

**CRISTIANE LUMI HIRATA**

**Caracterização da Sumoilação de  
Maspina**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Nathalie Cella

Versão original

São Paulo  
2012

## RESUMO

HIRATA, C. L. **Caracterização da sumoilação de maspina**. 2012. 49 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Alterações pós-traducionais são fundamentais para as funções das proteínas, modulando sua atividade, localização subcelular e interações dinâmicas com outras proteínas. Nosso grupo vem explorando as propriedades biológicas da maspina, uma proteína da família das serpinas (*serine protease inhibitor*) que não inibe proteases. Um único gene foi descrito para maspina, no entanto foi observada uma grande diversidade de funções biológicas, como a modulação da adesão celular, inibição do crescimento e invasão tumoral, inibição da angiogênese, efeito pró-apoptótico e controle de resposta ao estresse oxidativo. Tantas funções se refletem nos seus inúmeros ligantes e na sua localização subcelular, já que é encontrada no núcleo, no citoplasma e na membrana plasmática. A grande diversidade de funções e localizações de uma proteína não pode ser justificada apenas por sua estrutura primária. Modificações pós-traducionais podem estar envolvidas. Sendo assim, o presente trabalho propôs caracterizar a alteração pós-traducional de maspina pela adição de SUMO. Verificou-se a presença de dois prováveis sítios de sumoilação, as lisinas 47 e 277 pelos programas de predição SUMOplot e SUMOsp. Além desses, um domínio de interação com resíduos sumoilados (*sumo binding domain*) que compreende os aminoácidos 156 a 159 também foi predito pelo programa GPS-SBM. Observando a estrutura tridimensional de maspina nas regiões acima mencionadas indica que essas são compatíveis e coerentes com a sumoilação de maspina. Ensaio de imunoprecipitação seguido de *immunoblot* sugere que maspina endógena é sumoilada na linhagem MCF-10A. Esses dados sugerem que sumoilação pode ter um importante papel na regulação das funções biológicas de maspina.

**Palavras-chave:** Mama. Maspina. Sumoilação. Análise *in silico*.

## ABSTRACT

HIRATA, C. L. **Characterization of Maspin Sumoylation**. 2012. 49 p. Masters thesis (Cell and Tissue Biology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Post-translational modifications are essential for proteins functions, modulating its activity, subcellular localization and dynamic interactions with other proteins. Our group has been studying maspin biological properties. Maspin belongs to the serpin (serine protease inhibitor) protein family, but it does not inhibit proteases. Only one gene has been described for maspin, however, a great diversity of biological functions have been observed, such modulation of cell adhesion, inhibition of tumor growth and invasion, inhibition of angiogenesis, pro-apoptotic effect and control of oxidative stress response. So many functions reflect on its several ligands and subcellular localization, because it is found in the nucleus, in the cytoplasm and on the plasma membrane. The great diversity of functions and localizations of a protein cannot be explained only by its primary structure, post-translational modifications could be involved. Therefore, the objective of this work was to characterize the post-translational modification of maspin by the addition of SUMO. Two putative sumoylation sites, lysine 47 and lysine 277, were predicted by the SUMOplot and SUMOsp prediction programs. In addition, a SUMO binding domain comprising amino acids 156 to 159 was predicted by the GPS-SBM program. Three dimensional structure visualization of maspin on the above mentioned domains indicate that these are compliant with Maspin sumoylation. Immunoprecipitation followed by immunoblot suggests that endogenous Maspin is sumoylated in the MCF-10A cell line. These data suggest that sumoylation may have an important role in the regulation of Maspin biological activities.

**Keywords:** Breast. Maspin. Sumoylation. *In silico* analysis.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Modificações pós-traducionais

As alterações que ocorrem após a tradução da proteína são conhecidas como modificações pós-traducionais (PTM, *post-translational modification*). As proteínas são moléculas que contêm uma ou mais cadeias polipeptídicas (VOET et al., 2000) que podem sofrer mudanças resultantes de adição ou remoção de grupamentos químicos a seus resíduos de aminoácidos. Ainda, as proteínas podem sofrer processamento proteolítico e a introdução de interações covalentes entre seus domínios (LARSEN et al., 2006). A sequência proteica primária por si só não é capaz de explicar as diversas funções biológicas ou mecanismo de regulação de determinadas proteínas (SEO; LEE, 2004), logo, as modificações sofridas após a tradução da proteína são importantes na regulação de suas funções biológicas. As PTM podem ocorrer de forma isolada ou combinada com outras modificações. As mais proeminentes PTM são a fosforilação de serina, treonina e tirosina; a ubiquitinação e sumoilação de lisina; metilação de lisina e arginina; isomerização de prolina (YANG; SETO, 2008) e hidroxilação de lisina e prolina dependente de vitamina C na formação de colágeno I. Além disso, a adição e remoção destas modificações são reguladas em função do estado fisiológico, por exemplo, em neuropatias, como a doença de Alzheimer (GONG et al., 2005); em doenças cardiovasculares (ARRELL; NEVEROVA; VAN EYK, 2001); diabetes (YAO et al., 2006) e da fase do desenvolvimento do indivíduo, como no envelhecimento (STADTMAN, 2001). Portanto, as alterações estruturais são processos fundamentais para regular as diversas funções que as proteínas assumem, determinando atividade, localização subcelular e interações dinâmicas com outras proteínas. Por sua similaridade, interação e importância neste trabalho os processos de ubiquitinação e sumoilação serão detalhados a seguir.

## 1.2 Ubiquitinação e sumoilação

A ubiquitinação é uma reação rápida e reversível que consiste na adição de uma

proteína, a ubiquitina, a um resíduo de lisina do substrato através de uma ligação isopeptídica. A primeira função descrita para a ubiquitinação foi o endereçamento da proteína ubiquitinada para a degradação pelo complexo do proteassoma (CIECHANOVER et al., 1980). Porém, a ubiquitinação também pode servir de sinal de reconhecimento e está envolvida na regulação das cascatas de sinalização intracelular (EMMERICH; SCHMUKLE; WALCZAK, 2011). A ubiquitina (Ub) é uma proteína de 8,5 kDa, constituída por 76 aminoácidos que como o nome já indica, está presente em todas as células eucarióticas. Destacam-se nessa proteína a cauda no C-terminal e sete resíduos de lisinas(K): K6, K11, K27, K29, K33, K48 e K63, sendo as duas últimas as mais estudadas, já que a K48 está relacionada à degradação de proteínas e a K63 ao tráfico de proteínas intracelulares, reparo de DNA e outras vias de sinalização não proteolíticas (EMMERICH; SCHMUKLE; WALCZAK, 2011).

