

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)**

**LUIZ EDUARDO DA SILVA**

**Validação de parceiros moleculares de Cdc42 em  
linhagens de células tumorais humanas submetidas  
a estresse genotóxico**

**Versão corrigida da Dissertação/Tese conforme Resolução CoPGr 5890  
O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP**

São Paulo

Data do Depósito na SPG: 09/09/2019

LUIZ EDUARDO DA SILVA

**Validação de parceiros moleculares de Cdc42 em  
linhagens de células tumorais humanas submetidas  
a estresse genotóxico**

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

*Orientador: Prof. Dr. Fábio Luís Forti*

São Paulo

2019

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

**Ficha Catalográfica**

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e  
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

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

Silva, Luiz Eduardo da  
S586v Validação de parceiros moleculares de Cdc42 em linhagens de células  
tumoriais humanas submetidas a estresse genotóxico / Luiz Eduardo da  
Silva. -- São Paulo, 2019.  
132p.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Química da Universidade  
de São Paulo. Departamento de Bioquímica.  
Orientador : Forti, Fábio Luís

1. Proteína : Bioquímica 2. Rho GTPases 3. Interação proteína-  
proteína I. T. II. Forti, Fábio Luís, orientador.

574.19245 CDD

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, mestres e seres de luz, pela vida, amor e fé em todos os momentos.

Aos meus pais, pelo amor incondicional, e por sempre acreditarem em mim e na importância de uma formação de qualidade para os filhos.

À minha amada irmã Luana, pelo incentivo em todos os momentos de dificuldade.

Ao Prof. Dr. Fábio Luís Forti, pela acolhida e orientação ao longo deste projeto.

Aos colegas de laboratório Jessica, Pault, Lucas, Arthur, Lilian, Yuli, Ana Paula, Giovanna e Nadine, pelo apoio e ajuda na condução dos experimentos e discussões que contribuíram para o aprimoramento deste trabalho.

À Profa. Dra. Bianca Silvana Zingales e ao técnico Marcelo Nunes, pela disponibilidade em sempre ajudar com o que fosse preciso para a realização dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Alexandre Bruni-Cardoso e seus alunos Rebeca, Antônio e à Dra. Ana Paula Zen, pelo auxílio e disponibilidade na utilização do microscópio widefield de fluorescência.

À Profa. Dra. Ohara Augusto e aos integrantes do seu laboratório, Fernando, Janaína, Edilaine e Verônica, pela utilização dos equipamentos e suporte sempre que necessário.

Às técnicas Berê e Juliana, por terem contribuído para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Aaron J. Farrugia e à Profa. Dra. Louise Larose, pela doação das construções plasmidiais essenciais para a realização deste trabalho.

Aos amigos de vida, Eduardo Sbrana e Adriana Furtado, pela imensa amizade, incentivo e colaboração nesse período de muitos desafios e aprendizados.

Às agências de fomento FAPESP, CNPq e principalmente CAPES pelo suporte financeiro ao longo da realização deste trabalho.

À Universidade de São Paulo, por me acolher no decorrer desse período e proporcionar momentos de desafios e conquistas, os quais serão lembrados com carinho.

***Aplico o meu coração no caminho, baseio-me na virtude,  
confio na benevolência para apoio e encontro  
entretenimento nas artes.***

(V.II 6, Os Analectos, Confúcio, 551 a.C.- 479 a.C)

## RESUMO

Silva, L.E. **Validação de parceiros moleculares de Cdc42 em linhagens de células tumorais humanas submetidas a estresse genotóxico**. 2019. 132p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

A proteína *Cell Division Cycle 42* (CDC42), pertencente à família das Rho GTPases, está envolvida em diversos processos biológicos relacionados à reorganização do citoesqueleto, proliferação celular, motilidade, polaridade, citocinese e transporte vesicular. Nos últimos anos, Cdc42 tem sido implicada também em cenários de instabilidade genômica, sendo observada a sua superexpressão em diversas células tumorais, bem como a sua interação com importantes supressores tumorais em diferentes contextos celulares. Além disso, estudos recentes indicam a sua participação no envelhecimento precoce de linhagens celulares hematopoiéticas e a possível atuação sobre novas estruturas celulares, em contraposição ao tradicional papel desempenhado na membrana plasmática. Estudos prévios conduzidos por nosso grupo mostraram que mutantes de células HeLa Cdc42 constitutivamente ativos (Cdc42-G12V) apresentam uma maior sensibilidade à radiação ultravioleta em relação à linhagem HeLa expressando Cdc42 selvagem. Além disso, estudos de interactoma e proteômica indicaram a possível interação de Cdc42 com as proteínas PHB-2, 14-3-3 $\eta$ , PAK-4 e Cdc42EP3/Borg2 em condições de instabilidade genômica. Com o intuito de validar molecularmente tais interações por outros métodos experimentais, foram conduzidos ensaios de *pull down*, ligação de proximidade (PLA) e colocalização por microscopia confocal de fluorescência para as três primeiras proteínas parceiras nas linhagens HeLa Parental e HeLa Cdc42-G12V, tratadas ou não com radiação ultravioleta. Por fim, como forma de validação funcional, promoveu-se a expressão ectópica da parceira Cdc42EP3/Borg2 em ambas as linhagens com o intuito de avaliar a influência desta proteína em particular sobre a sobrevivência celular após o estresse genotóxico. Os resultados experimentais comprovaram a interação das parceiras PHB-2, 14-3-3 $\eta$  e PAK-4 pela GTPase no seu estado ativo, fornecendo indícios de papéis relevantes em estruturas subcelulares pouco exploradas para Cdc42 em condições de instabilidade genômica. Para a efetora Cdc42EP3/Borg2, os resultados obtidos demonstraram que sua interação com Cdc42 possivelmente tem papel na sensibilização das células à radiação UVC (sobrevivência celular). Essa resposta também é dependente da ativação constitutiva de Cdc42 e sugere que parceiros *downstream* à Cdc42EP3/Borg2, a exemplo das proteínas Sept2 e NCK1/2, poderiam agir conjuntamente para as respostas celulares observadas após estresse genotóxico. Assim, a comprovação molecular e funcional das interações aqui descritas certamente contribuirá para o melhor entendimento do papel de Cdc42 no contexto de resposta a danos ao DNA, abrindo novas possibilidades para a modulação farmacológica de vias envolvendo essa proteína.

**Palavras-chave:** Rho GTPases, Cdc42, Instabilidade genômica, Resposta a danos ao DNA (DDR), Interação proteína-proteína.

## ABSTRACT

Silva, L.E. **Validation of Cdc42 molecular partners in human tumor cell lines submitted to genotoxic stress**. 2019. 132p. Master's dissertation – Graduate Program in Biological Sciences (Biochemistry). Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

Cell Division Cycle 42 (CDC42), which belongs to the Rho GTPase family, is a well-known protein involved in cytoskeleton regulation, cell proliferation, motility, polarity, cytokinesis and vesicular transport. In the past years, Cdc42 has been implicated in genomic instability conditions, where its overexpression in cancer cells and its correlation with tumor suppressor proteins have been widely reported. Besides, recent studies indicated that inhibition of Cdc42 prevents premature aging in hematopoietic cell lines and its possible role in the context of novel subcellular localization, including the perinuclear region. Studies conducted by our group demonstrated that Cdc42 constitutively active mutants (Cdc42V12) of HeLa cell line submitted to genotoxic stress exhibit a higher sensibility to ultraviolet radiation in comparison to HeLa cell line expressing wild type Cdc42. Furthermore, interactome and proteomic studies undertaken by our group unveiled a possible interaction of Cdc42 with PHB-2, 14-3-3 $\eta$ , PAK-4 and Cdc42EP3/Borg2 proteins under genomic instability conditions. In order to experimentally validate these interactions, we conducted *pull down* assays, proximity ligation assays and fluorescence confocal microscopy for the three protein partners in HeLa Parental and HeLa Cdc42-G12V cell lines with or without ultraviolet radiation. Lastly, ectopic expression of Cdc42EP3/Borg2 was undertaken in both cell lines as a functional validation, with the aim to evaluate the influence of its particular expression towards cell survival following genotoxic stress. The results herein presented confirmed the preferential interaction of activated Cdc42 with the partners PHB-2, 14-3-3 $\eta$  e PAK-4 as well as indicated that these interactions display relevant roles on subcellular structures fairly unexplored for Cdc42. In the case of Cdc42EP3/Borg2, obtained data demonstrated its involvement in cell sensitization in response to UVC radiation. This response is also dependent on constitutive activation of Cdc42 and suggests proteins downstream to Cdc42EP3/Borg2, as Septin2 and NCK1/2 proteins, as players that could coordinately act to result in the observed cellular outcomes following genotoxic stress. Therefore, the clarification of the interactions here described will certainly contribute to a better understanding of Cdc42 role in the context of DNA damage response, shedding light on novel possibilities for the pharmacological modulation of pathways involving this protein.

**Keywords:** Rho GTPases, Cdc42, Genomic instability, DNA Damage Response (DDR), Protein-protein interaction.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Características estruturais das Rho GTPases. ....	20
Figura 2 – Representação ilustrativa da ciclagem das Rho GTPases típicas. ....	21
Figura 3 - Vias de sinalização ativadas por Cdc42 e suas respectivas funções biológicas dentro das células. ....	23
Figura 4 - Mecanismos de ativação da proteína ATR em resposta a Danos ao DNA .....	27
Figura 5 – Esquema ilustrativo da regulação do ciclo celular realizada por proteínas de DDR durante situações de estresse genotóxico.....	29
Figura 6 – Abordagem experimental para identificação e seleção de parceiros proteicos de Cdc42 sob condições de instabilidade genômica. ....	34
Figura 7 - Estrutura dos domínios das proteínas PAK do tipo I e II.....	36
Figura 8 - Vias de sinalização envolvendo PAK-4.....	37
Figura 9 – Características estruturais das proteínas PHB-1 e PHB-2.....	38
Figura 10 – Processos biológicos envolvendo a família 14-3-3 .....	41
Figura 11 – Mecanismos de ação das proteínas pertencentes à família 14-3-3 .....	40
Figura 12 - Domínios característicos dos membros da família Borg (Cdc42EP).....	44
Figura 13 - Estrutura dos domínios das septinas 2, 3, 6 e 7 .....	46
Figura 14 - Parceiros de interação das NCKs. ....	48
Figura 15 - Validação da interação física entre Cdc42 e as proteínas parceiras PAK-4, 14-3-3 $\eta$ e PHB-2 .....	66
Figura 16 - Colocalização por microscopia de fluorescência confocal para Cdc42/14-3-3 $\eta$ nas linhagens HeLa parental e HeLa Cdc42-G12V .....	68
Figura 17 - Colocalização por microscopia confocal de fluorescência para Cdc42/PHB-2 nas linhagens HeLa parental e HeLa Cdc42-G12V.....	70
Figura 18 - Colocalização por microscopia confocal de fluorescência para Cdc42/PAK-4 nas linhagens HeLa parental e HeLa Cdc42-G12V .....	71
Figura 19 - Ensaio de ligação de proximidade para as proteínas Cdc42 e PHB-2....	73
Figura 20 - Ensaio de ligação de proximidade para as proteínas Cdc42 e PAK-4 ....	73
Figura 21 - Ensaio realizados nas linhagens HeLa parental e HeLa Cdc42-G12V .	84
Figura 22 - Ensaio realizados nas linhagens HaCaT parental e HaCaT Cdc42-G12V .....	86



Figura 23 - Imunofluorescência para as células HaCaT parental tratadas ou não com radiação UVC (6 J/m <sup>2</sup> ) e radiação UVA (80 kJ/m <sup>2</sup> ).....	87
Figura 24 - Imunofluorescência para as células HaCaT Cdc42-G12V tratadas ou não com radiação UVC (6 J/m <sup>2</sup> ) e radiação UVA (80 kJ/m <sup>2</sup> ).....	88
Figura 25 - Análise de colocalização entre Cdc42 e Cdc42EP3 em células HeLa parentais expressando ectopicamente Cdc42EP3-GFP .....	90
Figura 26 - Ensaio clonogênico para as linhagens HeLa parental e HeLa Cdc42-G12V .....	92
Figura 27 - Relocalização subcelular de NCK1/2 pós-estresse com radiação UVC..	94
Figura 28 - Estimativa da localização subcelular de NCK1/2 pós-irradiação UVC.....	95
Figura 29 - Fracionamento celular de HeLa Parental e HeLa Cdc42-G12V.....	95
Figura 30 - Expressão ectópica de NCK2 nas linhagens HeLa Parental e HeLa Cdc42-G12V.....	96
Figura 31 - Expressão das proteínas recombinantes em bactérias E. coli (BL21). .	122
Figura 32 - Quantificação das proteínas recombinantes no lisado bacteriano obtidas após sonicação. ....	122
Figura 33 - Proteínas recombinantes purificadas por cromatografia de afinidade (Sephrose 4B). ....	123
Figura 34 - Conjunto de proteínas exclusivamente detectadas nas amostras de HeLa ou MRC5 tratadas com radiação UVC .....	128
Figura 35 - Eletroforese em gel de agarose para as construções GFP, Borg2-GFP, Septina2-GFP e NCK2-GFP.....	129
Figura 36 – Padrão de fosforilação para a proteína JNK1/2 .....	130

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de anticorpos utilizados de acordo com cada experimento .....	55
Tabela 2 - Lista de proteínas identificadas por espectrometria de massas em todas as amostras de HeLa, excluídas aquelas presentes nos controles GST .....	124

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACK – Activated Cdc42 kinase  
AID – Autoinhibitory domain  
APC – Adenomatous polyposis coli  
ATM – Ataxia-telangiectasia mutated protein  
ATR – Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein  
ATRIP – ATR-interacting protein  
Bad – Bcl-2-associated death promoter  
BER – Base excision repair  
Borg – Binder of Rho GTPase  
53BP1 – p53 binding protein  
BRCA – Breast cancer protein  
Cdc42EP – Cdc42 effector protein  
Cbl – Casitas B-lineage lymphoma  
Cdc – Cell division cycle  
Cdk – Cyclin-dependent kinases  
Chk – Checkpoint kinase  
CIP – Cdc42-interacting protein  
CPD – Cyclobutane Pyrimidine Dimer  
CSA – Cockayne sndrome group A  
CSB – Cockayne sndrome group B  
COPG – Coatomer subunit protein gamma  
DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium  
DNA – Deoxyribonucleic acid  
DNA-PK – DNA-dependent protein kinase  
GAP – GTPase-activating protein  
GDI – Guanosine nucleotide Dissociation Inhibitor  
GEF – Guanine Exchange Factor  
GFP – green fluorescente protein  
GPCRs – G protein-coupled receptor  
GST – Glutathione S-transferases  
GTP/GDP – Guanosine-5'-triphosphate/guanosine diphosphate

