TROUT, Bernhardt L. Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol. **Biochemistry**, v. 48, n. 46, p. 11084-11096, 2009.
- [61] TIERNO, Marni Brisson et al. Development and optimization of high-throughput in vitro protein phosphatase screening assays. **Nature protocols**, v. 2, n. 5, p. 1134, 2007.
- [62] CUBILLOS-ROJAS, Monica et al. Tris–Acetate Polyacrylamide Gradient Gels for the Simultaneous Electrophoretic Analysis of Proteins of Very High and Low Molecular Mass. In: **Protein Electrophoresis**. Humana Press, Totowa, NJ, 2012. p. 205-213.
- [63] Contaminant Repository for Affinity Purification, CRAPome. Disponível em <http://crapome.org/>
- [64] COX, Jurgen et al. MaxLFQ allows accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction. **Molecular & cellular proteomics**, p. mcp. M113. 031591, 2014.
- [65] Calculate and draw custom Venn diagrams. Disponível em <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>
- [66] Molecular Biology Online Apps. Disponível em <http://www.molbiotools.com/listcompare.html>
- [67] GeneCards®: The Human Gene Database. Disponível em <https://www.genecards.org/>
- [68] Molecular Signatures Database, MSigDb. Disponível em <http://software.broadinstitute.org/gsea/msigdb>
- [69] MI, Huaiyu et al. Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. **Nature protocols**, v. 8, n. 8, p. 1551, 2013.
- [70] SHANNON, Paul et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome research**, v. 13, n. 11, p. 2498-2504, 2003.
- [71] CHIN, Chia-Hao et al. cytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome. **BMC systems biology**, v. 8, n. 4, p. S11, 2014.
- [72] BADER, Gary D.; HOGUE, Christopher WV. An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks. **BMC bioinformatics**, v. 4, n. 1, p. 2, 2003.
- [73] The Human Protein Atlas. Disponível em <http://www.proteinatlas.org/>
- [74] GIORDANO, Francesca et al. PI (4, 5) P2-dependent and Ca²⁺-regulated ER-PM interactions mediated by the extended synaptotagmins. **Cell**, v. 153, n. 7, p. 1494-1509, 2013.

- [75] LI, Zhipeng et al. A novel Rab10-EHBP1-EHD2 complex essential for the autophagic engulfment of lipid droplets. **Science advances**, v. 2, n. 12, p. e1601470, 2016.
- [76] GÖRLACH, Agnes et al. Calcium and ROS: a mutual interplay. **Redox biology**, v. 6, p. 260-271, 2015.
- [77] LEE, Seon-Jin et al. Mitochondrial dysfunction induces formation of lipid droplets as a generalized response to stress. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2013, 2013.
- [78] GENG, Qiudi et al. The Atypical Dual Specificity Phosphatase hYVH1 Associates with Multiple Ribonucleoprotein Particles. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 2, p. 539-550, 2017.
- [79] LICATA, Luana; ORCHARD, Sandra. The MIntAct project and molecular interaction databases. In: **Data Mining Techniques for the Life Sciences**. Humana Press, New York, NY, 2016. p. 55-69.
- [80] EIF2AK2 - Interferon-induced, double-stranded RNA-activated protein kinase. Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprot/P19525>
- [81] BELI, Petra et al. Proteomic investigations reveal a role for RNA processing factor THRAP3 in the DNA damage response. **Molecular cell**, v. 46, n. 2, p. 212-225, 2012.
- [82] KATANO-TOKI, Akiko et al. THRAP3 interacts with HELZ2 and plays a novel role in adipocyte differentiation. **Molecular endocrinology**, v. 27, n. 5, p. 769-780, 2013.
- [83] WISDOM, Ron; JOHNSON, Randall S.; MOORE, Connie. c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms. **The EMBO journal**, v. 18, n. 1, p. 188-197, 1999.
- [84] LEE, Amy SY; KRANZUSCH, Philip J.; CATE, Jamie HD. eIF3 targets cell-proliferation messenger RNAs for translational activation or repression. **Nature**, v. 522, n. 7554, p. 111, 2015.
- [85] JOHNSON, Michael et al. IQGAP1 translocates to the nucleus in early S-phase and contributes to cell cycle progression after DNA replication arrest. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 43, n. 1, p. 65-73, 2011.
- [86] REN, Jian-Guo; LI, Zhigang; SACKS, David B. IQGAP1 integrates Ca²⁺/calmodulin and B-Raf signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 34, p. 22972-22982, 2008.
- [87] TSANG, William Y. et al. CP110 cooperates with two calcium-binding proteins to regulate cytokinesis and genome stability. **Molecular biology of the cell**, v. 17, n. 8, p. 3423-3434, 2006.
- [88] FUJIMURA, Ken; KANO, Fumi; MURATA, Masayuki. Identification of PCBP2, a facilitator of IRES-mediated translation, as a novel constituent of stress granules and processing bodies. **Rna**, v. 14, n. 3, p. 425-431, 2008.
- [89] NADEZHDA, Elena S. et al. Microtubules govern stress granule mobility and dynamics. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1803, n. 3, p. 361-371, 2010.
- [90] LV, Junjie et al. Molecular cloning of a novel human gene encoding histone acetyltransferase-like protein involved in transcriptional activation of hTERT. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 311, n. 2, p. 506-513, 2003.
- [91] SHEN, Qi et al. NAT10, a nucleolar protein, localizes to the midbody and regulates cytokinesis and acetylation of microtubules. **Experimental cell research**, v. 315, n. 10, p. 1653-1667, 2009.