Um dos processos mais relevantes regulados pela ubiquitinação é o ciclo celular. Os níveis das ciclinas e quinases dependentes de ciclinas (CDKs, cyclin-dependent kinases), proteínas que determinam a progressão do ciclo celular, são regulados pela ubiquitinação e consequente degradação (EMMERICH; SCHMUKLE; WALCZAK, 2011). Outro exemplo de regulação por ubiquitinação é a da proteólise lisossomal, na qual algumas moléculas precisam ser ligadas à ubiquitina para serem reconhecidas e endocitadas pela membrana plasmática (HICKE; RIEZMAN, 1996; KOLLING; HOLLENBERG, 1994). O translocamento de proteínas através da membrana plasmática geralmente necessita apenas da ligação de uma ubiquitina ao substrato (monoubiquitinação) (GREGORY; TANIGUCHI; D'ANDREA, 2003; HICKE; DUNN, 2003), enquanto que a degradação requer a poliubiquitinação, isto é, a ligação de uma cadeia de ubiquitinas (CIECHANOVER et al., 1980; HERSHKO; CIECHANOVER, 1982).

A ubiquitinação utiliza três enzimas: a ativadora E1, a conjugadora E2 e a ligadora E3, que liga a ubiquitina ao substrato. A E1 ativa a ubiquitina usando ATP formando o complexo E1-ubiquitina. Essa ubiquitina ativada é transferida para a enzima conjugadora E2 e depois para a enzima ligase E3 que vai transferí-la ao resíduo de lisina do substrato (HERSHKO; CIECHANOVER, 1982; HERSHKO; HELLER, 1985; PICKART, 2004). Vale destacar que são conhecidos aproximadamente 50 tipos de E2 e

um número ainda maior de ligases E3, que estão classificadas em dois grandes grupos: os que utilizam a ligação covalente (pelo domínio HECT E3) e os que não o fazem (principalmente pelo domínio RING E3) para ligar a ubiquitina ao resíduo de lisina do substrato. Cada tipo de E3 reconhece um grupo restrito de substratos e também um ou alguns tipos de E2, criando assim especificidade e independência de regulação da ubiquitinação de substratos distintos (PICKART, 2004). Outra classe de ligase recentemente descoberta, E4, medeia a elongação da cadeia de ubiquitina do substrato já previamente ubiquitinado (KOEGL et al., 1999; RICHLY et al., 2005).

Depois da análise de 135 sítios de ubiquitinação de 95 proteínas de leveduras, foi descoberto que os sítios de ubiquitinação são encontrados na superfície da molécula e residem em regiões de *loop* ou alças. Nesse mesmo artigo foi descoberta a sequência de aminoácidos “KEEE” que parece ser muito usada para a ligação de ubiquitinas em proteínas de leveduras (CATIC et al., 2004). Em outro trabalho, a análise do contexto estrutural dos sítios de ubiquitinação confirmou que esses sítios estavam preferencialmente localizados em regiões intrinsecamente desordenadas (IDR) (RADIVOJAC et al., 2010). Recentemente, outro grupo de pesquisadores estabeleceu uma sequência que pode estar ao redor dos sítios de ubiquitinação, chamado de *composition of k-spaced amino acid pairs* (CKSAAP) (CHEN et al., 2011). Essas informações possibilitaram o desenvolvimento de programas de predição dos sítios de ubiquitinação, facilitando a análise teórica de diversas proteínas.

Existem proteínas estruturalmente semelhantes à ubiquitina (Ubl – *ubiquitin-like proteins*) que compartilham o mesmo sítio de ligação em resíduos de lisina (SCHWARTZ; HOCHSTRASSER, 2003). Grande parte das Ubls conhecidas e estudadas são membros da família do SUMO (*small ubiquitin-related modifier*), proteínas de aproximadamente 11 kDa, que quando conjugadas a substratos mudam suas propriedades ou interações com outras proteínas efetoras pelo reconhecimento dos domínios específicos de interação (SUMO Protocols, 2009).

Vertebrados apresentam os genes para SUMO-1, SUMO-2 e SUMO-3. Em humanos, existe um quarto gene, SUMO-4, porém não está claro ainda se seu produto pode conjugar-se a outras proteínas. SUMO-1, 2 e 3 são expressos em todos os tecidos e em todas as fases de desenvolvimento, enquanto que SUMO-4 parece estar restrita

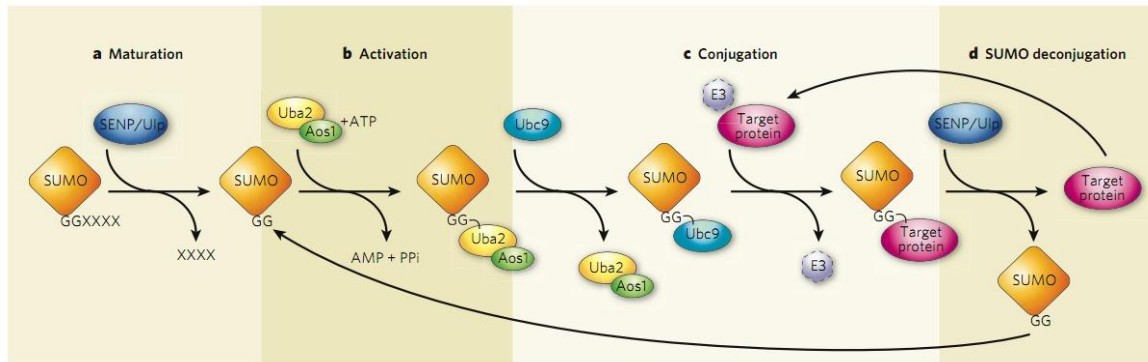
ao rim e baço (MEULMEESTER; MELCHIOR, 2008). SUMO-1 tem funções distintas de SUMO-2/3. Estes, por sua vez, parecem ser funcionalmente idênticos, estão relacionados às condições de estresse (SAITOH; HINCHEY, 2000) e formação de cadeias de SUMO (MEULMEESTER; MELCHIOR, 2008). Enquanto há uma grande quantidade de SUMO-2/3 livres na célula, a maior parte do SUMO-1 se encontra conjugada a proteínas (MATUNIS et al., 1996; SAITOH; HINCHEY, 2000). Além disso, embriões de camundongos deficientes em SUMO-1 não são viáveis, indicando que SUMO-2/3 não podem compensar a deficiência de SUMO-1 (MEULMEESTER; MELCHIOR, 2008). É importante destacar que as enzimas da via do SUMO são homólogas às da via da ubiquitinação, porém são específicas para este propósito.