HR – Homologous recombination  
IQGAP – IQ Motif Containing GTPase Activating Protein  
LIMK– LIM domain kinase  
MCK – Muscle creatine kinase  
mDia/Drf – Diaphanous-related formin-1  
MEF – Myocyte enhancer factor  
MEK – Mitogen-activated protein kinase kinase  
MLC – Mysin Light Chain protein  
MMR – Mismatch repair  
MRCK – Mytotic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase  
NADPH –Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate  
NBS – Nijmegen breakage sndrome protein  
NCK – Non-Catalytic region of tyrosine Kinase  
NER – Nucleotide excision repair  
NHEJ – Non-homologous end joining  
N-WASP/WASP – Neural Wiskott-Aldrich Sndrome protein  
KPNA – Karyopherin Subunit Alpha  
LB – Luria-Bertani  
P120ACK – Activated Cdc42 kinase  
Par – Partitioning defective protein  
PARP – Poly (ADP-ribose) polymerase  
PAK – p21-activated kinases  
PBD – p21 binding domain  
PBS – Phosphate buffer saline  
PI3K – Phosphoinositide 3-kinase  
PHB – Prohibitin  
PLA – Proximity ligation assay  
PPAR – Peroxisome proliferator-activated receptor  
PSD – pseudosubstrate domain  
PTEN – Phosphatase and tensin homolog  
PYK – Pyruvate Kinase  
6-4 PPs – 6-4 Primidine-Primidone  
Ras –RA~~t~~ Sarcoma virus  
Rac – Ras-related C3 botulinum toxin substrate

Rho – Ras homologous protein  
Rfc – Replication factor C  
RIPA – Radioimmunoprecipitation assay buffer  
RNF – RING finger protein  
RPA – Replication protein A  
ROCK – Rho-associated protein kinase  
RTKs – Receptor tyrosine kinase  
SDS-PAGE – sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis  
SEPT – Septin  
SOCS – Suppressor of cytokine signaling  
STAT – Signal transducer and activator of transcription protein  
TAK – Tat-associated kinase  
TNF – Tumor necrosis factor protein  
TRADD – Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein  
TNFR – Tumor necrosis factor receptor  
TOPBP1 – topo<sup>is</sup>omerase 2-binding protein  
UV – Ultraviolet radiation  
XAB – XPA binding protein  
XPC – Xeroderma pigmentosum complementation group C  
XRCC – X-ray repair cross-complementing  
YAP/TAZ – yes-associated protein/ Tafazzin

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	19
2.1 A RHO GTPASE CDC42 .....	19
2.2 CDC42 E INSTABILIDADE GENÔMICA.....	24
2.2.1 O conceito de instabilidade genômica.....	24
2.2.2 Instabilidade genômica em resposta à radiação UVC.....	24
2.2.2.1 <i>Vias de reconhecimento de danos, pontos de checagem do ciclo celular e reparo do DNA</i> .....	25
2.2.2.2 <i>Cdc42 e Instabilidade genômica</i> .....	30
2.3 PARCEIROS DE INTERAÇÃO DE CDC42 E INSTABILIDADE GENÔMICA..	33
2.3.1 PAK-4.....	35
2.3.2 PHB-2 .....	37
2.3.3 14-3-3 $\eta$ .....	40
2.3.4 CDC42EP3 (Borg2) e o eixo Septina-SOCS7-NCK.....	42
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	49
3.1 OBJETIVO GERAL .....	49
3.1.1 Objetivos específicos .....	49
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	51
4.1 CULTURA DE CÉLULAS.....	51
4.2 TRATAMENTO DAS LINHAGENS CELULARES .....	51
4.3 OBTENÇÃO DE LISADOS CELULARES .....	52
4.3.1 Lisados totais .....	52
4.3.2 Fracionamento celular.....	53
4.4 CONSTRUÇÕES PLASMIDIAIS E ANTICORPOS.....	54
4.5 TRANSFEÇÃO.....	55
4.6 ANÁLISE DE PROTEÍNAS .....	56
4.7 PRODUÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	57
4.8 <i>PULL DOWN</i> DE PROTEÍNAS .....	59

4.8.1 GST-Cdc42 .....	59
4.8.2 PAK-PBD-GST .....	60
4.9 IMUNOFLOURESCÊNCIA E MICROSCOPIA CONFOCAL .....	61
4.9.1 Preparo de amostras .....	61
4.9.2 Aquisição de imagens .....	62
4.10 ENSAIO DE LIGAÇÃO DE PROXIMIDADE (PLA) .....	62
4.11 ENSAIOS CLONOGÊNICOS .....	63
<b>PARTE I - VALIDAÇÃO DE PARCEIROS DE CDC42 EM CONDIÇÕES DE INSTABILIDADE GENÔMICA (14-3-3<math>\eta</math>, PAK-4 e PHB-2) .....</b>	<b>64</b>
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>65</b>
5.1 AVALIAÇÃO DE INTERAÇÕES FÍSICAS POR <i>PULL DOWN</i> .....	65
5.2 AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DAS INTERAÇÕES POR MICROSCOPIA CONFOCAL (COLOCALIZAÇÃO) .....	67
5.3 VALIDAÇÃO DAS INTERAÇÕES DESCRITAS POR COLOCALIZAÇÃO ATRAVÉS DE ENSAIO DE LIGAÇÃO DE PROXIMIDADE (PLA) .....	72
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>74</b>
<b>PARTE II – EXPLORAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE CDC42 E Cdc42EP3/Borg2 E SUA INFLUÊNCIA PARA A RESPOSTA A ESTRESSE GENOTÓXICO .....</b>	<b>82</b>
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>83</b>
5.1 INFLUÊNCIA DA HIPERATIVAÇÃO DE CDC42 SOBRE A SOBREVIVÊNCIA CELULAR E FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS DE DDR APÓS ESTRESSE GENOTÓXICO .....	83
5.2 AVALIAÇÃO DA LOCALIZAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE CDC42 E CDC42EP3/BORG2 POR MICROSCOPIA CONFOCAL .....	89
5.3 INFLUÊNCIA DA EXPRESSÃO ECTÓPICA DE CDC42EP3 E NCK2 SOBRE A SOBREVIVÊNCIA CELULAR EM LINHAGENS COM DIFERENTES BACKGROUNDS DE CDC42 ATIVA .....	91
5.4 LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DE NCK1/2 APÓS ESTRESSE POR RADIAÇÃO UVC EM LINHAGENS COM DIFERENTES BACKGROUNDS DE CDC42 ATIVA .....	93
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>97</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>105</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>122</b>
<b>ANEXOS - SÚMULA CURRICULAR .....</b>	<b>131</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A Rho GTPase Cdc42 é uma proteína pertencente à superfamília Ras e uma das principais reguladoras do citoesqueleto de actina (Hall, 1998). O interesse pela participação de Cdc42 em processos tumorais (Stengel e Zheng, 2011), apoptose (Chuang *et al.*, 1997; Bazenet, Mota e Rubin, 2002), envelhecimento (Florian *et al.*, 2012; Geiger e Zheng, 2013), senescência (Wang *et al.*, 2007) e regulação do ciclo celular (Olson, Ashworth e Hall, 1995; Chou, Masuda-Robens e Gupta, 2003) tem aumentado desde a descoberta desta GTPase, constituindo-se em uma proteína importante para a manutenção da estabilidade genômica.

Nosso grupo tem contribuído para o entendimento da correlação entre estresse genotóxico e Rho GTPases típicas e centrais como Rac1, RhoA e Cdc42 (Ascer *et al.*, 2015; Espinha *et al.*, 2015, 2016; Osaki *et al.*, 2016). Utilizando modelos celulares de adenocarcinoma cervical (HeLa) contendo diferentes *status* de Cdc42 ativa, por exemplo, demonstramos que os mutantes Cdc42-G12V, os quais se caracterizam por apresentarem GTP constitutivamente ligado a Cdc42, impedindo a ciclagem para o estado inativo, apresentam uma maior sensibilidade à radiação ultravioleta atribuída à parada na transição de fases G2/M do ciclo celular, resultando em uma menor proliferação e maior morte (principalmente apoptótica) dessas células quando comparadas à linhagem HeLa expressando Cdc42 selvagem, ou mutantes com inativação constitutiva de Cdc42 (Cdc42-N17) (Ascer *et al.*, 2015).

Com o intuito de melhor elucidar os mecanismos moleculares dessa resposta biológica, estudos de proteômica e interactoma foram conduzidos a fim de se identificar possíveis parceiros moleculares de Cdc42 no contexto de estresse



genotóxico promovido por radiação UVC em duas linhagens celulares diferentes: adenocarcinoma cervical (HeLa) e MRC-5 (fibroblastos humanos de pulmão imortalizados). Tal escolha teve como base a comparação entre uma linhagem normal (fibroblastos de pulmão imortalizados) e tumoral (adenocarcinoma cervical imortalizado), as quais apresentam níveis normais e reduzidos de p53, respectivamente. Entre os resultados obtidos, a presença marcante das proteínas PHB-2, 14-3-3 $\eta$ , PAK-4 e Cdc42EP3 (Borg2) como parceiros de Cdc42 nas condições tratadas com radiação UVC, e ainda principalmente com a enzima constitutivamente ativa (Cdc42-G12V), reflete uma importante regulação associada a essas proteínas mediante estresse (Silva *et al.*, 2019), mas cujos mecanismos ainda estão para serem melhor esclarecidos.

Com estas questões apontadas, esta dissertação focou em dois objetivos específicos principais, sendo que os resultados obtidos e aqui apresentados foram divididos em duas partes: em um primeiro momento, foram validadas as interações moleculares, previamente apontadas por estudos de proteômica e interactoma, entre Cdc42 e as proteínas PHB-2, 1433 $\eta$  e PAK-4 através de ensaios de *pull down* seguidos de immunoblotting. Com o intuito de ampliar o entendimento do envolvimento dessas proteínas em condições de estresse genotóxico e a sua correlação com o status de atividade de Cdc42, sublinhagens clonais HeLa Cdc42-G12V foram utilizadas para ensaios de colocalização e ligação de proximidade.

Em um segundo momento, selecionou-se uma efetora já conhecida de Cdc42, a proteína Cdc42EP3/Borg2, também encontrada nas mesmas análises prévias de proteômica e interactoma de nosso grupo, porém inexplorada no contexto de resposta a danos ao DNA (*DNA Damage Response*; DDR). A partir da sua expressão ectópica nas linhagens HeLa Parental e HeLa Cdc42-G12V, foram

realizados ensaios clonogênicos propondo o seu possível papel na sensibilização das linhagens com ganho de função para Cdc42. E a partir desses resultados, propôs-se também, possíveis intermediários proteicos que poderiam estar envolvidos nas respostas observadas, a exemplo da proteína adaptadora NCK1/2.

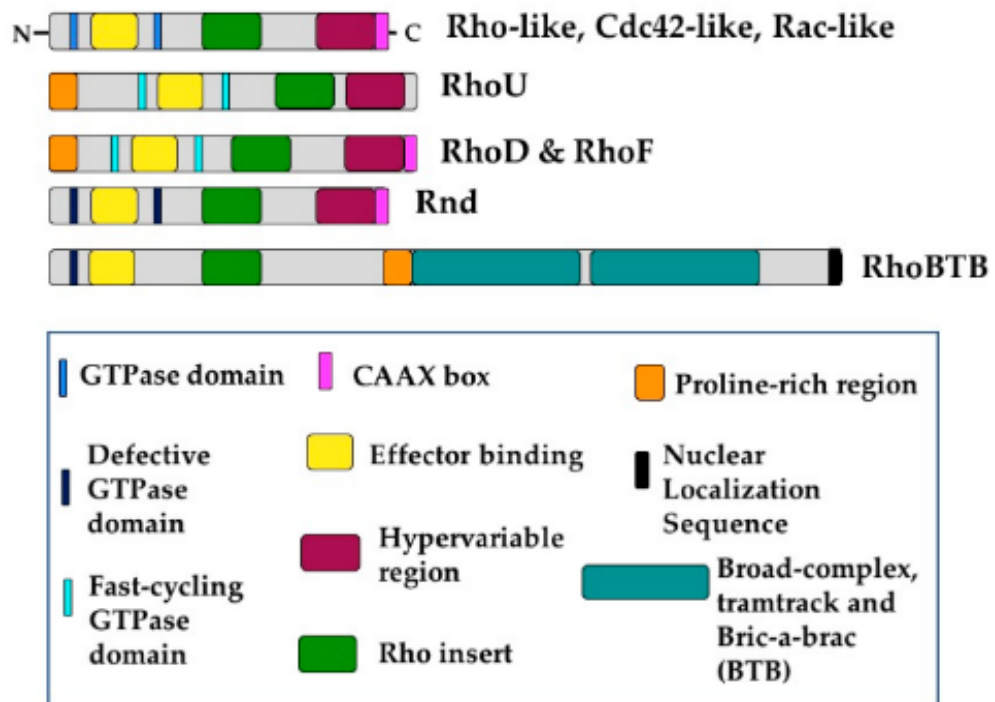
O presente trabalho, portanto, pretende reforçar as evidências funcionais e moleculares de que Cdc42, a exemplo das outras GTPases típicas, através dos parceiros específicos de interação acima descritos, desempenha papéis importantes na regulação da estabilidade genômica de células normais e tumorais humanas após exposição a agentes genotóxicos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A RHO GTPASE CDC42

A família das Rho GTPases pertence à superfamília das proteínas ligadoras de GTP do tipo Ras e foi descrita pela primeira vez há mais de 30 anos (Madaule e Axel, 1985). Estas apresentam expressão ubíqua e se caracterizam pela ciclagem entre um estado ativo (ligado à GTP) e inativo (ligado à GDP). Tais proteínas podem ser classificadas em oito subfamílias de acordo com a homologia na sequência de aminoácidos, sendo Cdc42 uma delas (Boueux *et al.*, 2007).

As GTPases também podem ser classificadas como típicas ou atípicas (Figura 1). As GTPases típicas compreendem as subfamílias Rho, Cdc42 e Rac, enquanto que no segundo grupo, tem-se GTPases como RhoU, Rnd, RhoBTB, entre outras. Os fatores que caracterizam essa distinção incluem diferenças estruturais e funcionais importantes. A ativação constitutiva de GTPases atípicas como RhoH e Rnd, por exemplo, ocorre em níveis basais, pois estas apresentam mutações em resíduos de aminoácidos essenciais presentes em GTPases típicas, como nos resíduos de glicina 12 e glutamina 61 (Aspenström, Ruusala e Pacholsky, 2007). Além disso, GTPases atípicas podem ou não ter parceiros em comum com as típicas e desempenham funções diferenciadas, como por exemplo, o envolvimento de RhoH na sinalização de células T (Gu *et al.*, 2006).



**Figura 1 – Características estruturais das Rho GTPases.** As GTPases típicas compreendem a subfamília Rho, Rac e Cdc42, enquanto que as atípicas compreendem RhoU, RhoD, RhoF, Rnd e RhoBTB.