- [92] WONG, Richard W.; BLOBEL, Günter. Cohesin subunit SMC1 associates with mitotic microtubules at the spindle pole. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 40, p. 15441-15445, 2008.
- [93] CHOUDHARY, Chunaram et al. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. **Science**, v. 325, n. 5942, p. 834-840, 2009.
- [94] WANG, Chenran et al. Regulation of Integrin β 1 recycling to lipid rafts by Rab1a to promote cell migration. **Journal of Biological Chemistry**, p. jbc. M110. 141440, 2010.
- [95] WEI, Longxiao et al. MicroRNA-101 inhibits rat cardiac hypertrophy by targeting Rab1a. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 65, n. 4, p. 357-363, 2015.
- [96] LI, Wei-ming et al. Dual specific phosphatase 12 ameliorates cardiac hypertrophy in response to pressure overload. **Clinical Science**, p. CS20160664, 2016.
- [97] BAILLY, Eric et al. Phosphorylation of two small GTP-binding proteins of the Rab family by p34cdc2. **Nature**, v. 350, n. 6320, p. 715, 1991.
- [98] MALTY, Ramy H. et al. A map of human mitochondrial protein interactions linked to neurodegeneration reveals new mechanisms of redox homeostasis and NF- κ B signaling. **Cell systems**, v. 5, n. 6, p. 564-577. e12, 2017.
- [99] KEINAN, Nurit et al. The role of calcium in VDAC1 oligomerization and mitochondria-mediated apoptosis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1833, n. 7, p. 1745-1754, 2013.
- [100] CAMARA, Amadou KS et al. Mitochondrial VDAC1: a key gatekeeper as potential therapeutic target. **Frontiers in physiology**, v. 8, p. 460, 2017.
- [101] JAVADOV, Sabzali et al. Anti-hypertrophic effect of NHE-1 inhibition involves GSK-3 β -dependent attenuation of mitochondrial dysfunction. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 46, n. 6, p. 998-1007, 2009.
- [102] POPOW, Johannes et al. Analysis of orthologous groups reveals archease and DDX1 as tRNA splicing factors. **Nature**, v. 511, n. 7507, p. 104, 2014.
- [103] MARKMILLER, Sebastian et al. Context-dependent and disease-specific diversity in protein interactions within stress granules. **Cell**, v. 172, n. 3, p. 590-604. e13, 2018.
- [104] PRADEEPA, Madapura M. et al. Psip1/Ledgf p52 binds methylated histone H3K36 and splicing factors and contributes to the regulation of alternative splicing. **PLoS genetics**, v. 8, n. 5, p. e1002717, 2012.
- [105] SINGH, Parmit Kumar et al. LEDGF/p75 interacts with mRNA splicing factors and targets HIV-1 integration to highly spliced genes. **Genes & development**, v. 29, n. 21, p. 2287-2297, 2015.
- [106] SHINOHARA, Toshimichi; SINGH, Dharendra P.; FATMA, Nigar. LEDGF, a survival factor, activates stress-related genes. **Progress in retinal and eye research**, v. 21, n. 3, p. 341-358, 2002.
- [107] VAN LEUKEN, Renske J. et al. Usp39 is essential for mitotic spindle checkpoint integrity and controls mRNA-levels of aurora B. **Cell Cycle**, v. 7, n. 17, p. 2710-2719, 2008.
- [108] WISDOM, Ron; JOHNSON, Randall S.; MOORE, Connie. c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms. **The EMBO journal**, v. 18, n. 1, p. 188-197, 1999.