A adição de SUMO (ou sumoilação) é um processo rapidamente reversível e que necessita de energia. Assim como a ubiquitina, SUMO é produzido como uma proteína precursora imatura com um apêndice C-terminal que precisa ser processado para expor o C-terminal di-glicina para ser adicionado ao substrato. Isto é feito por uma única classe de enzimas responsáveis pela quebra da ligação isopeptídica chamada SENPs (*SUMO-Specific Proteases*).

A sumoilação começa com uma enzima ativadora de SUMO (também chamada de E1), que realiza a ativação dependente de ATP do C-terminal de SUMO. Esse SUMO ativado é então transferido para uma enzima conjugadora de SUMO chamada Ubc9 (ou E2). SUMO então é transferido de Ubc9 para o substrato com a assistência de uma das inúmeras SUMO ligases (E3s) (JOHNSON, 2004).

A figura 1 mostra esquematicamente as principais etapas da conjugação e clivagem de SUMO.

**Figura 1 - Passos da sumoilação.**



**A, Maturação.** SUMO recém sintetizado é imaturo já que não consegue se ligar aos seus alvos até que dois resíduos de glicinas (GG) perto do seu C-terminal sejam expostos. A reação que remove os resíduos carboxila (representados por XXXX) é mediada por enzimas proteolíticas específicas de SUMO - SENP proteases em mamíferos e Ulp em leveduras. **b, Ativação.** SUMO maduro é então ativado em uma etapa que consome energia (ATP) pela enzima ativadora E1 (Aos1-Uba2). **c, Adição de SUMO.** Em seguida, SUMO é transferido para a enzima conjugadora E2 (Ubc9). Na última etapa, o grupo carboxila do resíduo de glicina no C-terminal de SUMO forma uma ligação isopeptídica com o grupo amino de um resíduo de lisina da sua proteína-alvo. Essa etapa normalmente é facilitada por ligases E3, mas alguns alvos são eficientemente sumoilados somente com E2. **d, Clivagem de SUMO.** A sumoilação é um processo reversível, porque proteases específicas de SUMO da família das SENP/Ulp clivam a ligação de isopeptídica entre SUMO e seu alvo.

Fonte: Meulmeester e Melchior, 2008.

Os resíduos de lisina aos quais SUMO é conjugado estão frequentemente na sequência consenso  $\Psi$ KXE, onde  $\Psi$  é um aminoácido hidrofóbico grande, geralmente isoleucina, leucina, ou valina; K é a lisina a ser modificada; X é qualquer resíduo e E é um resíduo de ácido glutâmico. Sabe-se que a fosforilação de diversos substratos afeta a SUMOilação dos mesmos de forma negativa na maioria dos casos, como ocorre com c-jun, PML (*promyelocyticleukemiaprotein*) e I $\kappa$ B $\alpha$  (*inhibitor of nuclear factor kappa beta*) (DESTERRO; RODRIGUEZ; HAY, 1998; EVERETT et al., 1999; SEELER; DEJEAN, 2003). Além disso, resíduos de lisina também são alvos de outras modificações pós-traducionais como acetilação, ubiquitinação, metilação e, portanto, é provável que exista uma competição por estes resíduos.

Dentre os processos biológicos regulados pela sumoilação destacam-se a transcrição gênica, a organização e função de cromossomos, o reparo de DNA e o transporte núcleo-citoplasma. SUMO pode regular a transcrição quando está conjugado a fatores de transcrição que estão associados a promotores específicos ou quando



esses estão associados a corpúsculos nucleares PML (estruturas subnucleares relacionadas à montagem e modificações da maquinaria de transcrição). PML-NB (*promyelocytic leukemia protein nuclear bodies*) são estruturas predominantemente ligadas à matrix nuclear que podem sequestrar e liberar proteínas, mediar suas alterações pós-traducionais e promover eventos nucleares específicos em resposta à variados estresses celulares. Dados sugerem que PML-NBs são heterogêneos em sua composição, mobilidade e função. A proteína PML é a organizadora desses domínios que recrutam um número cada vez maior de proteínas, cuja principal característica é a de estarem sumoiladas (BERNARDI; PANDOLFI, 2007). PML-NBs são reguladas por estresses celulares como infecções virais (EVERETT, 2006), dano ao DNA, transformação (GURRIERI et al., 2004; KOKEN et al., 1995; TERRIS et al., 1995;) e estresse oxidativo. A sumoilação de fatores de transcrição está associada muitas vezes à repressão da expressão gênica, já que mutações que previnem a conjugação de SUMO a diversos fatores de transcrição resultam no aumento da expressão de seus genes-alvo (SEELER; DEJEAN, 2003).

O transporte nuclear também é regulado pela sumoilação. A proteína RanGAP1, proteína ativadora da proteína Ran (uma GTPase), tem papel central no transporte núcleo-citoplasmático. RanGAP1 conjugada ao SUMO liga-se fortemente ao complexo do poro nuclear, fato crucial para a importação nuclear, já que RanGAP1 solúvel não é capaz de substituir SUMO-RanGAP1 (MAHA et al., 1997). De fato, a grande maioria de proteínas sumoiladas é nuclear, compartimento no qual ocorrem grande parte das funções após a sumoilação, apesar de haver muitas proteínas conjugadas no citoplasma. Ainda, em *S. cerevisiae* o transporte nuclear é comprometido em mutantes para proteínas da via de sumoilação e em mamíferos os sítios de sumoilação são essenciais para a localização nuclear das proteínas (COMERFORD et al., 2003; LIN et al., 2003).