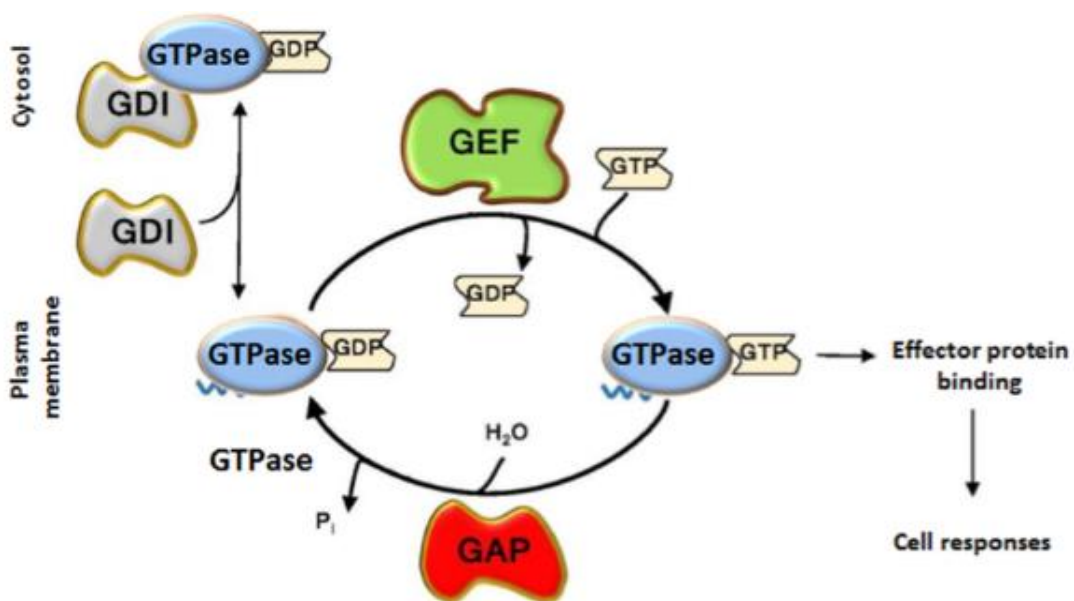
Fonte: Aspenström, Ruusala e Pacholsky, (2007)

Além da regulação via fosforilação direta ou ubiquitinação, as GTPases típicas são reguladas por três grupos principais de proteínas (Figura 2):

- GDIs (*Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitors*): previnem a ativação da forma ligada à GDP, sequestrando-a para o citosol. Essa inativação ocorre através da inibição da dissociação do nucleotídeo, inibição da hidrólise de GTP e liberação da membrana, acomodando a cauda lipídica e, portanto, impedindo que a GTPase seja ancorada a membranas, tornando-a ativa (Dovas e Couchman, 2005; Garcia-Mata, Boulter e Burrridge, 2011).
- GEFs (*Guanine Nucleotide Exchange Factors*): possibilitam a troca de GDP por GTP, ativando as Rho GTPases. Essa assistência é feita pela formação de um complexo de baixa afinidade entre a GTPase (ligada a GDP) e a GEF, o qual após dissociação do GDP, apresenta maior afinidade, possibilitando a

entrada de GTP e concomitante desligamento da GEF (Cook, Rossman e Der, 2014);

•GAPs (*GTPase Activating Proteins*): estimulam a função de GTPase intrínseca para inativação das Rho GTPases por hidrólise de GTP a GDP. Essa inativação é assistida por esse grupo de proteínas devido ao fato de que as GTPases em geral hidrolisam GTP de forma bastante lenta. Assim, a capacidade de ciclagem entre os estados ativo e inativo em períodos adequados de tempo torna-se essencial para que elas desempenhem suas funções biológicas (Moon e Zheng, 2003; Tcherkezian e Lamarche-Vane, 2007);



**Figura 2 – Representação ilustrativa da ciclagem das Rho GTPases típicas.** A ativação ocorre pela assistência promovida por GEFs, enquanto que a inativação ocorre pela hidrólise de GTP a GDP, catalisado por GAPs. Por fim, GDIs realizam o sequestro citosólico das GTPases, acomodando a sua cauda lipídica e impedindo que elas se ancorem às membranas  
Fonte: Song *et al.* (2019).

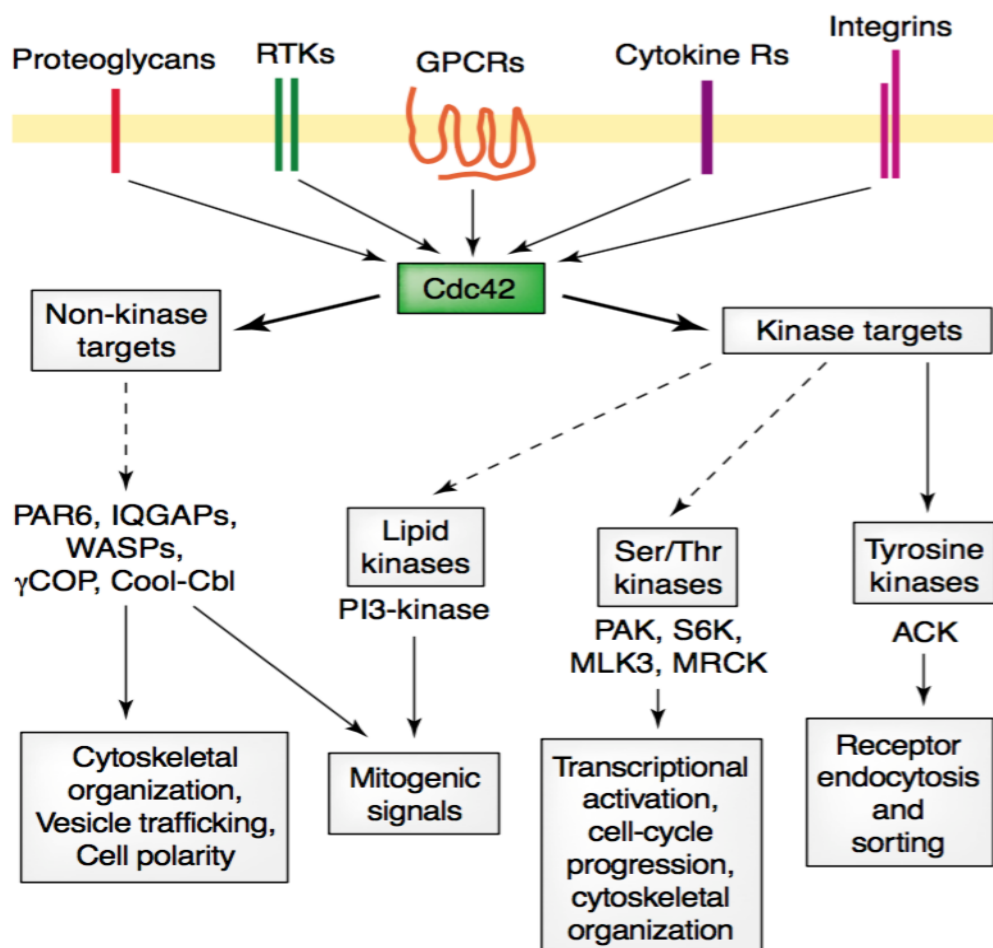
A estrutura das Rho GTPases possui três importantes regiões: o domínio G, uma "região de inserção" e uma curta região hipervariável C-terminal. O domínio G

caracteriza-se por ligar guanosina, compreendendo 6 folhas- $\beta$  circundadas por 5  $\alpha$ -hélices. Já a região de inserção se localiza entre os motivos G4-G5 e é caracterizada pela ligação e ativação de proteínas efetoras como NADPH oxidase, IQGAP, ROCK e mDia, além de interagir com GEFs. A terceira região inclui a porção C-terminal, que possibilita o ancoramento lipídico através de CAAX-box, um pequeno motivo composto por uma cisteína (C), dois aminoácidos hidrofóbicos (valina e leucina – AA) e um aminoácido qualquer (leucina – X). No caso de Cdc42, tal cisteína sofre geranilgeranilação, sendo ancorada à membrana para tornar-se ativa. Além disso, essa âncora lipídica também regula a interação com GDIs (Cerione, 2004; Schaefer, Reinhard e Hordijk, 2014).

A ativação de Cdc42 ocorre através da recepção de diferentes sinais extracelulares, os quais se ligam aos receptores de membrana e desencadeiam a resposta intracelular (Cerione, 2004). Exemplos clássicos incluem a ativação de receptores acoplados à proteína G, integrinas, receptores tirosina quinases, receptores para fatores de crescimento, entre outros (Sinha e Yang, 2008). Uma vez ativadas, as Rho GTPases são capazes de interagir com alvos proteicos como serina/treonina quinases, tirosina quinases, quinases lipídicas, lipases, oxidases e proteínas andaime, para gerar diversas respostas celulares (Jaffe e Hall, 2005; Bustelo, Sauzeau e Berenjeno, 2007).

A Rho GTPase Cell Division Cycle 42 (CDC42) foi primeiramente identificada a partir de uma linhagem mutante de *Saccharomyces cerevisiae* em 1990 (Adams *et al.*, 1990). Tal proteína apresenta massa molecular de 21,33 kDa e caracteriza-se pela regulação do citoesqueleto em processos como proliferação celular, motilidade, polaridade, citocinese, tráfego de membranas e transporte vesicular (Hall e Nobes, 2000). A reorganização do citoesqueleto de actina e formação de filopódios é uma

das funções mais bem estudadas de Cdc42 (Pontus Aspenström, 1999; Stengel e Zheng, 2011). Em geral, após ativação ocorre o recrutamento de proteínas efetoras como PAKs, WASP/N-WASP, CIP4, p120ACK/Pyk1, ACK2, MRCK $\alpha\beta$  e IQGAP1 e Par6 desencadeando como resposta biológica a regulação do citoesqueleto de actina, ativação transcricional, progressão do ciclo celular, entre outros (Figura 3) (Briggs e Sacks, 2003; Jaffe e Hall, 2005; Chen e Zhang, 2013; Watson, Owen e Mott, 2017).



**Figura 3 - Vias de sinalização ativadas por Cdc42 e suas respectivas funções biológicas dentro das células.** Cdc42 é capaz de interagir com alvos quinásicos e não quinásicos, regulando o ciclo celular, citoesqueleto, transcrição de genes específicos e atuando sobre o tráfego vesicular  
Fonte: Cerione (2004).

## 2.2 CDC42 E INSTABILIDADE GENÔMICA

### 2.2.1 O conceito de instabilidade genômica

Instabilidade genômica é um termo aplicado ao aumento de tendência de alterações no genoma durante o ciclo de vida das células. Como parte normal do desenvolvimento e com uma baixa frequência, processos como o reparo de DNA, a duplicação dos cromossomos, transmissão ou recombinação servem de fonte para um cenário natural de instabilidade, permitindo as variações genéticas (Aguilera e Gómez-González, 2008; Aguilera e García-Muse, 2013). No entanto, tal cenário persistente de instabilidade pode ser promovido pela exposição a diversos agentes genotóxicos, como quimioterápicos e radiações; por processos patológicos, como no caso do câncer (Negrini, Gorgoulis e Halazonetis, 2010; Shen, 2011) e de doenças genéticas que impedem o funcionamento natural dos mecanismos de reparo do DNA (Aguilera e Gómez-González, 2008); e por processos fisiológicos, como no caso do envelhecimento (López-Otín *et al.*, 2013).

Agentes genotóxicos, em geral, são capazes de promover um cenário característico de instabilidade genômica, pois causam danos diretos ou indiretos ao DNA. Entre os agentes de origem exógena, destacam-se as radiações do tipo não ionizante (exemplo: ultravioleta A, B e C), ionizantes (exemplo: gama), drogas (agentes quimioterápicos) e poluição atmosférica (Aguilera e García-Muse, 2013).

### 2.2.2 Instabilidade genômica em resposta à radiação UVC

A radiação ultravioleta do tipo C compreende a faixa inferior a 280 nm e é responsável por comprometer a integridade genômica de várias maneiras (Yang, 2011). A principal delas é através da formação de ciclobutanos de pirimidina (CPDs,



80-90%) e fotoprodutos (6-4)-pirimidina-pirimidona (6-4 PPs, 10–20%), além de outros menos frequentes (Rastogi *et al.*, 2010). O dano induzido por radiação ultravioleta provoca uma distorção da dupla hélice do DNA e é reparado pela via de reparo por excisão de nucleotídeos (*Nucleotide Excision Repair*, NER), podendo ocorrer em alguma extensão, dependendo da intensidade da irradiação, a geração de danos oxidativos, os quais são reconhecidos por outras vias como a de reparo por excisão de bases (*Base Excision Repair*, BER) (Goosen, 2013).

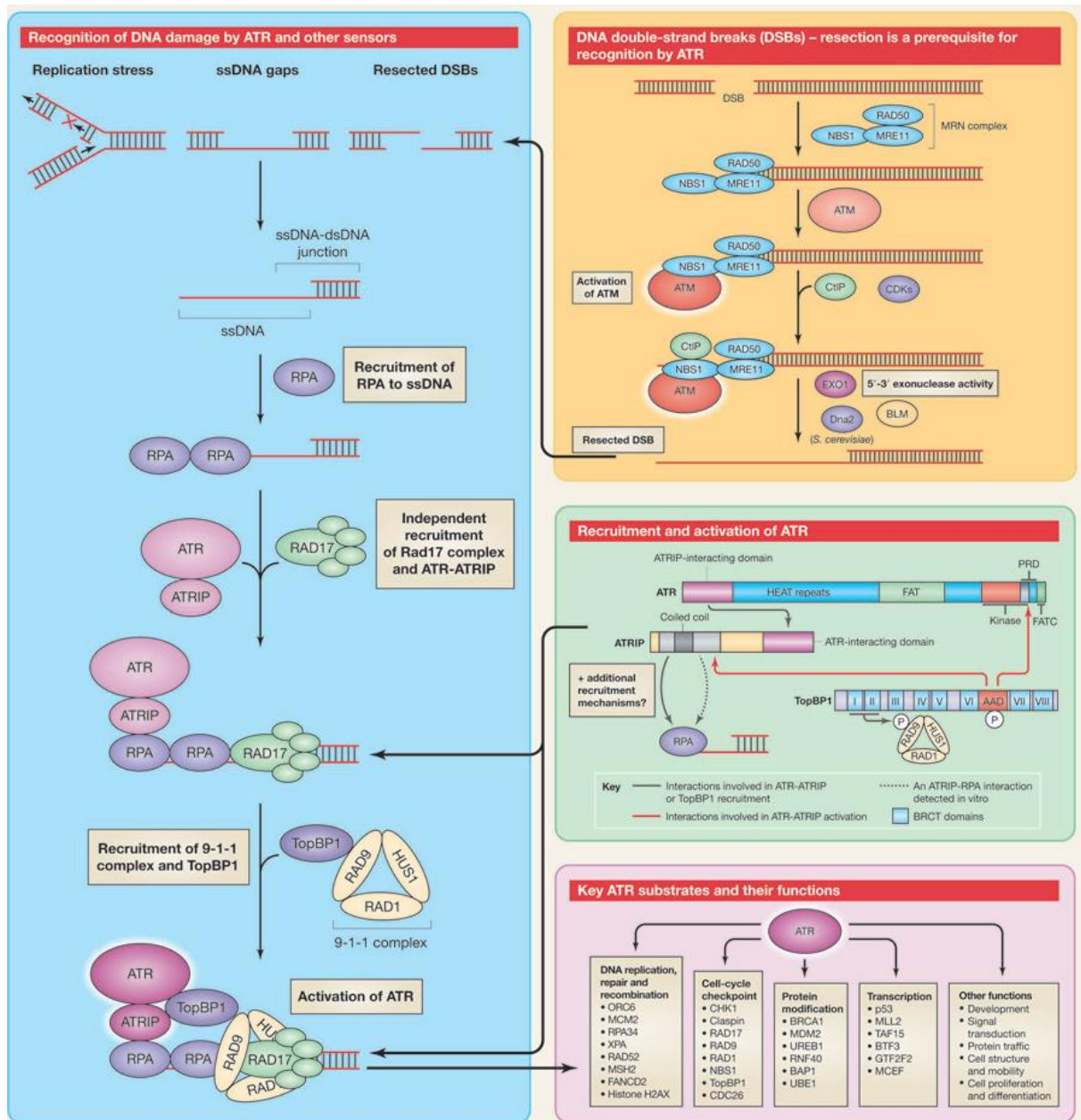
Caso ocorra a exposição prolongada à radiação, pode haver quebras de dupla fita, sendo a via de reparo por recombinação homóloga (*Homologous Recombination*, HR) e/ou de reparo por união de extremidade não-homóloga (*Non-homologous End Joining*) ativadas (Sancar *et al.*, 2004; Rastogi *et al.*, 2010; Davis e Chen, 2013).