- [109] CHEN, Yi-Rong; MEYER, Christian F.; TAN, Tse-Hua. Persistent activation of c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) in γ radiation-induced apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 2, p. 631-634, 1996.
- [110] DHANASEKARAN, Danny N.; REDDY, E. Premkumar. JNK signaling in apoptosis. **Oncogene**, v. 27, n. 48, p. 6245, 2008.
- [111] BOSSY-WETZEL, Ella; BAKIRI, Latifa; YANIV, Moshe. Induction of apoptosis by the transcription factor c-Jun. **The EMBO journal**, v. 16, n. 7, p. 1695-1709, 1997.
- [112] MARIANI, Odette et al. JUN oncogene amplification and overexpression block adipocytic differentiation in highly aggressive sarcomas. **Cancer cell**, v. 11, n. 4, p. 361-374, 2007.)
- [113] WISDOM, Ron; JOHNSON, Randall S.; MOORE, Connie. c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms. **The EMBO journal**, v. 18, n. 1, p. 188-197, 1999.
- [114] YANG, Yong-Jin et al. The tumor suppressor, parafibromin, mediates histone H3 K9 methylation for cyclin D1 repression. **Nucleic acids research**, v. 38, n. 2, p. 382-390, 2009.
- [115] TAKAHASHI, Atsushi et al. SHP2 tyrosine phosphatase converts parafibromin/Cdc73 from a tumor suppressor to an oncogenic driver. **Molecular cell**, v. 43, n. 1, p. 45-56, 2011.
- [116] BRACKEN, Cameron P. et al. Regulation of cyclin D1 RNA stability by SNIP1. **Cancer research**, v. 68, n. 18, p. 7621-7628, 2008.
- [117] LECHERTIER, Tanguy et al. Fibrillarin and Nop56 interact before being co-assembled in box C/D snoRNPs. **Experimental cell research**, v. 315, n. 6, p. 928-942, 2009.
- [118] DUTTA, Bamaprasad et al. Profiling of the chromatin-associated proteome identifies HP1BP3 as a novel regulator of cell cycle progression. **Molecular & Cellular Proteomics**, p. mcp. M113. 034975, 2014.
- [119] DUTTA, Bamaprasad et al. Quantitative profiling of chromatome dynamics reveals a novel role for HP1BP3 in hypoxia-induced oncogenesis. **Molecular & Cellular Proteomics**, p. mcp. M114. 038232, 2014.
- [120] "PhosphoSitePlus". Disponível em: <https://www.phosphosite.org>
- [121] HUNG, Liang-Yi et al. Identification of a novel microtubule-destabilizing motif in CPAP that binds to tubulin heterodimers and inhibits microtubule assembly. **Molecular biology of the cell**, v. 15, n. 6, p. 2697-2706, 2004.
- [122] WERNER, Achim et al. Cell-fate determination by ubiquitin-dependent regulation of translation. **Nature**, v. 525, n. 7570, p. 523, 2015.
- [123] HAYANO, Toshiya et al. Proteomic analysis of human Nop56p-associated pre-ribosomal ribonucleoprotein complexes Possible link between Nop56p and the nucleolar protein treacle responsible for Treacher Collins syndrome. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 36, p. 34309-34319, 2003.

APÊNDICE – Figuras de imunofluorescência. Objetiva de 40x, microscópio DMI8, Leica. As legendas indicam a marcação, a célula, e o tratamento utilizado, com o tempo de coleta. NT = não-tratado, γ = radiação gama, Bleo = bleomicina.

A549

γ 6h

Bleo 2h

Bleo 6h

TCOF1

DUSP12

DAPI

MERGE

MCF-7

γ 6h

Bleo 2h

Bleo 6h

HP1BP3

DUSP12

DAPI

MERGE

MCF-7

γ 6h

Bleo 2h

Bleo 6h

CENPJ

DUSP12

DAPI

MERGE

MCF-7

γ 6h

Bleo 2h

Bleo 6h

TCOF1

DUSP12

DAPI

MERGE

ANEXO – Grupos de complexos moleculares identificados por análise de rede, utilizando o plugin MCODE. Em destaque estão as proteínas centrais de cada complexo.