Surpreendentemente, a sumoilação também pode regular a ubiquitinação, controlando indiretamente a degradação de proteínas pelo proteasoma. Isso é feito através de *SUMO-targeted ubiquitin ligases* (STUbL) que contém múltiplas sequências de interação com SUMO conservadas (*SUMO interacting motifs* - SIM). Essas ligases se ligam por meio dessas SIM à proteínas polisumoiladas, adicionam ubiquitinas a elas

e conseqüentemente endereçam-nas para a degradação (PRAEFCKE; HOFMANN; DOHMEN, 2012). Os SIM são importantes sítios de interação não covalente com SUMO, afetando o reparo de DNA, ativação da transcrição, formação do corpo nuclear e o *turnover* de proteínas. A sequência consenso de interação da SIMs foi definida como (V/I-X-V/I-V/I), porém já foram encontradas outras sequências completamente diferentes, sendo que a principal característica mantida é ter um centro hidrofóbico. Tanto é que se um aminoácido hidrofóbico é mutado, a interação com SUMO é reduzida. A TDG (Thymine DNA Glycosylase), enzima que participa do reparo de DNA removendo timinas e uracilas pareadas erroneamente, depende de uma interação intramolecular entre um SUMO conjugado e um SIMs para que a sua interação com o DNA seja liberada (BABA et al., 2005; KERSCHER, 2007). Quanto à localização e formação de corpo nuclear, TDG interage com a proteína PML que serve de “esqueleto” para os corpos nucleares, tem funções essenciais na supressão de tumores e recruta outras proteínas envolvidas na transcrição e resposta ao dano ao DNA (BORDEN, 2002). A própria proteína PML tem SIMs e um domínio E3 ligase o que sugere que ela pode se auto-sumoilar e com isso atrair outras proteínas que podem se ligar ao SUMO, formando os corpos nucleares de PML (PML-NB). Um ponto importante a ser destacado é que quando a enzima TDG perde o domínio SIM, não é mais sumoilada apesar de ainda manter a sequência consenso de ligação à SUMO. Isso sugere que a interação de SUMO com o domínio SIM da proteína acontece antes da ligação covalente de SUMO. É possível então que se a sumoilação não acontecer nos sítios consenso, SUMO pode estar ligado (não covalentemente) à uma proteína por esses domínios.

Em todos os processos até agora descritos, a sumoilação resulta na alteração das interações entre a proteína conjugada a SUMO e os seus ligantes. Nestas interações, SUMO pode interagir diretamente com a proteína, ou alterar a conformação do substrato, expondo ou ocultando o sítio de ligação da proteína modificada a outras proteínas ou ao DNA (JOHNSON, 2004; MEULMEESTER; MELCHIOR, 2008). Assim, a sumoilação é um importante e versátil regulador da função de proteínas nos mais variados processos celulares.

### 1.3 Maspina

A maspina (*mammary serpin*) é uma proteína de 42 kDa pertencente à superfamília das serpinas (*serine protease inhibitor*), devido à similaridade de sequências. Essa proteína foi identificada quando se procurava por genes expressos em células epiteliais mamárias normais, porém ausentes em tumores de mama (ZOU et al., 1994). Por essa descoberta e por muitos trabalhos subsequentes, maspina é conhecida como um gene supressor de alguns tipos de tumores (carcinoma mamário, ovariano, prostático). Sabe-se hoje que esta molécula está presente em inúmeros outros tecidos, tais como pele, próstata, intestino delgado, pulmão, timo (ZHANG et al., 1997), placenta (KHALKHALI-ELLIS, 2006) e cólon (PEMBERTON et al., 1997).

Com relação ao papel de maspina durante o desenvolvimento, o trabalho de Gao (2004) mostrou que o gene de maspina é essencial na fase inicial da embriogênese, uma vez que camundongos *knockout* para maspina não sobrevivem além do período de peri-implantação (GAO et al., 2004). Os animais heterozigotos, ainda que viáveis, apresentam alterações hormonais, têm a fertilidade reduzida e apresentam lesões na pele (SHI; LYDON; ZHANG, 2004). Além disso, maspina é importante para o desenvolvimento da glândula mamária, e seu efeito depende do estágio de desenvolvimento, isto é, maspina só é ativada durante a gravidez e a lactação (ZHANG et al., 1999).

Apesar de maspina pertencer à família das serpinas, seu mecanismo de ação independe da inibição de proteases (BASS; FERNANDEZ; ELLIS, 2002; PEMBERTON et al., 1995), ou seja, ela é uma serpina não-inibitória, assim como ovalbumina e PAI-2. Quando maspina é adicionada como proteína recombinante ou quando é transfectada em células, ela apresenta vários efeitos biológicos, principalmente em células cancerígenas da mama e da próstata. Entre os efeitos biológicos da maspina estão a modulação da adesão (CELLA et al., 2006), a inibição do crescimento e a invasão tumoral (SHENG et al., 1996; SHI, et al., 2001; ZOU et al., 1994), a inibição da angiogênese (CHER et al., 2003; ZHANG et al., 2000), o efeito pró-apoptótico (LATHA et al., 2005) e o controle da resposta ao estresse oxidativo (YIN et al., 2005) e o controle da transcrição gênica (GOULET et al., 2011; LI et al., 2006). Esta diversidade

de funções se reflete nos inúmeros ligantes de maspina e na sua localização subcelular, já que é encontrada na membrana plasmática, no citoplasma e no núcleo. Entre os ligantes estão a deacetilase de histona H1 (LI et al., 2006), IRF6 (*interferon regulatory factor6*) (BAILEY et al., 2005), GST, HSP90 e HSP70 (YIN et al., 2005),  $\beta$ 1 integrina (CELLA et al., 2006), uPAR (*urokinase-type plasminogen activator receptor*) (YIN et al., 2006) e colágeno tipo I e III (BLACQUE; WORRALL, 2002).

Em muitos tecidos verifica-se que a transformação maligna está relacionada à perda da expressão do gene de maspina resultante da metilação do seu promotor (FUTSCHER et al., 2002). Em tumores de mama, órgão em que maspina é bastante estudada, observou-se que maiores níveis celulares de expressão de maspina estão correlacionados a um melhor prognóstico. O mesmo ocorre para o carcinoma epidermóide (XIA et al., 2000), de ovário (BAUERSCHLAG et al., 2010), renal (BLANDAMURA et al., 2006) entre outros. Porém, outros trabalhos obtiveram resultados divergentes desses, mostrando que a expressão de maspina está relacionada a um pior prognóstico clínico (MAASS et al., 2001; MOHSIN et al., 2003; SMITH et al., 2003; SOOD et al., 2002; UMEKITA et al., 2002). Muitos desses estudos clínicos relatam que maspina citoplasmática está associada a um mal prognóstico enquanto que maspina nuclear representa o oposto (DIETMAIER et al., 2006; LONARDO et al., 2006; MOHSIN et al., 2003). Estudo recente de Goulet et al. (2011) ressalta que a localização subcelular de maspina é um melhor indicativo da progressão tumoral do que seus níveis de expressão. Verificou-se que o efeito supressor de metástase é perdido se maspina for excluída do núcleo em células de carcinoma, e o estudo sugere que parte deste efeito está associado à atividade de fator de transcrição de maspina, como ocorre para o gene CSF-1 (fator estimulante de colônia 1) que tem papel na progressão tumoral e metástase em tumores de mama (BECK et al., 2009).