#### 2.2.2.1 Vias de reconhecimento de danos, pontos de checagem do ciclo celular e reparo do DNA

A resposta a danos ao DNA conta com o auxílio da tríade de proteínas quinases específicas da família das fosfatidilinositol 3-quinases (PI3Ks), como ATM, ATR e DNA-PK (Shiloh, 2001; Awasthi, Foiani e Kumar, 2016). Tradicionalmente, ATM e DNA-PK são ativadas em resposta a quebras duplas no DNA, enquanto ATR pode sofrer ativação após a formação transiente de fitas simples de DNA, durante estresse replicativo ou na formação de DNA fita simples após ativação de ATM em resposta a quebra da dupla fita de DNA. Tanto ATR como ATM atuam fosforilando quinases essenciais como Chk1 e Chk2, respectivamente. Esse recrutamento de diversos efetores correlaciona-se a quatro eventos celulares principais: a parada do ciclo celular, o reparo do DNA, a transcrição de genes específicos e a apoptose (Kastan e Bartek, 2004) (Figura 4). Essas vias de sinalização, em geral, podem

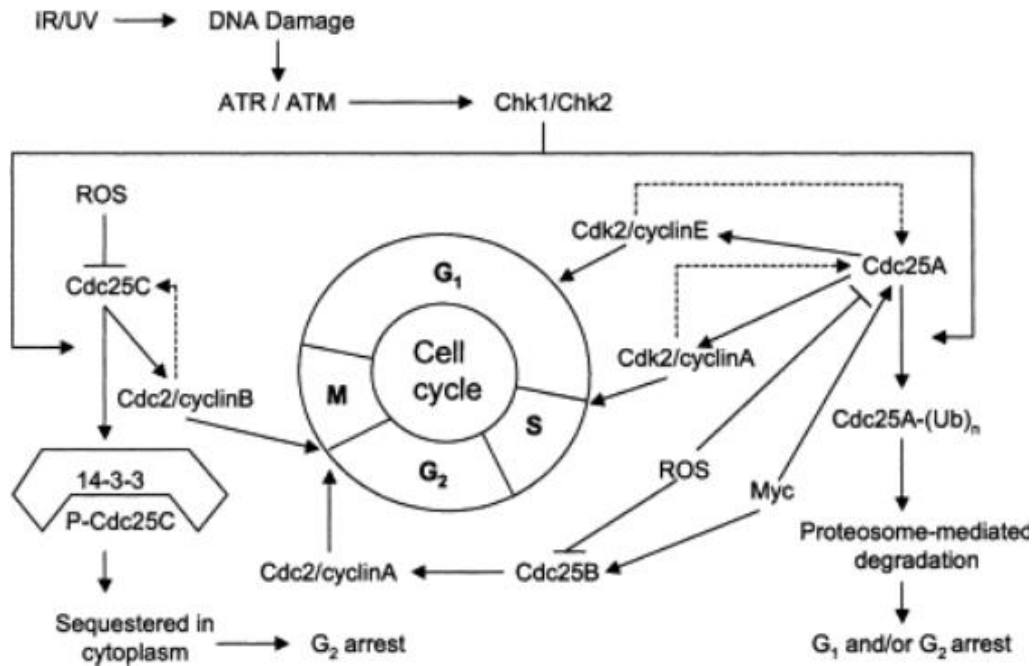
convergir e não raros são os casos em que ambas as quinases (ATM/ATR) se tornam preponderantes e responsivas aos mais diversos tipos de estresses genotóxicos.

A quinase ATR é a principal responsável pela transdução de sinal após formação transiente de fitas simples de DNA provocada por danos causados por UVC (Shiloh, 2001) e por estresse replicativo induzido por drogas como a camptotecina (Liu *et al.*, 2000) (Figura 4). Em geral, esta é recrutada através da sua parceira ATRIP, a qual se liga à proteína RPA, responsável pela ligação inicial à região de DNA fita simples. O complexo Rad17/Rfc2-5, então, é recrutado para os locais danificados de maneira dependente de RPA, bem como ATR-ATRIP. Em seguida, o segundo complexo, 9-1-1 (Rad1, Rad9, Hus1) também é recrutado em parceria com a proteína TopBP1 (Smith *et al.*, 2010). Tais complexos, então, sinalizam para que ATR seja ativada, sendo esta a responsável pela regulação de uma série de proteínas *downstream*. Entre essas proteínas, encontra-se Chk1, a qual é fosforilada por ATR nas serinas 317 e 345. Uma vez ativada, Chk1 é capaz de atuar sobre fosfatases específicas que regulam a progressão/parada do ciclo celular, e principalmente sobre a proteína p53 (Awasthi, Foiani e Kumar, 2016).



**Figura 4 – Mecanismos de ativação da proteína ATR em resposta a Danos ao DNA.** Reconhecimento de danos ao DNA por ATR e outros sensores (quadro azul). Danos provocados por radiação do tipo UVC e camptotecina são rapidamente reconhecidos pela proteína RPA, a qual se liga aos segmentos de DNA fita simples. ATR-ATRIP e Rad17 são recrutados para essas regiões, sendo em seguida o complexo 9-1-1 e a proteína TopBP1 recrutados para que então ATR seja completamente ativada. Mecanismo de ativação de ATR de modo dependente de ATM, através da ressecção após quebras na dupla fita de DNA (quadro laranja). Associação entre as proteínas ATRIP e ATR para ligação à proteína RPA recrutada para os locais de formação de fita simples de DNA (quadro verde claro). Substratos de ATR e seus respectivos agrupamentos funcionais (quadro lilás). Fonte: Shiotani e Lee (2009).

A regulação do ciclo celular pela ativação de Chk1 é feita principalmente por esta atuar fosforilando a proteína Cdc25A fosfatase, gerando uma rápida degradação de Cdc25A (Figura 5). Tal inativação promove por consequência a inativação do complexo ciclina E/Cdk2 e consequente parada do ciclo celular em G1/S (Xiao *et al.*, 2003). Tanto Chk1 quanto Chk2 atuam também fosforilando p53, um conhecido supressor tumoral que ativa p21, a qual se liga e inibe também o complexo ciclina E/Cdk2 de forma prolongada. Além disso, a ativação de p21 implica em sua ligação ao complexo ciclina D/Cdk4, inativando esses promotores do ciclo celular (Latonen e Laiho, 2005). A via ATR-Chk1-Cdc25A também parece ser preponderante no checkpoint da fase intra S, pois a degradação de Cdc25A interfere com a ativação de ciclina A/Cdk2, a qual é necessária para o disparo da origem de replicação durante a fase S. Além disso, a via de sinalização mediada por ATR é capaz de fosforilar BRCA1, NBS1 e outros alvos, promovendo a recuperação da forquilha de replicação por recombinação homóloga, por exemplo (Tibbetts *et al.*, 2000). Os pontos de controle G2/M e S/M também são regulados por ATR. Nesse caso, a degradação de Cdc25 parece promover a ativação de Wee1, controlando a atividade de ciclina B/Cdc2 sobre essas transições (Furnari, Rhind e Russell, 1997; Liu *et al.*, 2000). Apesar disso, alguns estudos sugerem que os sinais de iniciação para ativação dessa via são diferentes para cada tipo de transição (Sancar *et al.*, 2004).



**Figura 5 – Esquema ilustrativo da regulação do ciclo celular realizada por proteínas de DDR durante situações de estresse genotóxico.** Tal regulação inclui quinases, fosfatases e proteínas adaptadoras. A ativação da via de DDR pode, portanto, promover a parada do ciclo celular em seus pontos de transição, direcionando as células para processos como reparo, apoptose e senescência. Fonte: Kristjánsdóttir e Rudolph (2004).

O processo de reparo do DNA compreende diversas vias, as quais são em geral ativadas de acordo com o tipo de dano provocado. No caso da radiação ultravioleta do tipo C, as distorções na dupla fita levam ao recrutamento predominante de proteínas associadas à via de NER. Esta pode ser iniciada por duas subvias, a via de reparo do genoma global e a via de excisão de nucleotídeo acoplada à transcrição (Reardon e Sancar, 2005). Na via de reparo do genoma global, uma das principais proteínas que reconhecem distorções na estrutura do DNA é a proteína XPC, enquanto que o reconhecimento na via de excisão de nucleotídeos acoplada à transcrição é feito pela RNA polimerase II acompanhada por fatores como CSA, CSB e XAB2. Após o reconhecimento da lesão por XPC, TFIIH interage com XPC e mantém o DNA aberto através da subunidade XPB, permitindo que XPD se desloque ao longo deste até encontrar a lesão. A parada de XPD na lesão permite então a formação do complexo de pré-incisão (XPA, RPA e

XPG). Em seguida, XPA recruta ERCC1-XPF levando à incisão 5'. Após, ocorre a síntese *de novo* da fita danificada por polimerases como Pol  $\delta$ , Pol  $\kappa$ , Pol  $\epsilon$  e fatores associados, seguido da incisão 3' por XPG. Por fim, DNA ligase I ou III selam a fenda residual gerada (Goosen, 2013; Schärer, 2013).

#### 2.2.2.2 Cdc42 e Instabilidade genômica

O papel de Cdc42 para a manutenção da estabilidade genômica pode ser observado a partir de estudos com camundongos, os quais demonstraram que o knockout do gene Cdc42 é letal, provocando a morte embrionária nos primeiros 7 dias (Chen *et al.*, 2000). Mutações de Cdc42, por exemplo, podem levar à ativação constitutiva da GTPase, provocando diversas síndromes genéticas (Martinelli *et al.*, 2018). No contexto de transformação tumoral, a desregulação da atividade de Cdc42 (seja por inativação de GAPs), mutações em resíduos de aminoácidos específicos ou de sua superexpressão, pode desencadear e/ou contribuir para a promoção de um cenário de instabilidade genômica (Porter, Papaioannou e Malliri, 2016). Além disso, correlações podem ser estabelecidas a partir de estudos demonstrando o envolvimento de Cdc42 em eventos biológicos como senescência e envelhecimento, ambos frequentemente relacionados à instabilidade genômica (Wang *et al.*, 2007; Florian *et al.*, 2012).

Estudos *in vivo* têm contribuído para o entendimento de que a atuação de Cdc42 parece ser mais ampla do que se previa anteriormente com base em estudos *in vitro* que utilizavam linhagens celulares de fibroblastos, visto que em camundongos o *knockout* de genes que codificam para proteínas que regulam a inibição de Cdc42 como Cdc42GAP parece contribuir para o envelhecimento precoce (Wang *et al.*, 2007). Essa relação com o envelhecimento mostrou-se

promissora para o desenvolvimento de estratégias que inibam Cdc42 a fim de promover o rejuvenescimento tecidual (Florian *et al.*, 2012). A teoria de envelhecimento celular mediada por danos ao DNA tem se consolidado ao longo dos últimos anos e, no caso de células-tronco hematopoiéticas, mutações e danos ao DNA também estão intimamente relacionados ao envelhecimento (Florian *et al.*, 2012; Moehrle e Geiger, 2016). Assim, a possível regulação de Cdc42 sobre a resposta a danos ao DNA celular parece encontrar ressonância com um papel supressor a depender do contexto celular (Lombard *et al.*, 2005; Schumacher, Garinis e Hoeijmakers, 2008; Hoeijmakers, 2009).

Como mostrado anteriormente, tais processos biológicos estão correlacionados direta ou indiretamente à ativação da via de Resposta a Danos ao DNA. Descobriu-se, nesse sentido, que membros da mesma família de Cdc42, como Rac1 e RhoA, estão envolvidos com vias de sinalização ativadas por danos ao DNA celular. No caso de Rac1, foi demonstrado que a ativação de DDR mediada por inibidores de topoisomerase II como a doxorrubicina e o etoposídeo (Huelsenbeck *et al.*, 2012) é dependente da sua atividade. Além disso, evidências recentes conectam Rac1 à via de reparo por excisão de bases (BER) através da sua associação física no estado inativo (ligada à GDP) com a enzima 8-oxoguanina DNA glicosilase (Hajas *et al.*, 2013), bem como a sua importação nuclear via receptores de carioferina (KPNA2) presentes na membrana nuclear (Sandrock *et al.*, 2010). Nosso grupo demonstrou, ainda, que a inativação de Rac1 atenua a fosforilação de proteínas de DDR como Chk1/2 e H2AX e aumenta a sensibilidade celular à radiação do tipo UVC (Osaki *et al.*, 2016). Possíveis correlações com a família das efetoras quinásicas clássicas associadas a p21 (PAKs 1-3) têm sido estabelecidas com base nas suas atividades nucleares envolvendo o remodelamento de cromatina após

danos ao DNA, indicando um papel nuclear direto após estresse genotóxico (Pérez-Yépez *et al.*, 2018).