A549		
Complexo 1	Complexo 2	Complexo 3
MYO18A	MISP	ATP5F1B
INF2	DYNC1LI1	CSNK2B
PABPC4	RFC2	NIPSNAP1
XRN2	EIF2AK2	EEF1G
CALM1	TPM4	PPP1CC
RRP1B	HNRNPH3	SRSF7
HSPD1	MCM2	MRT04
NAT10	GEMIN5	PCBP1
MYL6	SNRPD2	PPP1CC
CLTA	MYH9	OAS3
IQGAP1	ACTN1	RTRAF
MCM3		HNRNPAB
RFC4		HP1BP3
PLEC		BRX1
RFC3		SRSF6
		ABCF1
		RPS26
		GTPBP4
		THRAP3
		RBM28
		RPN1
		RPL23A
		HNRNPDL
		NOP56
		POLR1E
		POLR2E

MCF-7		
Complexo 1	Complexo 2	Complexo 3
RAD21	ESR2	PINX1
PDS5B	GTPBP4	NAT10
PDS5A	SRSF3	EIF2AK2
STAG1	TSR1	LYAR
WAPL	YWHAB	NOP58
SMC1A	SNRNP40	NOP56
SMC3	EIF4A3	ABCF1
	CHEK2	COX15
	YWHAB	
	RFC3	
	RFC5	
	IFIT2	
	RFC4	
	NPM1	
	PHB	
	SRPK2	
	KIF23	
	THOC1	
	HNRNPDL	
	SF3A2	
	SF3B2	
	SNRNP200	
	TARDBP	
	PSIP1	
	PRPF4B	
	EIF4G1	
	YWHAB	
	RFC2	
	PRPF8	
	NCBP1	
	HNRNPA1	
	USP39	
	PABPC4	
	GABARAPL1	
	MATR3	
	RPS6	
	RPL38	

Intersecção de células		
Complexo 1	Complexo 2	Complexo 3
TP53BP2	DYNC1LI1	PABPC4
RASSF9	RFC3	PRKAB1
PDS5B	HNRNPAB	HNRNPD
PPP1CC	IQGAP1	AHSA1
RUVBL2	MYC	EIF6
BHLHE40	RFC5	EXOSC10
CSNK2B	TPM4	GTPBP4
HNRNPA1	RTRAF	EEF1D
APEX1	DYNC1H1	OAS3
FN1	RRP12	XRN2
HNRNPA2B1	RFC2	ERH
RAB10	ESR2	
STAG1	RFC4	
GSTK1	MYH9	
PDS5A	COX15	
EIF3H		
HNRNPH3		
ILF2		
ILF3		
HSD17B10		
DDX39A		
STAG2		
EIF4G2		
SRPK2		
DDX41		

Total		
Complexo 1	Complexo 2	Complexo 3
WAPL	HNRNPH3	TUBB
PDS5B	MYO5C	RPS6
STAG1	EIF3D	CALM1
SMC1A	SNRPE	YWHAE
RAD21	EIF4A3	HNRNPU
SMC3	EIF3B	GTPBP4
PDS5A	INF2	MYO1B
	EIF3G	PTBP3
	ZC3H18	VDAC1
	ACTB	BASP1
	SNRPD2	PLEC
	MISP	NAT10
	EIF3I	NOP56
	EIF3H	NPM1
	IQGAP1	RPL19
	ACTR2	MYH9
	SNRPD1	CLTA
	CFL1	YWHAH
	SRPK1	KIF23
	CAPZA2	TPM3
	GEMIN2	RRP1B
	DBN1	ARPC2
	CHERP	NOP16
	PAIP1	FTSJ3
	EIF3C	DCAF7
	CFL2	
	SMN1	
	TPM1	
	ACTG1	
	THRAP3	
	DLD	
	HNRNPA0	