Apesar da localização e diversidade de funções, só um gene e uma proteína de maspina foram descritos. Isto nos leva a pensar que maspina provavelmente passa por modificações pós-traducionais para poder exercer tantos efeitos biológicos e estar em diversos compartimentos da célula. Nosso grupo está investigando o mecanismo molecular que regula a localização subcelular de maspina, já que esse fato está diretamente relacionado com a sua atividade supressora de tumor, como descrito

acima. Para tanto estamos buscando um sinal de localização nuclear essencial para a sua translocação para o núcleo assim como possíveis alterações pós-traducionais que possam estar regulando o tráfico de maspina para o núcleo.

Uma alternativa disponível e imediata é utilizar programas de predição de modificações pós-traducionais. Recentemente, aliando os avanços das tecnologias de cromatografia (principalmente colunas conjugadas com anticorpos) e espectrometria de massa, obteve-se uma quantidade maior de dados experimentais de diversas proteínas modificadas após a tradução, inclusive de proteínas fosforiladas. Com uma base de dados maior, observou-se os padrões de sequência de aminoácidos apresentados por essas proteínas fosforiladas. A partir disso, criaram-se algoritmos estatísticos, como por exemplo, o MotifX, capazes de prever os prováveis sítios de fosforilação de uma proteína pela sua sequência primária, levando em consideração também a hidrofobicidade dos aminoácidos adjacentes (SCHWARTZ; GYGI, 2005). Algoritmos mais recentes também consideram a estrutura 3D e propriedades bioquímicas dos aminoácidos, como o GPS (*Group-based Prediction System*) (REN et al., 2009).

Alguns trabalhos já demonstraram que a maspina sofre modificações pós-traducionais como a fosforilação (NARAYAN; MIRZA; TWINING, 2011), a nitrosilação (LAM et al., 2010) e a formação de pontes dissulfeto (NAWATA et al., 2011). O papel biológico dessas modificações ainda é desconhecido. Nosso grupo mostrou que a fosforilação de maspina esta associada à sua localização subcelular, já que o tratamento das células com pervanadato de sódio resulta em seu acúmulo no citoplasma (LONGHI; CELLA, 2012).

Como já descrito anteriormente, na maioria dos casos, a sumoilação só ocorre quando uma sequência primária consenso é encontrada na proteína-alvo. Utilizando esse conhecimento, dados experimentais e um ou os dois algoritmos descritos acima respectivamente, os programas de predição SUMOplot™ e o Software (SUMOsp, 2009) foram desenvolvidos e empregados como ferramentas para uma análise rápida, porém apenas indicativa de que a sumoilação pode acontecer, necessitando de confirmação experimental.

O mesmo raciocínio vale para a ubiquitinação, sendo que o programa de predição UbPred (RADIVOJAC et al., 2010) se diferencia por utilizar linhagens de

leveduras mutadas para aumentar a detecção de proteínas de curta duração e o programa CKSAAP\_UBSITE (CHEN et al., 2011) além de utilizar a sequência de aminoácidos que está em volta da lisina para prever a ubiquitinação, foi ajustado para reconhecer sítios ubiquitinados e não ubiquitinados.

É interessante também destacar que a interação de SUMO com proteínas pode estar acontecendo também por domínios de interação de SUMO (SIMs) que foram descritos como tendo a sequência consenso (V/I-X-V/I-V/I), porém ela é muito mais flexível e variável, mantendo apenas a característica hidrofóbica para que a interação aconteça. Do mesmo modo que a sumoilação e a ubiquitinação, a probabilidade de interação com SIM também pode ser avaliada por programa de predição.

Lembrando que SUMO está envolvido no transporte citoplasma-núcleo, e considerando estudos recentes que ressaltam a associação e o sinergismo entre a fosforilação e a sumoilação (GUO et al., 2012; TREMBLAY et al., 2008; ULRICH, 2012; YAO et al., 2011) existe a possibilidade de que SUMO possa estar regulando de alguma forma a importação de maspina ao núcleo, e a fosforilação pode estar ajudando nesse processo positiva ou negativamente, isto é, impedindo ou ativando esse transporte (NARDOZZI; LOTT; CINGOLANI, 2010). É interessante pensar também que essa regulação pode estar sendo comandada primeiro pela sumoilação e depois por fosforilação ou vice-versa.

Recentemente descobriu-se que existem sinais de importação nuclear não-canônicos que são reconhecidos pela importina  $\alpha$ . Como maspina não tem um sinal de localização nuclear (NLS, sigla em inglês) clássico e é encontrada no núcleo, ela provavelmente possui um desses sinais. A avaliação da presença desses sítios não-clássicos pode ser feita através do programa de predição *cNLS Mapper* que calcula o quanto forte pode ser a atividade do NLS. Isto é, ele calcula se a proteína estará localizada predominantemente no núcleo, no citoplasma ou em ambos. Os NLS são caracterizados por possuírem em sua sequência os aminoácidos básicos lisina (K) ou arginina (R) essenciais para o endereçamento da proteína ao núcleo. Além disso, eles podem estar agrupados em um único grupo (monopartidos) ou em dois grupos (bipartidos), separados por uma sequência *linker* de 10-12 resíduos se for clássico ou por mais de 12 resíduos se for não clássico. As sequências clássicas de NLS tem

grande variação: K(R/K)X(R/K), KR(R/X)K, KRRR, KR(K/R)R e K(K/R)RK para os monopartidos e (K/R)(K/R)X<sub>10–12</sub>(K/R)<sup>3/5</sup>, KRX<sub>10–12</sub>KRRK, KR X<sub>10–12</sub>K(K/R)(K/R) e KRX<sub>10–12</sub>K(K/R)X(K/R) para os bipartidos. Sendo que as sequências não clássicas são totalmente diferentes dessas, como a de PEDF, uma serpina não-inibitória como maspina (ANGUISSOLA et al., 2011)

Alme do comparar este trabalho com outros pré-existentes, foi feita uma busca nos bancos de dados disponíveis pela internet, porém poucos trabalhos que relacionem maspina e SUMO foram encontrados. Usando as palavras-chave: “maspin” e “SUMO” nenhum artigo foi encontrado no banco de dados MEDLINE utilizando a ferramenta PubMed até o dia 22 de novembro de 2012. Utilizando as mesmas palavras-chave, no portal de busca integrada SIBI (Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade de São Paulo) resultou em 12 artigos, porém nenhum deles relaciona diretamente maspina e SUMO.