Para RhoA, alguns estudos mostram o seu acúmulo e ativação nuclear mediante ação da GEF Net1 sob dano por irradiação gama (Dubash *et al.*, 2011). Nosso grupo demonstrou, por exemplo, que a inativação ou depleção de RhoA também leva a um aumento de sensibilidade celular à radiação UV e gama provocados por deficiência no reconhecimento de danos ao DNA (atenuação da fosforilação das proteínas H2AX e Chk1/2) (Espinha *et al.*, 2016).

No caso de Cdc42, observou-se que é a sua hiperativação a responsável pela atenuação de proteínas de vias de sinalização de reconhecimento de dano (pH2AX e pChk1), ocorrendo um aumento da sensibilidade celular após exposição à radiação do tipo UVC. Nesse sentido, após o dano, os mutantes que expressam Cdc42 hiperativa sofrem um acúmulo em G2/M, o que se traduz em uma maior morte celular (principalmente apoptótica) (Ascer *et al.*, 2015).

Sequências sinais de importação nuclear também possuem papel preponderante para a translocação e acúmulo nuclear de Rac1 e RhoA. Embora uma sequência sinal de localização nuclear também esteja presente em Cdc42, a sua localização nuclear permanece incerta (Williams, 2003). Entretanto, Cdc42 parece interagir diretamente com vias envolvendo importantes supressores tumorais, como p53 (Gadéa *et al.*, 2002), PTEN (Li *et al.*, 2005; Martin-Belmonte *et al.*, 2007; Deevi *et al.*, 2011) e APC (Sudhakaran *et al.*, 2011). A regulação detalhada do balanço entre tais proteínas supressoras e Cdc42 permanece incerta.

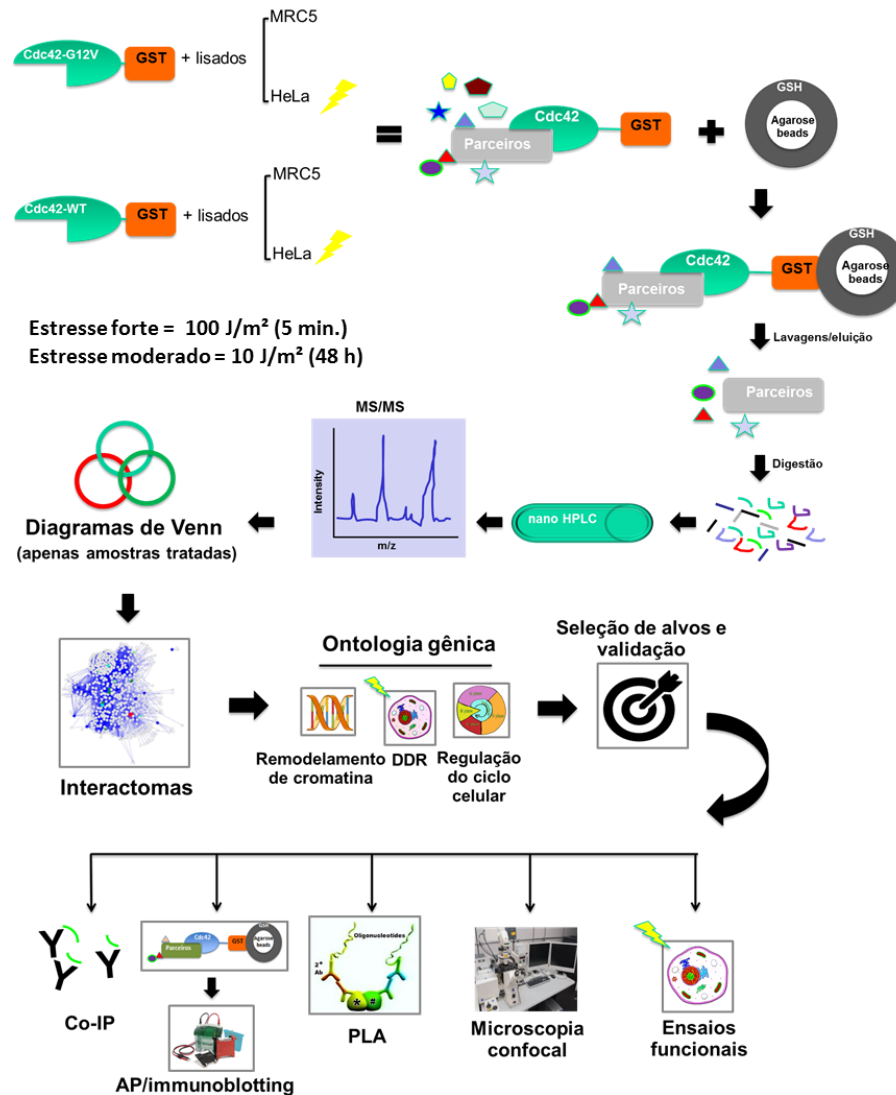


### 2.3 PARCEIROS DE INTERAÇÃO DE CDC42 E INSTABILIDADE GENÔMICA

A exploração de interações entre Cdc42 e potenciais parceiros proteicos no contexto de instabilidade genômica foi explorada anteriormente por nosso grupo (Silva *et al.*, 2019). Para essa finalidade, utilizou-se a purificação por cromatografia de afinidade seguida de identificação dos parceiros por espectrometria de massas (Figura 6). A estratégia inicial partiu de ensaios *in vitro* (*pull down*), incubando-se as proteínas recombinantes GST-Cdc42-WT e GST-Cdc42-G12V, além do controle GST, com lisados celulares de HeLa e MRC5 obtidos após exposição ou não à radiação UVC. Essa exposição foi realizada sob duas condições de tratamento, denominadas estresse moderado e forte. No primeiro caso, as células foram expostas a doses intermediárias de radiação UVC, sendo esperado um baixo nível de lesão ao DNA, com consequente ativação de vias de reparo específicas (por exemplo, NER). Nesse cenário, uma parte das células conseguirá se recuperar e continuará proliferando, enquanto outra será direcionada à apoptose. Além disso, espera-se observar alterações na distribuição de GTPase, como o possível redirecionamento para outros compartimentos subcelulares. Por outro lado, na condição de estresse forte, esperam-se elevados níveis de lesões ao DNA, os quais são gerados de forma rápida, e o recrutamento de proteínas que funcionam para reparar os sítios de dano de maneira independente de tradução.

Portanto, como mostrado no fluxograma experimental empregado no estudo, os lisados obtidos sob ambas as condições (e não tratados) foram incubados com as respectivas iscas recombinantes de Cdc42, sendo os parceiros proteicos isolados e identificados por espectrometria de massas. Foram construídos, então, diagramas de Venn, selecionando-se as proteínas encontradas exclusivamente nas amostras tratadas. Em seguida, redes de interação proteína-proteína foram construídas, e o

conjunto de proteínas selecionadas foi agrupado de acordo com as funções biológicas referentes aos seus respectivos genes (ontologia gênica). Por fim, as proteínas PAK-4, PHB-2, 14-3-3 $\eta$  e Cdc42EP3 foram selecionadas neste trabalho para posterior validação a partir dos resultados de microscopia de fluorescência confocal.



**Figura 6 – Abordagem experimental para identificação e seleção de parceiros proteicos de Cdc42 sob condições de instabilidade genômica.** Para a identificação dos parceiros, foi empregada a técnica de purificação por afinidade utilizando iscas recombinantes de Cdc42 selvagem (WT) ou constitutivamente ativa (G12V), as quais foram incubadas com lisados celulares de HeLa e MRC5 tratados ou não com radiação UVC. Os parceiros foram identificados por proteômica e aqueles pertencentes às amostras exclusivamente tratadas foram utilizados para a construção de redes de interação proteína-proteína. Por fim, agruparam-se os alvos de acordo com processos biológicos envolvidos na manutenção da estabilidade genômica (remodelamento de cromatina, resposta a danos ao DNA e regulação do ciclo celular). A partir desses resultados, prosseguiu-se com este trabalho, validando por várias técnicas as parceiras de Cdc42: PAK-4, PHB-2, 14-3-3 $\eta$  e Cdc42EP3. Fonte: O autor (2019).

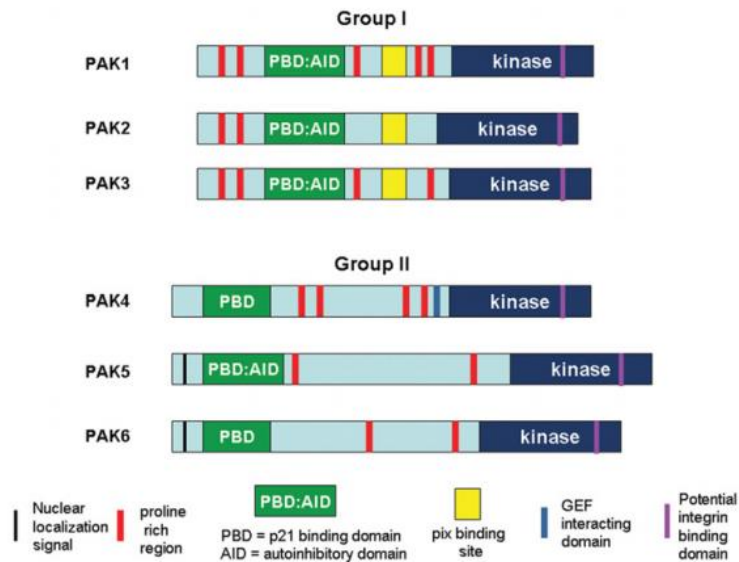
### 2.3.1 PAK-4

Um grupo de proteínas efetoras fundamentais ativadas por Cdc42 é o que inclui as PAKs, serina/treonina quinases que fosforilam e modificam uma série de proteínas envolvidas na reorganização da arquitetura celular, como por exemplo, componentes dos filamentos de actina e intermediários, microtúbulos, integrinas e proteínas correlacionadas (Szczepanowska, 2009; Ye e Field, 2012; Rane e Minden, 2014).

Estruturalmente, as PAKs são classificadas em dois grupos (tipo I e tipo II) (Figura 7). Ambos compreendem PAKs com regiões bastante conservadas, como o domínio catalítico. Este se mantém inativo pela interação com o domínio de auto-inibição (AID), no caso das PAKs 1/2/3, e pela presença de um domínio de pseudo-substrato (PSB) no caso das PAKs 4/5/6 (Kumar *et al.*, 2017). Em geral, PAKs do tipo I mantêm-se como homodímeros no estado inativo, enquanto que as do tipo II permanecem monoméricas. Assim, para completa ativação, a interação de GTPases como Rac e Cdc42 com o domínio PBD promove uma mudança conformacional a qual alivia essa auto-inibição sobre o domínio catalítico, possibilitando a fosforilação em resíduos de serina e treonina de substratos-alvo (Morreale *et al.*, 2000). Diferentemente das quinases do grupo II, as PAKs 1/2/3 possuem uma região rica em prolinas na porção N-terminal, responsável pela ligação à proteína adaptadora NCK, uma importante reguladora do remodelamento do citoesqueleto de actina (Jaffer e Chernoff, 2002; Rane e Minden, 2014).

No caso do grupo II, o domínio catalítico é altamente conservado e mantém relativa homologia com as quinases do grupo I. Por outro lado, PAK-4 possui a presença de um domínio de interação com fatores de troca de guanina (GEFs), sendo detectada sua interação com GEF-H1 e PDZ-RhoGEF (Wells e Jones, 2010).

Além disso, foi demonstrado recentemente que, além do domínio CRIB, a região polibásica de PAK-4 é essencial para a sua completa ativação por Cdc42 (Ha e Boggon, 2018).

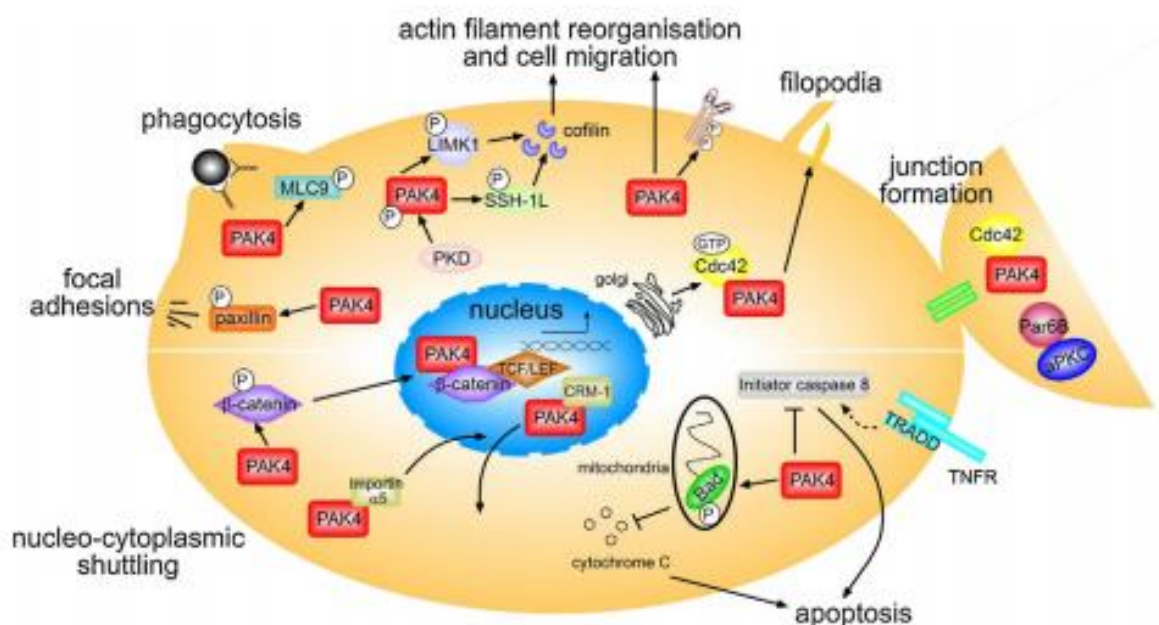


**Figura 7 - Estrutura dos domínios das proteínas PAK do tipo I e II.** As PAKs do grupo I são ativadas tanto por Rac1 como por Cdc42, enquanto que PAKs do grupo II são principalmente ativadas por Cdc42. A atividade catalítica das PAKs do grupo I é dependente da interação com GTPases, principalmente pela redução da repressão promovida pelo autodomínio inibitório  
Fonte: Wells e Jones (2010).

O interesse por PAK-4 no contexto tumoral vem crescendo nos últimos anos, visto que a sua superexpressão foi demonstrada em diversas linhagens tumorais (Callow *et al.*, 2002). Sabe-se, por exemplo, que as isoformas do grupo I (PAK1, 2 e 3) não são capazes de transformar as células, enquanto que PAK-4 ativada por Cdc42 pode promover crescimento independente de ancoragem por fibroblastos, o que se caracteriza como uma etapa fundamental na oncogênese (Abo, 1998; Callow *et al.*, 2002). Os resultados obtidos para PAK-4 *in vitro* também se mostraram reprodutíveis em camundongos atímicos, induzindo a formação de tumores que se assemelham morfológicamente a sarcomas. A ativação de PAK-4, portanto, é fundamental nesse tipo de processo, visto que células *knockout* para PAK-4, porém

superexpressando Cdc42, parecem não apresentar um fenótipo tumoral (Liu *et al.*, 2008).