> 3 ocorrências		
Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3
GRB2	LEO1	CBX1
PLEC	RFC2	HNRNPDL
MYH9	EEF1D	MAP1LC3A
AP2B1	CDC73	NOP16
PLEC	DERL1	FBL
ACTR2	MCM3AP	PDHA1
SNW1	SUPT5H	NIPSNAP1
HSP90B1	CCDC155	DYNLL1
PLEKHA7	MAPK13	TIAL1
MAP3K3	RFC3	SHMT2
MYO18A	RFC5	RPS6
CALM1	HIST1H1C	BRIX1
INF2	YBX1	SLC25A3
PDLIM7	RFC4	MAPK6
MYO1B	RFC1	HNRNPH3
PPIA	UBE2A	DDX41
ESR1	TCF25	HP1BP3
	HTT	SMARCA5
	POLR2G	MAP1LC3B
	ARHGAP21	
	PAF1	
	CD59	

Amostras tratadas		
Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3
CAPZA2	MYO5C	DUX4
MYH9	MYO1B	SLC25A5
DBN1	ACTR2	ACTN1
IQGAP1	CLTA	GCN1
RNPS1	MYO19	NPM1
CDC5L	MISP	ESR1
THRAP3		RPL23A
MYO18A		RRP1B
LIMA1		VCAM1

Amostras não-tratadas		
Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3
SMC3	SNRPD2	FN1
PDS5B	GABARAP	GABARAPL1
SMC1A	GEMIN5	GH1
WAPL	STRAP	HIST1H4K
STAG1	DYNC1H1	HNRNPD
RAD21	LARP1	MCM3
PDS5A	YWHAQ	MYL6
	SNRPD1	OCRL
	DYNC1LI1	PRKAB1
	ABCF1	SF3B2
	HSPD1	SHMT2
	NOP56	CALM1
	HDGF	EIF1B
	SF3A2	GDI2
	NOP58	EIF4A3
	IFIT2	PCBP2
	CLNS1A	RAB1A
	ZC3H18	RIPK3
	TUBA1A	SNRPC
	IFIT1	TNFRSF1A
	GTPBP4	VHL
	PINX1	
	AURKAIP1	
	CDC5L	

UVB		
Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3
DBN1	WDR34	HIST1H3A
BASP1	DCAF7	HDAC11
ACTN1	STRN	SMC1A
DUX4	MORC3	GAR1
TPM4	ZNF609	DDX24
CLTA	DYNC1H1	EIF6
INF2	FAM83D	CSNK2B
HSP90AB1	SNCA	RPS6
ACTB	CSNK2A2	RNPS1
CAPZA2	KANK2	GABARAP
MYO18A	STK25	GCN1
ESR1	PRKACB	PPP2R1A
ACTR2	DYNC1LI1	HNRNPUL2
GRB2	HADHA	EIF3B
PPP1CB	PRKACA	HSD17B10
LIMA1	KANK1	JUN
MYH9	DYNC1I2	KDM1A
PPP1CC	PRKAR2A	APEX1
GTSE1	GPHN	MNDA
	FAM117B	
	MOB4	
	ZMYM3	
	FBXO38	
	DYNLL1	
	SPAG5	
	FBXO30	
	CTTNBP2NL	
	MTPAP	
	TP53BP1	
	IQCB1	
	PLEKHA7	
	CSNK2A1	
	DYNC1LI2	
	EML3	
	KNSTRN	
	DYNLRB1	
	YWHAZ	
	DYRK1B	
	DYRK1A	
	MTCL1	
	NAF1	
	NEK9	
	STRN3	
	CANX	
	STRN4	
	TRPS1	

Gama		
Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3
INF2	MYO1B	HNRNPA1
CAPZA2	CALM1	HSP90AB1
IQGAP1	PPP1CB	HNRNPH3
MISP	MYL6B	DUX4
LIMA1	ACTR2	MATR3
DBN1	MYH9	CBX1
CLTA	GRB2	USP39
	MYC	DDX41
	MYO5C	PRPF31
	MYO18A	HP1BP3
	TPM3	CTTN
		RPS6
		EIF2AK2
		BRX1
		CSNK1A1
		NPM1
		SNRPE
		SLC25A5
		ACTN1
		PSIP1
		MCM7
		RPL10
		COX15
		MYO19
		GCN1
		MNDA
		HNRNPDL
		NOP56
		RRP1B
		SF1
		RPL23A

Bleomicina		
Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3
NAP1L1	EIF3E	KDM4A
PPIA	NPM1	HNRNPDL
PDHA1	DHX29	MARK3
MYO1B	SMARCA5	RRP1B
HLA-B	RPL10	CNOT1
TPM3		SRSF7
MAP1LC3A		DDB1
RBM4		CAPZA1
VDAC1		RFC2
HBA1		