Após pesquisa minuciosa, encontrou-se um trabalho de proteômica que visou estudar se diversas proteínas que eram sumoiladas. Seus dados brutos mostraram que maspina é substrato de SUMO-2, mas sua sumoilação não foi detectada após sofrer choque térmico (GOLEBIEWSKI et al., 2009).

Assim, este projeto teve como objetivo caracterizar a possível alteração da molécula de maspina por SUMO. Este estudo poderá reconciliar as divergências na literatura sobre as funções de maspina (KHALKHALI-ELLIS, 2006) além de contribuir de forma significativa para a melhor compreensão das inúmeras funções celulares das quais maspina participa.

## 5 CONCLUSÃO

As análises *in silico* feitas pelos programas de predição e visualização nos forneceram fortes indícios de que maspina pode ser sumoilada. Nossos dados experimentais sugerem que Maspina pode ser sumoilada endogenamente.



## REFERÊNCIAS\*

- ANGUISSOLA, S. et al. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) interacts with transportin SR2, and active nuclear import is facilitated by a novel nuclear localization motif. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. e26234, 2011.
- ARRELL, D. K.; NEVEROVA, I.; VAN EYK, J. E. Cardiovascular proteomics: evolution and potential. **Circ. Res.**, v. 88, n. 8, p. 763-773, 2001.
- BABIC, I.; CHERRY, E.; FUJITA, D. J. SUMO modification of Sam68 enhances its ability to repress cyclin D1 expression and inhibits its ability to induce apoptosis. **Oncogene**, v. 25, n. 36, p. 4955-4964, 2006.
- BAILEY, C. M. et al. Mammary serine protease inhibitor (Maspin) binds directly to interferon regulatory factor 6: identification of a novel serpin partnership. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 40, p. 34210-34217, 2005.
- BASS, R.; FERNANDEZ, A. M.; ELLIS, V. Maspin inhibits cell migration in the absence of protease inhibitory activity. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 49, p. 46845-46848, 2002.
- BAUERSCHLAG, D. O. et al. Heterogeneous expression of serine protease inhibitor maspin in ovarian cancer. **Anticancer Res.**, v. 30, n. 7, p. 2739-2744, 2010.
- BECK, A. H. et al. The macrophage colony-stimulating factor 1 response signature in breast carcinoma. **Clin. Cancer Res.**, v. 15, n. 3, p. 778-787, 2009.
- BERNARDI, R.; PANDOLFI, P. P. Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 8, n. 12, p. 1006-1016, 2007.
- BLACQUE, O. E.; WORRALL, D. M. Evidence for a direct interaction between the tumor suppressor serpin, maspin, and types I and III collagen. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 13, p. 10783-10788, 2002.
- BLANDAMURA, S. et al. Nuclear maspin detection in renal cell tumours: possible diagnostic role and correlation with p53 status. **Histopathology**, v. 49, n. 3, p. 274-282, 2006.
- BORDEN, K. L. Pondering the promyelocytic leukemia protein (PML) puzzle: possible functions for PML nuclear bodies. **Mol. Cell Biol**, v. 22, n. 15, p. 5259-5269, 2002.
- CAI, Y. et al. Prediction of lysine ubiquitination with mRMR feature selection and analysis. **Amino Acids**, v. 42, n.4, p. 1387-1395, 2012.

\*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CATIC, A. et al. Preferred in vivo ubiquitination sites. **Bioinformatics**, v. 20, n. 18, p. 3302-3307, 2004.

CELLA, N. et al. Maspin is physically associated with [beta]1 integrin regulating cell adhesion in mammary epithelial cells. **Faseb J.**, v. 20, n. 9, p. 1510-1512, 2006.

CHEN, Z. et al. Prediction of ubiquitination sites by using the composition of k-spaced amino acid pairs. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e22930, 2011.

CHER, M. L. et al. Maspin expression inhibits osteolysis, tumor growth, and angiogenesis in a model of prostate cancer bone metastasis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 100, n. 13, p. 7847-7852, 2003.

CIECHANOVER, A. et al. ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 77, n. 3, p. 1365-1368, 1980.

Cn3D. Version 4.3. Hogue: NCBI. 2012. Software. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3d.shtml>>. Acesso em: 29 novembro 2012.

COMERFORD, K. M. et al. Small ubiquitin-related modifier-1 modification mediates resolution of CREB-dependent responses to hypoxia. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 100, n. 3, p. 986-991, 2003.

DESTERRO, J. M.; RODRIGUEZ, M. S.; HAY, R. T. SUMO-1 modification of I $\kappa$ B $\alpha$  inhibits NF- $\kappa$ B activation. **Mol. Cell**, v. 2, n. 2, p. 233-239, 1998.

DIETMAIER, W. et al. Nuclear Maspin expression is associated with response to adjuvant 5-fluorouracil based chemotherapy in patients with stage III colon cancer. **Int. J. Cancer**, v. 118, n. 9, p. 2247-2254, 2006.

EMMERICH, C. H.; SCHMUKLE, A. C.; WALCZAK, H. The Emerging Role of Linear Ubiquitination in Cell Signaling. **Sci. Signal.**, v. 4, n. 204, p. re5, 2011.

EVERETT, R. D. Interactions between DNA viruses, ND10 and the DNA damage response. **Cell Microbiol.**, v. 8, n. 3, p. 365-374, 2006.

EVERETT, R. D. et al. Cell cycle regulation of PML modification and ND10 composition. **J. Cell Sci.**, v. 112 ( Pt 24), p. 4581-4588, 1999.

FUTSCHER, B. W. et al. Role for DNA methylation in the control of cell type specific maspin expression. **Nat. Genet.**, v. 31, n. 2, p. 175-179, 2002.

GAO, F. et al. Maspin plays an essential role in early embryonic development. **Development**, v. 131, n. 7, p. 1479-1489, 2004.

GOLEBIEWSKI, F. et al. System-wide changes to SUMO modifications in response to heat shock. **Sci. Signal**, v. 2, n. 72, p. ra24, 2009.