Entre as funções de PAK-4 não relacionadas diretamente ao remodelamento do citoesqueleto de actina estão a modulação do transporte nucleocitoplasmático da proteína  $\beta$ -catenina (Li *et al.*, 2012) e a prevenção do processo apoptótico desencadeado por radiação UV, TNF- $\alpha$  e careciamento de soro (Dart e Wells, 2013) (Figura 8).



**Figura 8 - Vias de sinalização envolvendo PAK-4.** Processos como o remodelamento do citoesqueleto de actina, translocação de proteínas e apoptose são regulados por PAK-4. A dependência de Cdc42 para a ativação de PAK-4 mediando grande parte desses processos permanece incerta.

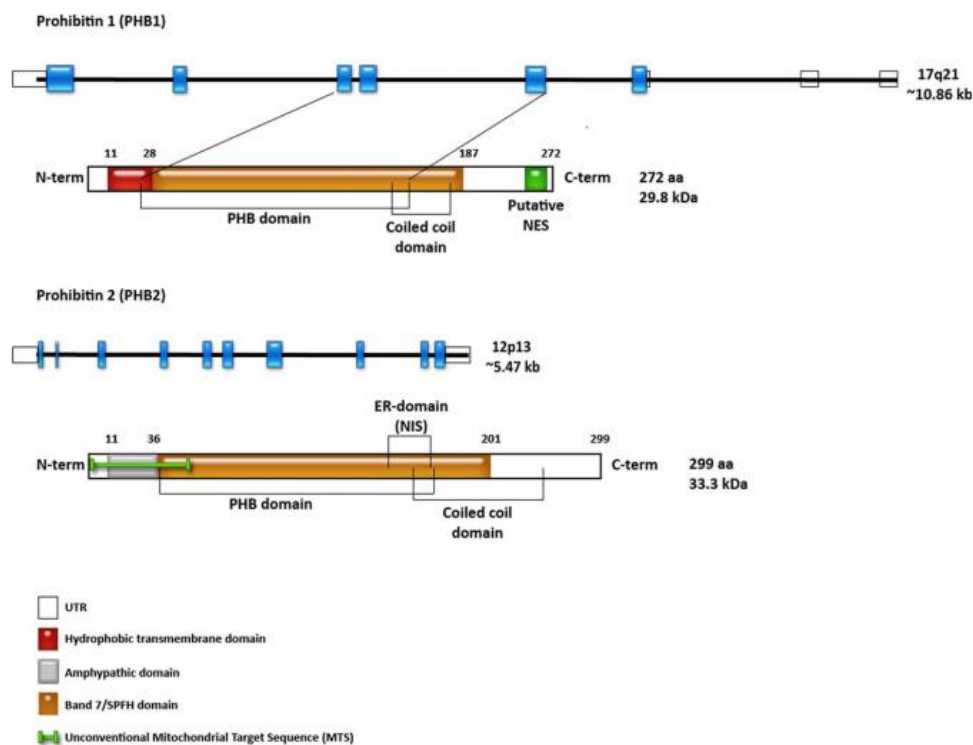
Fonte: Dart e Wells (2013).

### 2.3.2 PHB-2

As proibitinas são proteínas ubiquamente expressas em eucariotos. São geralmente divididas em tipo I e II, sendo a proibitina 2 pertencente à segunda classe. A observação inicial de que essas proteínas eram capazes de inibir a progressão do ciclo celular foi posteriormente ampliada (McClung *et al.*, 1989),

sendo-lhes atribuídas funções biológicas de acordo com a sua localização subcelular (Zhou e Qin, 2013).

Estruturalmente, PHB-2 possui um domínio transmembrana essencial para a sua localização mitocondrial, um domínio proibitina, o qual contém a sequência necessária para o reconhecimento de receptores de estrogênio, e uma sequência de importação nuclear (Figura 9) (Bavelloni *et al.*, 2015).



**Figura 9 – Características estruturais das proteínas PHB-1 e PHB-2.** As proibitinas PHB-1 e PHB-2 diferem estruturalmente pelo número de aminoácidos e por sequências específicas que são responsáveis pela localização subcelular de ambas as proteínas. No caso de PHB-2, propõe-se uma sequência de importação nuclear dentro do domínio de ligação ao receptor de estrogênio, enquanto em PHB-1 tem-se uma sequência de exclusão nuclear. Fonte: Bavelloni *et al.* (2015).

Entre as funções principais de PHB-2 estão: (1) a formação do complexo PHB1/2, o qual é responsável pela estabilidade mitocondrial; (2) a transcrição de genes relacionados ao receptor de estrogênio (ER), MEF2, MyoD e PPAR $\gamma$ ; e (3) a associação com receptores de superfície celular. No primeiro caso, PHB-1/PHB-2 formam complexos tetraméricos anelares, os quais se inserem na membrana interna

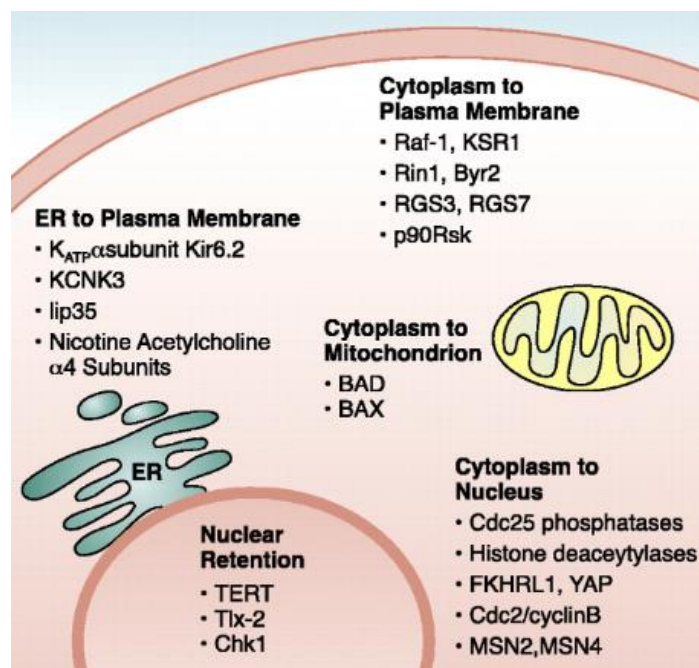
mitocondrial, protegendo proteínas recém-sintetizadas da degradação de proteases. Alguns estudos demonstram, por exemplo, que em diversas linhagens tumorais PHB-2 encontra-se superexpressa. Tal fenômeno tem sido atribuído provavelmente como sendo um mecanismo compensatório para o elevado estresse oxidativo mitocondrial gerado ao longo das modificações metabólicas características do câncer, como a intensificação da dependência em relação à respiração mitocondrial (Merkwirth e Langer, 2009; Bavelloni *et al.*, 2015).

Por outro lado, o envolvimento de PHB-2 na transcrição de genes está intimamente ligado ao seu papel sobre receptores de estrogênio (ER $\alpha$ ). Nesse caso, após estímulo desses receptores, PHB-2 é capaz de se translocar para o núcleo juntamente à ER $\alpha$ , impedindo a sua resposta transcricional (He *et al.*, 2007). Essa resposta parece ser dependente das histonas deacetilases 1 e 5 (HDACs 1 e 5) (Dart *et al.*, 2012; Bavelloni *et al.*, 2015). Tal comportamento repressor em associação com HDACs também compreende outros receptores nucleares relacionados a processos como: fatores de regulação miogênicos (MEF2, MyoD) (Sun *et al.*, 2009) e vias de sinalização envolvendo a adipogênese (PPAR $\gamma$ ) (Ande *et al.*, 2012; Bavelloni *et al.*, 2015). Além disso, foi demonstrada a interação física entre proibitinas e o complexo MCM2-7, sugerindo um papel indireto sobre helicases que controlam a replicação do DNA (Rizwani, Alexandrow e Chellappan, 2009).

Por fim, PHB-2 também pode ser encontrada na membrana plasmática, interagindo com componentes da via de sinalização de insulina (IGFBP-6), e estimulando a migração de células de rabdmiossarcoma (Fu, Yang e Bach, 2013).

### 2.3.3 14-3-3 $\eta$

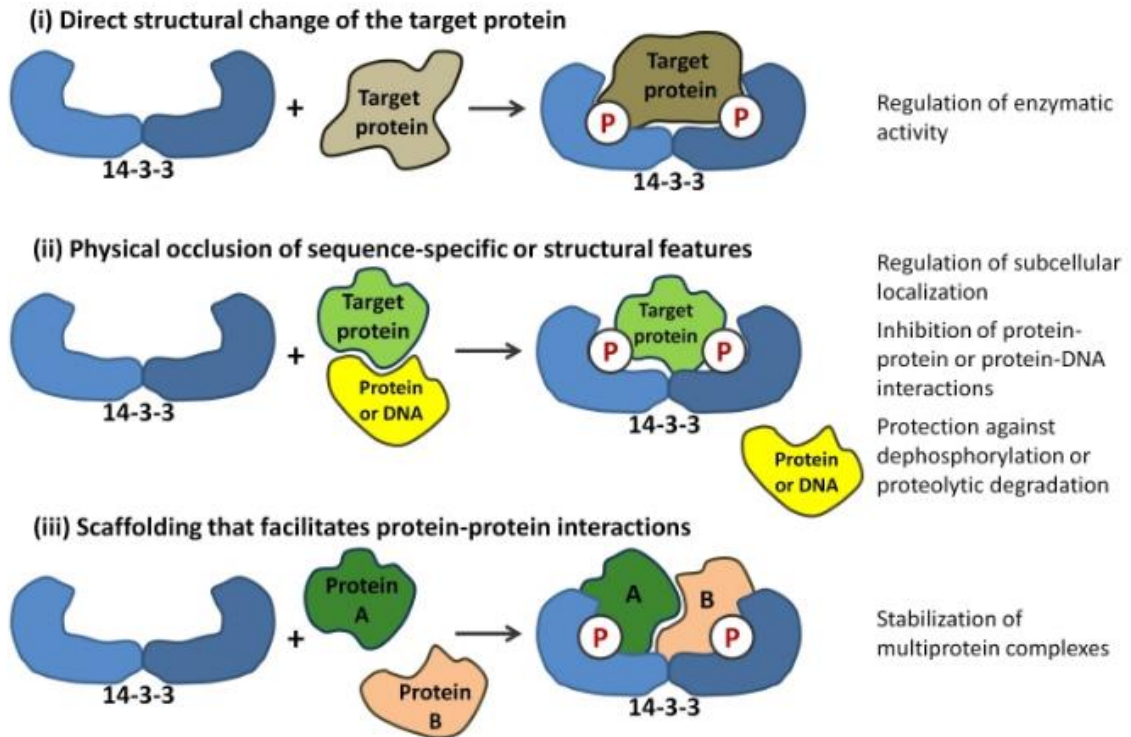
A família 14-3-3 consiste em um grupo de proteínas acídicas diméricas de 28 kDa, primeiramente descobertas em tecido cerebral e assim nomeadas a partir da eluição por cromatografia bidimensional em coluna de celulose (fração 14) e posterior migração das frações de homogenato de cérebro bovino submetido a eletroforese em gel de amido (fração 3.3) (Ichimura *et al.*, 1988; Aitken, 2006). Posteriormente, foi descoberto que a sua expressão é ubíqua e possui sete isoformas ( $\alpha$ - $\eta$ ) em mamíferos, as quais estão envolvidas em processos como regulação do ciclo celular, tráfego intracelular, estrutura do citoesqueleto, apoptose e transcrição de genes alvo (Fu, Subramanian e Masters, 2002) (Figura 10).



**Figura 10 – Processos biológicos envolvendo a família 14-3-3.** As proteínas 14-3-3 atuam sobre diversas estruturas subcelulares, incluindo mitocôndrias e retículo endoplasmático. Além disso, são capazes de conectar vias de sinalização entre o núcleo e citoplasma.  
Fonte: Dougherty e Morrison (2004).

Estruturalmente, os membros da família 14-3-3 reconhecem dois tipos de seqüências consenso contendo resíduos de fosfotirosina e fosfoserina RSXpSXP ou RXXXpSxP (Dougherty e Morrison, 2004) (Figura 11).





**Figura 11 – Mecanismos de ação das proteínas pertencentes à família 14-3-3.** (i) 14-3-3 pode ser associar a proteínas-alvo, modificando a sua atividade enzimática. (ii) 14-3-3 também é capaz de atuar regulando a localização subcelular de proteínas, inibindo interações proteína-proteína ou aumentando a estabilidade proteica. (iii) atuação como estabilizador de interações múltiplas.  
Fonte: Obsil e Obsilova (2011).

Sabe-se que 14-3-3 está envolvida na via de Raf-1, Bad, Cdc25 e p53. No caso de Raf-1, a qual é recrutada por Ras para se localizar na membrana, ocorre a fosforilação de MEK por mecanismos ainda não completamente elucidados, e a ativação dessa via para a expressão de genes envolvidos na divisão celular. Membros da família 14-3-3 parecem estimular essa fosforilação por dois mecanismos: mantendo Raf-1 inativa na ausência de sinais de estímulo, e promovendo a ativação e estabilização de Raf-1 na forma ativa quando em presença desses sinais (Hartman e Hirsch, 2017).

Diversas isoformas de 14-3-3 regulam direta ou indiretamente processos envolvendo instabilidade genômica. No caso da isoforma  $\epsilon$ , foi demonstrado que esta é capaz de regular o destino de células de carcinoma hepatocelular em

resposta a danos ao DNA provocados por bleomicina através da associação com a MAP quinase TAK1 (Tang *et al.*, 2013).

A isoforma  $\sigma$ , por exemplo, contribui para a resistência à radiação gama prevenindo as células de entrarem em apoptose e regulando o reparo de quebras duplas no DNA via PARP1 e Chk2 (Chen *et al.*, 2017). Por fim, a estabilização do fator de transcrição E2F1 em resposta a danos promovidos por adriamicina requer a sua interação com 14-3-3  $\tau$  a fim de evitar a sua degradação. Esta ação previne as células de entrarem em apoptose (Milton *et al.*, 2006).

Particularmente, a isoforma  $\eta$  apresenta papel fundamental na regulação da resposta a danos ao DNA em glioblastomas após radiação ionizante, pois a sua depleção leva ao aumento de sensibilidade das células ao dano resultando em morte celular (Park *et al.*, 2014). Apesar disso, ainda existem poucos estudos demonstrando a função desta isoforma nos mecanismos de resposta a danos ao DNA celular.