GONG, C. X. et al. Post-translational modifications of tau protein in Alzheimer's disease. **J. Neural Transm.**, v. 112, n. 6, p. 813-838, 2005.

GPS-SBM©. Version 1.0. The CUCKOO Workgroup. 2006-2009. Software. Disponível em: <<http://sbm.biocuckoo.org>>. Acesso em: 29 novembro 2012.

GREGORY, R. C.; TANIGUCHI, T.; D'ANDREA, A. D. Regulation of the Fanconi anemia pathway by monoubiquitination. **Semin. Cancer Biol.**, v. 13, n. 1, p. 77-82, 2003.

GUO, Z. et al. Sequential posttranslational modifications program FEN1 degradation during cell-cycle progression. **Mol. Cell**, v. 47, n. 3, p. 444-456, 2012.

GURRIERI, C. et al. Loss of the tumor suppressor PML in human cancers of multiple histologic origins. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 96, n. 4, p. 269-79, 2004.

HERSHKO, A.; CIECHANOVER, A. Mechanisms of intracellular protein breakdown. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 51, p. 335-64, 1982.

HERSHKO, A.; HELLER, H. Occurrence of a polyubiquitin structure in ubiquitin-protein conjugates. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 128, n. 3, p. 1079-86, 1985.

HICKE, L.; DUNN, R. Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 19, p. 141-172, 2003.

HICKE, L.; RIEZMAN, H. Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis. **Cell**, v. 84, n. 2, p. 277-287, 1996.

JOHNSON, E. S. Protein modification by SUMO. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 73, p. 355-382, 2004.

KERSCHER, O. SUMO junction-what's your function? New insights through SUMO-interacting motifs. **EMBO Rep.**, v. 8, n. 6, p. 550-555, 2007.

KHALKHALI-ELLIS, Z. Maspin: the new frontier. **Clin. Cancer Res.**, v. 12, n. 24, p. 7279-7283, 2006.

KOEGEL, M. et al. A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. **Cell**, v. 96, n. 5, p. 635-644, 1999.

KOKEN, M. H. et al. The PML growth-suppressor has an altered expression in human oncogenesis. **Oncogene**, v. 10, n. 7, p. 1315-1324, 1995.

KOLLING, R.; HOLLENBERG, C. P. The ABC-transporter Ste6 accumulates in the plasma membrane in a ubiquitinated form in endocytosis mutants. **Embo J.**, v. 13, n. 14, p. 3261-3271, 1994.

KOSUGI, S. et al. Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin alpha. **J. Biol. Chem.**, v. 284, n. 1, p. 478-485, 2009.

LAM, Y. W. et al. Comprehensive identification and modified-site mapping of S-nitrosylated targets in prostate epithelial cells. **PLoS One**, v. 5, n. 2, p. e9075, 2010.

LARSEN, M. R. et al. Analysis of posttranslational modifications of proteins by tandem mass spectrometry. **Biotechniques**, v. 40, n. 6, p. 790-798, 2006.

LATHA, K. et al. Maspin mediates increased tumor cell apoptosis upon induction of the mitochondrial permeability transition. **Mol. Cell Biol.**, v. 25, n. 5, p. 1737-1748, 2005.

LAW, R. H. et al. The high resolution crystal structure of the human tumor suppressor maspin reveals a novel conformational switch in the G-helix. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 23, p. 22356-22364, 2005.

LI, X. et al. Endogenous inhibition of histone deacetylase 1 by tumor-suppressive maspin. **Cancer Res.**, v. 66, n. 18, p. 9323-9329, 2006.

LIN, X. et al. Opposed regulation of corepressor CtBP by SUMOylation and PDZ binding. **Mol. Cell**, v. 11, n. 5, p. 1389-1396, 2003.

LONARDO, F. et al. Maspin nuclear localization is linked to favorable morphological features in pulmonary adenocarcinoma. **Lung Cancer**, v. 51, n. 1, p. 31-39, 2006.

MAASS, N. et al. Expression of the tumor suppressor gene Maspin in human pancreatic cancers. **Clin. Cancer Res.**, v. 7, n. 4, p. 812-807, 2001.

MACAULEY, M. S. et al. Structural and dynamic independence of isopeptide-linked RanGAP1 and SUMO-1. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 47, p. 49131-49137, 2004.

MAHA, R. et al. A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. **Cell**, v. 88, n. 1, p. 97-107, 1997.

MATUNIS, M. J.; COUTAVAS, E.; BLOBEL, G. A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. **J. Cell Biol.**, v. 135, n. 6, pt. 1, p. 1457-1470, 1996.

MEULMEESTER, E.; MELCHIOR, F. Cell biology: SUMO. **Nature**, v. 452, n. 7188, p. 709-711, 2008.

MOHSIN, S. K. et al. Maspin expression in invasive breast cancer: association with other prognostic factors. **J. Pathol.**, v. 199, n. 4, p. 432-435, 2003.

NARAYAN, M.; MIRZA, S. P.; TWINING, S. S. Identification of phosphorylation sites on extracellular corneal epithelial cell maspin. **Proteomics**, v. 11, n. 8, p. 1382-1390, 2011.

NARDOZZI, J. D.; LOTT, K.; CINGOLANI, G. Phosphorylation meets nuclear import: a review. **Cell Commun. Signal.**, v. 8, p. 32, 2010.

NAWATA, S. et al. Evidence of post-translational modification of the tumor suppressor maspin under oxidative stress. **Int. J. Mol. Med.**, v. 27, n. 2, p. 249-254, 2011.

OUYANG, J.; VALIN, A.; GILL, G. Regulation of transcription factor activity by SUMO modification. **Methods Mol. Biol.**, v. 497, p. 141-152, 2009.

PEMBERTON, P. A. et al. Maspin is an intracellular serpin that partitions into secretory vesicles and is present at the cell surface. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 45, n. 12, p. 1697-1706, 1997.

\_\_\_\_\_. The tumor suppressor maspin does not undergo the stressed to relaxed transition or inhibit trypsin-like serine proteases. Evidence that maspin is not a protease inhibitory serpin. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 26, p. 15832-15837, 1995.

PICKART, C. M. Back to the future with ubiquitin. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 181-190, 2004.

PRAEFCKE, G. J.; HOFMANN, K.; DOHMEN, R. J. SUMO playing tag with ubiquitin. **Trends Biochem. Sci.**, v. 37, n. 1, p. 23-31, 2012.

RADIVOJAC, P. et al. Identification, analysis, and prediction of protein ubiquitination sites. **Proteins**, v. 78, n. 2, p. 365-380, 2010.

REN, J. et al. Systematic study of protein sumoylation: Development of a site-specific predictor of SUMOsp 2.0. **Proteomics**, v. 9, n. 12, p. 3409-3412, 2009.

RICHLY, H. et al. A series of ubiquitin binding factors connects CDC48/p97 to substrate multiubiquitylation and proteasomal targeting. **Cell**, v. 120, n. 1, p. 73-84, 2005.

SAITOH, H.; HINCHEY, J. Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 9, p. 6252-6258, 2000.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2344 p

SARGE, K. D.; PARK-SARGE, O. K. Detection of proteins sumoylated in vivo and in vitro. **Methods Mol. Biol.**, v. 590, p. 265-277, 2009.

SCHWARTZ, D.; GYGI, S. P. An iterative statistical approach to the identification of protein phosphorylation motifs from large-scale data sets. **Nat. Biotechnol.**, v. 23, n. 11, p. 1391-1398, 2005.

SCHWARTZ, D. C.; HOCHSTRASSER, M. A superfamily of protein tags: ubiquitin, SUMO and related modifiers. **Trends Biochem. Sci.**, v. 28, n. 6, p. 321-328, 2003.

SEELER, J. S.; DEJEAN, A. Nuclear and unclear functions of SUMO. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 4, n. 9, p. 690-699, 2003.

SEO, J.; LEE, K. J. Post-translational modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches. **J. Biochem. Mol. Biol.**, v. 37, n. 1, p. 35-44, 2004.

SHENG, S. et al. Maspin acts at the cell membrane to inhibit invasion and motility of mammary and prostatic cancer cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 93, n. 21, p. 11669-11674, 1996.

SHI, H. Y.; LYDON, J. P.; ZHANG, M. Hormonal defect in maspin heterozygous mice reveals a role of progesterone in pubertal ductal development. **Mol. Endocrinol.**, v. 18, n. 9, p. 2196-2207, 2004.

SHI, H. Y. et al. Blocking tumor growth, invasion, and metastasis by maspin in a syngeneic breast cancer model. **Cancer Res.**, v. 61, n. 18, p. 6945-6951, 2001.

SMITH, S. L. et al. Maspin - the most commonly-expressed gene of the 18q21.3 serpin cluster in lung cancer - is strongly expressed in preneoplastic bronchial lesions. **Oncogene**, v. 22, n. 54, p. 8677-87, 2003.

SOOD, A. K. et al. The paradoxical expression of maspin in ovarian carcinoma. **Clin. Cancer Res.**, v. 8, n. 9, p. 2924-2932, 2002.

STADTMAN, E. R. Protein oxidation in aging and age-related diseases. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 928, p. 22-38, 2001.

SUMOSp©. Version 2.0. The CUCKOO Workgroup. 2006-2009. Software. Disponível em: <<http://sumosp.biocuckoo.org>>. Acesso em: 29 novembro 2012.

TERRIS, B. et al. PML nuclear bodies are general targets for inflammation and cell proliferation. **Cancer Res.**, v. 55, n. 7, p. 1590-1597, 1995.

THE PYMOL MOLECULAR GRAPHICS SYSTEM. Version. 1.5.0.4. Schrödinger, LLC. 2010. Software. Disponível em: <<http://pymol.org>>. Acesso em: 29 novembro 2012.

TREMBLAY, A. M. et al. Phosphorylation-dependent sumoylation regulates estrogen-related receptor-alpha and -gamma transcriptional activity through a synergy control motif. **Mol. Endocrinol.**, v. 22, n. 3, p. 570-584, 2008.

TUNG, C. W.; HO, S. Y. Computational identification of ubiquitylation sites from protein sequences. **BMC Bioinformatics**, v. 9, n. 310, 2008.

ULRICH et al. **SUMO Protocols**. United Kingdom: Humana Press, 2009. 324 p (Methods in Molecular Biology, 497).

ULRICH, H. D. Ubiquitin, SUMO, and phosphate: how a trio of posttranslational modifiers governs protein fate. **Mol. Cell**, v. 47, n. 3, p. 335-337, 2012.

UMEKITA, Y. et al. Expression of maspin predicts poor prognosis in breast-cancer patients. **Int J. Cancer**, v. 100, n. 4, p. 452-455, 2002.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica**. Porto Alegre: Artmed Editora S.A., 2000. 931 p

XIA, W. et al. High tumoral maspin expression is associated with improved survival of patients with oral squamous cell carcinoma. **Oncogene**, v. 19, n. 20, p. 2398-2403, 2000.

XUE, Y. et al. SUMOsp: a web server for sumoylation site prediction. **Nucleic Acids Res.**, v. 34, n. Web Server issue, p. W254-W257, 2006.

YANG, X. J.; SETO, E. Lysine acetylation: codified crosstalk with other posttranslational modifications. **Mol. Cell**, v. 31, n. 4, p. 449-461, 2008.

YAO, D. et al. Methylglyoxal modification of mSin3A links glycolysis to angiopoietin-2 transcription. **Cell**, v. 124, n. 2, p. 275-286, 2006.

YAO, Q. et al. SUMOylation-regulated protein phosphorylation, evidence from quantitative phosphoproteomics analyses. **J. Biol. Chem.**, v. 286, n. 31, p. 27342-27349, 2011.

YIN, S. et al. Tumor-suppressive maspin regulates cell response to oxidative stress by direct interaction with glutathione S-transferase. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 41, p. 34985-34996, 2005.

\_\_\_\_\_. Maspin retards cell detachment via a novel interaction with the urokinase-type plasminogen activator/urokinase-type plasminogen activator receptor system. **Cancer Res.**, v. 66, n. 8, p. 4173-4181, 2006.

ZHANG, M. et al. Maspin plays an important role in mammary gland development. **Dev. Biol.**, v. 215, n. 2, p. 278-287, 1999.

\_\_\_\_\_. mMaspin: the mouse homolog of a human tumor suppressor gene inhibits mammary tumor invasion and motility. **Mol. Med.**, v. 3, n. 1, p. 49-59, 1997.

\_\_\_\_\_. Maspin is an angiogenesis inhibitor. **Nat. Med.**, v. 6, n. 2, p. 196-199, 2000.

ZOU, Z. et al. Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells. **Science**, v. 263, n. 5146, p. 526-529, 1994.