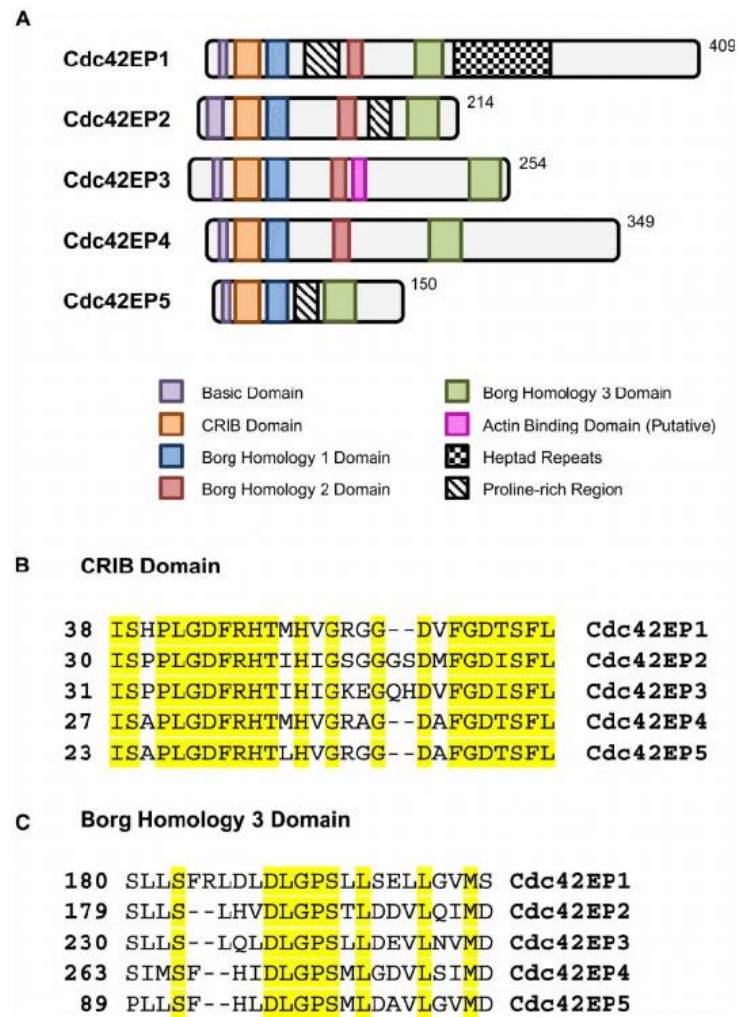
#### 2.3.4 CDC42EP3 (Borg2) e o eixo Septina-SOCS7-NCK

O primeiro membro da família Borg (*Binder of Rho GTPases*), a proteína MSE55 (*human bone marrow stromal/endothelial protein*), foi identificado a partir de lisados de células humanas endoteliais, sendo-lhe atribuído um possível papel na hematopoiese (Bahou, Campbell e Wicha, 1992). Posteriormente, MSE55 foi identificada como uma das parceiras de Cdc42/Rac1 por conter o tradicional motivo CRIB presente em parceiros de GTPases. Para esse estudo, tomou-se como base para a varredura a sequência CRIB da parceira já conhecida p65PAK (PAK1), encontrada em bancos de dados (GenBank), sendo validada a interação entre MSE55 (isca GST-MSE55) e Cdc42 ativa (autorradiografia) (Burbelo, Drechsel e

Hall, 1995). Em seguida, MSE55 foi renomeada como Borg5, sendo novamente descrita juntamente a outros membros da família Borg (1-4) através de ensaios de duplo híbrido utilizando como isca a Rho GTPase TC10/RhoQ (Joberty, Perlungher e Macara, 1999). Tais proteínas foram, então, caracterizadas como parceiras bastante seletivas de Cdc42 ativa, ligando-se ao tradicional motivo CRIB e atuando como um efetor não quinásico desta sobre o citoesqueleto de septina (Joberty *et al.*, 2001), sendo então renomeadas como Cdc42EP1-5 (*Cdc42 Effector Protein*) (Farrugia e Calvo, 2016).

Estruturalmente, as Cdc42EP1-5 caracterizam-se pela presença de diversos domínios, os quais mantêm relativa homologia entre si (Figura 12). A existência de um possível domínio de ligação à actina é uma característica marcante de Cdc42EP3, sendo demonstrada a interdependência entre os citoesqueletos de septina e actina através dessa proteína. A interação direta desses efetores com os complexos heterodiméricos (SEPT 6/7) e heterotriméricos (SEPT 2/6/7) de septinas se dá através do domínio BH3 (Borg Homology 3 Domain), contribuindo para a estruturação local das redes filamentosas de actina e septina (Farrugia e Calvo, 2016).

Até o presente momento, Cdc42EP3 foi implicada na transformação de fibroblastos a um fenótipo mais agressivo de fibroblastos associados ao câncer, os quais possuem papel essencial para o microambiente tumoral. Além disso, a sua superexpressão parece acompanhar a transição epitélio-mesenquimal em câncer de mama, modulando a via YAP/TAZ com o intuito de promover uma matriz extracelular mais rígida e, portanto, mais resistente para as células tumorais (Farrugia e Calvo, 2017).

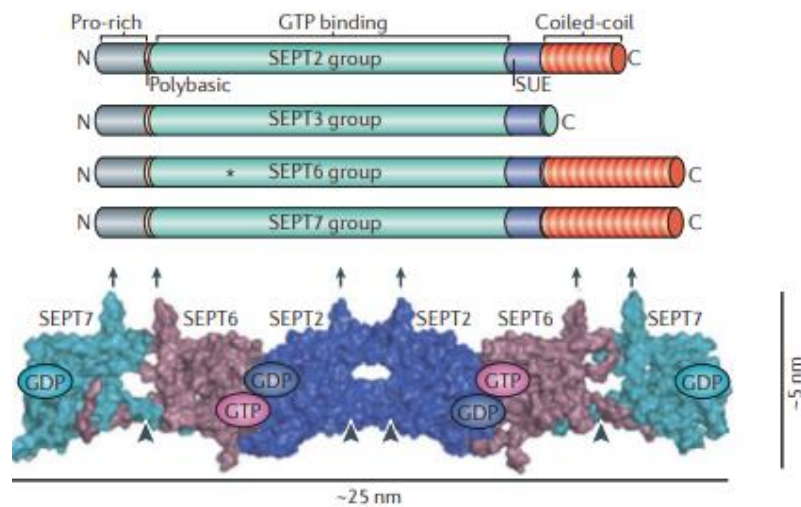


**Figura 10 - Domínios característicos dos membros da família Borg (Cdc42EP).** **A.** Destaque para o domínio de ligação ao citoesqueleto de actina (em rosa) apenas para Cdc42EP3, e para o domínio de interação com Cdc42 ativa (CRIB, em laranja). **B.** Diferenças no domínio CRIB entre as Cdc42EPs. **C.** Diferenças na homologia do domínio BH3 (Borg homology domain), responsável pela ligação às septinas. Fonte: Farrugia e Calvo (2016).

Outro papel importante de Cdc42EP3 é o de regulador do citoesqueleto de septina (Neubauer e Zieger, 2017). As septinas têm sido propostas como o quarto componente do citoesqueleto, juntamente à actina, filamentos intermediários e microtúbulos (Mostowy e Cossart, 2012). Estas foram inicialmente identificadas há mais de 40 anos em *S. cerevisiae*, sendo-lhes atribuída a função de formação de septos no processo de brotamento em leveduras (Hartwell, 1971). Posteriormente, septinas humanas também foram identificadas e estruturalmente caracterizadas como proteínas ligadoras de GTP (Figura 13). Sabe-se, por exemplo, que para que

sejam funcionalmente ativas estas proteínas precisam atuar em complexos oligoméricos (Spiliotis e Dolat, 2015). Em geral, as suas associações permitem que desempenhem funções bastante especializadas no contexto celular, como por exemplo, na sustentação de proteínas que regulam a citocinese durante a divisão celular, no suporte para receptores de membrana e na atuação como barreira de difusão em espermatozoides e cílios (Joo, Tsang e Trimble, 2005; Bridges e Gladfelter, 2015).

O complexo heterotrimérico de septinas 2/6/7 é um dos mais bem caracterizados e já foi demonstrado que o silenciamento de Cdc42EP3 é capaz de desestruturar as redes filamentosas de septina e actina. Esse fenômeno parece estar relacionado à observação de que Cdc42EP3 funciona como uma espécie de "cola" molecular, a qual interconecta as fibras de septina à actina (Calvo *et al.*, 2015). De fato, a preponderância dessa inter-relação entre esses dois tipos de citoesqueletos não é exclusiva de Cdc42EP3, pois outras Cdc42EP também possuem a capacidade de alterar o citoesqueleto de actina, porém em menor extensão (Farrugia e Calvo, 2017). Contudo, esse efeito maior de remodelação é atribuído à Cdc42EP3, uma vez que somente esta possui um sítio de ligação à actina. Portanto, alterações nessa proteína em específico parecem impactar diretamente em ambos os citoesqueletos, promovendo alterações estruturais importantes para as células.

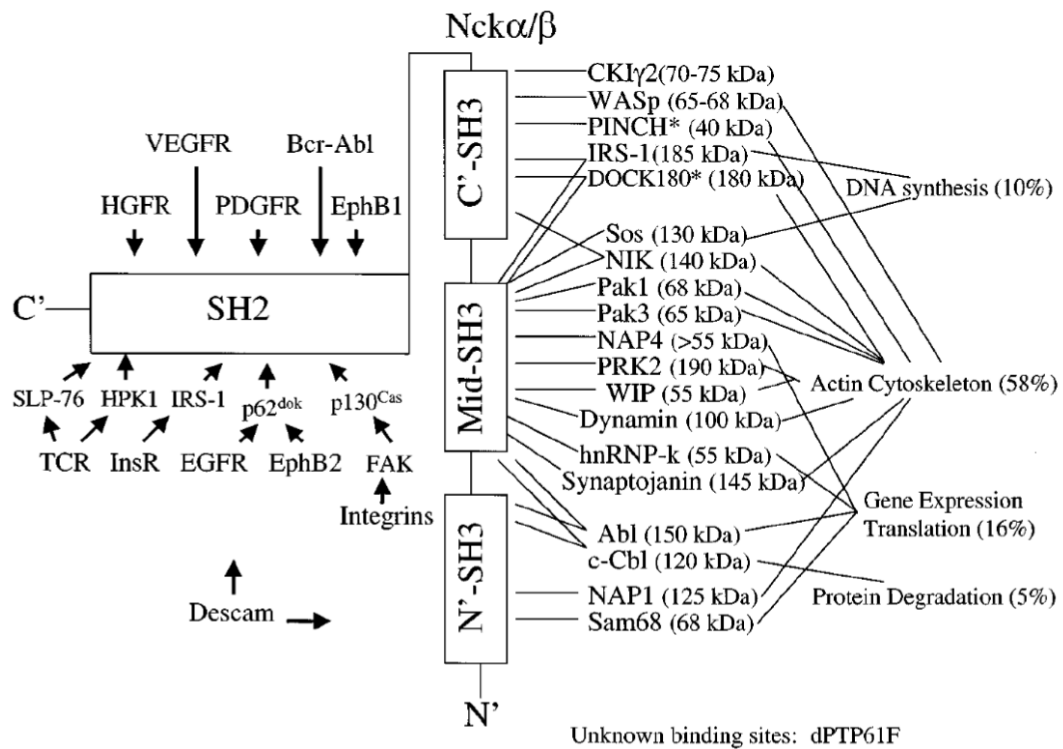


**Figura 11 - Estrutura dos domínios das septinas 2, 3, 6 e 7.** As septinas são proteínas ligadoras de GTP, associando-se e formando heterooligômeros funcionalmente ativos.  
Fonte: Mostowy e Cossart (2012).

Outros parceiros de interação com os complexos de septinas vem sendo identificados recentemente, como a proteína SOCS7 (*Suppressor of Cytokine Signaling 7*). Esta é mais conhecida por regular diretamente a atividade de STAT3 e STAT5, levando ao seu sequestro citosólico e impedindo que interajam com o DNA, resultando em uma inibição de vias de sinalização envolvendo hormônios como a prolactina e leptina (Noguchi *et al.*, 2013). Nos últimos anos, porém, SOCS7 tem sido implicada em funções não canônicas envolvendo a interação física direta com os complexos de septinas. Como já demonstrado, esta possui sequências de importação nuclear, sendo capaz de atuar como uma espécie de sensor de integridade das fibras de septina. Portanto, a desestabilização dos complexos de septina, seja por silenciamento de qualquer um dos seus componentes, seja por agentes genotóxicos, resulta no acúmulo nuclear de SOCS7. Esse acúmulo nuclear é capaz de translocar simultaneamente a proteína adaptadora NCK1/2, uma vez que esta não possui sequências de importação nuclear (Kremer, Adang e Macara, 2007).

Proteínas adaptadoras como as NCKs possuem como característica geral favorecer a formação de complexos macromoleculares para a ativação de cascatas

de sinalização intracelulares. Tal família compreende duas isoformas (NCK1/ $\alpha$  e 2/ $\beta$ ) contendo três domínios SH3 e um domínio SH2 C-terminal (Li, Fan e Woodley, 2001; Buday, Wunderlich e Tamás, 2002) (Figura 14). A interação entre NCK e outras proteínas tem sido cada vez mais descrita, incluindo interações diretas com efetores de Rho GTPases como a família das PAKs (Lu *et al.*, 1997) e N-WASP (Rohatgi *et al.*, 2001). Além disso, diversos estudos demonstram a correlação entre o reconhecimento via SH2 de resíduos de tirosinas fosforiladas em receptores de membrana, os quais ativam Rho GTPases como Cdc42 e Rac1 (Buday, Wunderlich e Tamás, 2002). Entre os parceiros das NCKs encontram-se majoritariamente proteínas que regulam o citoesqueleto de actina (58%) (Figura 14). No entanto, há controvérsias em relação aos mecanismos de interação entre NCK e efetores de Cdc42, como a proteína WASP. Alguns estudos demonstram que Cdc42 ativa, interagindo com NCK, é responsável pela polimerização de actina pela interação conjunta sobre WASP (Higgs e Pollard, 2000), enquanto outros estudos reportam que NCK associada a receptores de membrana pode ativar WASP e a polimerização de actina (via complexo Arp2/3) independente de Cdc42 ativa (Rohatgi *et al.*, 2001). Já no caso das PAKs, sabe-se que NCK é responsável por recrutar PAK1 citoplasmática para próximo da membrana, permitindo a interação com Cdc42 ativa (Bokoch *et al.*, 1996).



**Figura 12 - Parceiros de interação das NCKs.** Os domínios SH2 contribuem para a aproximação com receptores de membrana, por exemplo, enquanto que os domínios SH3 permitem a multiplicidade de interações com proteínas que regulam principalmente o remodelamento do citoesqueleto de actina.  
Fonte: Li, Fan e Woodley (2001).

Particularmente interessante, no entanto, é o acúmulo nuclear dessa proteína pós-estresse genotóxico, sendo demonstrada a sua conexão com as vias de resposta a danos ao DNA, através do impacto direto sobre a fosforilação completa de Chk2 (Thr68) e p53 (Ser15) em resposta a radiação UVA, mitomicina C e hidroxiureia (Kremer, Adang e Macara, 2007).

A regulação diferencial de proteínas de DDR frente à modulação do *status* de Cdc42, e a identificação de famílias de proteínas efetoras de Cdc42 envolvidas na regulação de septinas (Cdc42EP) por nosso grupo, levam ao questionamento de que Cdc42 ativa possa regular vias de DDR indiretamente, a partir do eixo Cdc42EP3-Septinas-SOCS7-NCK1/2.



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar possíveis envolvimento de Cdc42 em mecanismos reguladores de estabilidade genômica em linhagens celulares humanas submetidas à radiação ultravioleta do tipo C.

##### 3.1.1 Objetivos específicos

###### Parte I:

1) Validar possíveis interações de Cdc42 com as proteínas PHB-2, 14-3-3 $\eta$ , PAK-4 em lisado de linhagem celular HeLa (adenocarcinoma de cérvix humano), obtido após exposição à radiação ultravioleta (UVC);

2) Investigar a dependência destas interações com Cdc42 ativa através do uso de sublinhagens clonais de HeLa expressando ectopicamente o mutante constitutivamente ativo Cdc42-G12V por ao menos uma das técnicas anteriores após tratamento com UVC em experimentos comparativos à linhagem parental HeLa (expressando endogenamente Cdc42 selvagem);

###### Parte II:

1) Explorar a hiperativação de Cdc42 sob diferentes contextos celulares, através de ensaios clonogênicos e avaliação do padrão de fosforilação de proteínas de DDR;

- 2) Validar, através de colocalização por microscopia de fluorescência confocal, a possível interação de Cdc42 com a proteína Cdc42EP3 em células parentais HeLa submetidas a estresse por radiação ultravioleta do tipo C;
  
- 3) Investigar o possível papel de Cdc42EP3 na sensibilização das linhagens HeLa parental e na sublinhagem HeLa Cdc42-G12V em resposta à radiação UVC por meio de ensaios clonogênicos após expressão ectópica desta;
  
- 4) Propor, a partir dos resultados acima mencionados, o envolvimento da proteína NCK1/2 nas respostas acima observadas

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 CULTURA DE CÉLULAS

As células HeLa (adenocarcinoma cervical humano - ATCC<sup>®</sup> CCL-2<sup>™</sup>) e HaCaT (queratinócitos humanos imortalizados) foram obtidas junto a coleções especializadas (American Type Culture Collection, VA, USA) e mantidas incubadas em meio Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) (Invitrogen) contendo 10% de soro bovino fetal (Cultilab) a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> em incubadora.

Sublinhagens clonais de HeLa e HaCaT constitutivamente ativas Cdc42-GTP (Cdc42-G12V) já estabelecidas e caracterizadas em nosso laboratório foram mantidas em meio Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) (Invitrogen) contendo 10% de soro bovino fetal (Cultilab) e 100 µg/mL de antibiótico de seleção genética (G418) a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> em incubadora (Ascer *et al.*, 2015). As células eram rotineiramente repicadas a cada 48-72 horas para serem utilizadas nos experimentos, dando-se preferência por alíquotas descongeladas em passagens baixas.

### 4.2 TRATAMENTO DAS LINHAGENS CELULARES

Para o tratamento com radiação ultravioleta do tipo C as células foram plaqueadas 24 horas antes do tratamento em placas p100 até atingirem aproximadamente 80% de confluência na condição controle e tratadas. Em seguida, essas foram submetidas às respectivas doses de UVC de 100 J/m<sup>2</sup> (seguido de incubação por 5 minutos - estresse forte) ou 10 J/m<sup>2</sup> (seguido de incubação por 48 horas - estresse moderado). Alternativamente, as cinéticas foram realizadas com as respectivas doses mencionadas de acordo com os experimentos realizados. Como

controle, foram utilizadas células não submetidas ao tratamento. A irradiação foi feita utilizando-se a lâmpada da própria cabine de segurança biológica (Esco Class II BSC), adicionando-se PBS (80 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 100 mM NaCl, pH 7,2) às placas e expondo-as destampadas às doses de UVC pelo tempo necessário. Tais tempos foram determinados por recorrentes calibrações das lâmpadas utilizando-se o dosímetro VLX 3W (Vilbert Lourmat), com sonda específica para o comprimento de onda referente à radiação do tipo UVC. No caso dos tratamentos com as drogas, as células foram expostas a 2 mM de hidroxureia ou 2  $\mu\text{M}$  de camptotecina por 24 horas. As drogas foram diluídas nos respectivos meios de cultura a partir de soluções estoque de 1 M (HU) ou 10 mM (CPT) solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO, concentração final 0,1%).

#### 4.3 OBTENÇÃO DE LISADOS CELULARES

##### 4.3.1 Lisados totais

Para a obtenção de lisados celulares totais com o intuito de analisar a expressão de proteínas por Western blotting, as células ( $10^6$ - $10^7$  células) foram lavadas duas vezes com PBS (NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,5 mM,  $\text{CaCl}_2$  1 mM,  $\text{MgCl}_2$  0,5 mM, pH 7.4) e colocadas sob o gelo. Em seguida, foram rompidas com tampão de lise celular RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7,2; 1% TritonX-100; 0,5% deoxicolato de sódio; 0,1% SDS; 500 mM NaCl; 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ) acrescido de inibidores de proteases (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  leupeptina, 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  aprotinina A, 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  pepstatina A, 1 mM PMSF) e fosfatases (1 mM de ortovanadato de sódio e 1 mM de fluoreto de sódio). As células foram mantidas em gelo por 10 minutos e removidas das placas com auxílio de espátula. O homogenato foi centrifugado por

10 minutos a 16.000 x g a 4°C e o sobrenadante coletado e armazenado em freezer a -20°C.

Alternativamente, para os ensaios de *GST-pull down*, os lisados totais foram obtidos seguindo-se o mesmo procedimento mencionado acima, porém a lise celular foi realizada em tampão Pierce modificado (25 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% NP-40) acrescido de inibidores de proteases (2 µg/mL leupeptina, 2 µg/mL aprotinina A, 2 µg/mL pepstatina A, 1 mM PMSF) e fosfatases (1 mM de ortovanadate de sódio e 1 mM de fluoreto de sódio).

#### 4.3.2 Fracionamento celular

No caso dos lisados nucleares, as células ( $10^6$ - $10^7$  células) foram plaqueadas em placas p100, tripsinizadas e coletadas em PBSA com auxílio de espátula. Após, essas foram centrifugadas a 600 x g por 3 minutos a 4 °C e ressuspendidas em tampão hipotônico (10 mM HEPES pH 7,9, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1 mM DTT) acrescido de inibidores de proteases (2 µg/ml aprotinina, 2 µg/ml leupeptina, 2 µg/ml pepstatina, 1 mM PMSF) e fosfatases (1 mM NaF e 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ), sendo incubadas por 20 minutos. Em seguida, adicionou-se 17 µL de IGEPAL 10% e os tubos foram vortexados por 15 segundos para romper as membranas citoplasmáticas. As amostras foram centrifugadas a 800 x g por 5 minutos a 4 °C. Em seguida, coletou-se o sobrenadante (fração citoplasmática), armazenando-o a -20 °C para posterior uso. O *pellet* nuclear foi lavado três vezes com o mesmo tampão hipotônico supracitado (2 minutos a 600 x g 4°C). Por fim, o *pellet* foi ressuspendido em tampão hipertônico (20 mM HEPES pH 7,9, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT) acrescido de inibidores de proteases (2 µg/ml aprotinina, 2 µg/ml leupeptina, 2 µg/ml pepstatina, 1 mM PMSF) e fosfatases (1mM NaF e 1mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ), sendo incubado em gelo por 15 minutos com agitações

intermitentes em vortex a cada 2 minutos. As amostras foram, então, centrifugadas a 15.000 x g por 5 minutos a 4 °C e o sobrenadante obtido (fração nuclear) removido e armazenado a -20 °C (Boettler *et al.*, 2011). As proteínas de todos os lisados (totais e nucleares) foram quantificadas segundo método de Bradford, utilizando o reagente Protein Assay (Bio-Rad), conforme protocolo do fabricante. As proteínas lamina B1 e histona H1 foram utilizadas como controles das frações nucleares. As proteínas tubulina e vinculina foram usadas como controles das frações citoplasmáticas.

#### 4.4 CONSTRUÇÕES PLASMIDIAIS E ANTICORPOS

As construções plasmidiais codificando para as proteínas fusionadas GFP-Cdc42EP3, GFP-Sept2 e GFP-NCK2, foram gentilmente cedidas pelo Dr. Aaron Farrugia (*The Institute of Cancer Research*, Londres, Inglaterra) e pela Dra Louise Larose (McGill University, Montreal, Canadá), respectivamente (Apêndice 4, Figura 35). As construções GST, GST-Cdc42WT e GST-Cdc42G12V foram geradas anteriormente em nosso laboratório pelo mestre Renan Crocci Souza. Tais construções foram utilizadas para os ensaios de *pull down* de Cdc42. Os plasmídeos eram amplificados em bactérias *E. coli* DH5 $\alpha$ , selecionando-se as colônias formadas com os antibióticos canamicina (50  $\mu$ g/mL) ou ampicilina (100  $\mu$ g/mL), a depender do plasmídeo utilizado. Para extração e purificação do DNA plasmidial foram utilizados os kits comerciais para Miniprep ou Maxiprep (Promega), de acordo com os protocolos do fabricante. A transformação bacteriana seguiu o protocolo de choque térmico descrito no item 4.7. Para a expressão das proteínas recombinantes GST, GST-Cdc42WT e GST-Cdc42G12V foram utilizadas bactérias *E. coli* BL21.

Todos os anticorpos primários utilizados para os experimentos de validação, bem como suas respectivas diluições, estão especificados na tabela 1.

<b>Anticorpo</b>	<b>Animal</b>	<b>IF<sup>1</sup></b>	<b>WB<sup>2</sup></b>	<b>Marca</b>
Cdc42 P1	coelho	1:200	1:500	Santa Cruz
Cdc42 B8	camundongo	1:50	-	Cell Signaling
GFP	camundongo	1:250	1:1000	Santa Cruz
GFP	coelho	1:250	-	Santa Cruz
14-3-3 $\eta$	coelho	1:200	1:1000	Cell Signaling
PHB-2	coelho	1:250	1:1000	Cell Signaling
PAK-4	coelho	1:100	1:1000	Cell Signaling
PAK-4	camundongo	1:100	1:1000	Santa Cruz
NCK1/2	camundongo	1:100	1:500	Santa Cruz
pChk1	coelho	1:250	-	Cell Signaling
pATR	coelho	-	1:1000	Cell Signaling
ATR	coelho	-	1:1000	Santa Cruz
pH2AX	coelho	1:300	1:1000	Cell Signaling
H1	cabra	-	1:1000	Santa Cruz
Tubulina	camundongo	-	1:1000	Santa Cruz
Vinculina	camundongo	-	1:1000	Santa Cruz
Lamina B1	camundongo	-	1:1000	Santa Cruz

**Tabela 1 - Lista de anticorpos utilizados de acordo com cada experimento.**

1 – Imunofluorescência 2 - Western blotting

#### 4.5 TRANSFECCÃO

Para a expressão ectópica das construções plasmidiais, as células foram plaqueadas 24 h antes da transfecção com as construções GFP-Cdc42EP3, GFP-Sept2 e GFP-NCK2, apresentando uma confluência de 70%-80% no momento da transfecção. As células foram, então, transfectadas utilizando-se o reagente Lipofectamine<sup>TM</sup> 3000 (Thermo Fisher), de acordo com o protocolo do fabricante. Por fim, seguiu-se a incubação a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> em incubadora por 24-48 horas. A confirmação da expressão das proteínas foi realizada em microscópio

invertido (Olympus) com lâmpada de fluorescência e, alternativamente, por Western blotting, sondando-se com o anticorpo anti-GFP.

#### 4.6 ANÁLISE DE PROTEÍNAS

Todas as análises de expressão proteica foram realizadas através da separação prévia das proteínas de interesse por eletroforese em gel de poliacrilamida seguida de Western Blotting. Para a separação das proteínas por eletroforese, foram utilizados o gel de empilhamento de poliacrilamida (5% poliacrilamida, 0,125 M Tris pH 6,8, 1% SDS, 0,01% de persulfato de amônio, 0,001% TEMED) e o gel separador (6-13% poliacrilamida, 0,375 M Tris pH 8,8, 1% SDS, 0,01% persulfato de amônio, 0,001% TEMED) de espessuras de 1,5 mm e relação acrilamida:bis-acrilamida de 29:1. As corridas foram realizadas em voltagem constante de 100 V e amperagem variável, em tampão de corrida (192 mM Glicina, 0,1% SDS, 25 mM Tris) à temperatura ambiente. Os géis destinados à transferência das proteínas foram incubados com tampão de transferência (192 mM Glicina, 20% metanol, 25 mM de Tris pH 8,3) por 10 minutos e as proteínas transferidas para membrana de nitrocelulose-Millipore utilizando o sistema semi-seco ou úmido. As membranas foram bloqueadas com 5% de leite em pó em TBS-T (20 mmol/L Tris HCl pH 7,6, 137 mmol/L NaCl, 0,1% Tween 20) por 1 h sob agitação em temperatura ambiente. Em seguida, foram incubados com anticorpos primários específicos para as proteínas de interesse. Por fim, as membranas foram incubadas com os respectivos anticorpos secundários anti-IgG (Invitrogen) por 1 h à temperatura ambiente e reveladas no equipamento Odyssey Imager (LICOR) com o auxílio do software Odyssey V 3.0 (LICOR). As quantificações referentes aos dados de



expressão proteica por Western blotting foram feitas pelo software Image Lite Studio (LI-COR Biosciences).

#### 4.7 PRODUÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Para a obtenção das proteínas recombinantes GST, GST-Cdc42WT e GST-Cdc42G12V, bactérias competentes *E. coli* BL-21 foram utilizadas seguindo-se o protocolo de transformação bacteriana por choque térmico. Para isso, 0,25 µg de cada uma das respectivas construções plasmidiais foram incubados com 25 µL de bactérias competentes e os tubos deixados em repouso no gelo por 15 minutos. Após isso, as bactérias foram colocadas em banho seco a 42 °C por 1 minuto e 30 segundos. Em seguida, as amostras foram novamente colocadas em gelo por 15 segundos e, após atingirem temperatura ambiente, foram adicionados 200 µL de meio LB líquido (Tryptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH 7,5). Os tubos foram colocados sob agitação em *shaker* (modelo 311 DS, Labnet International®) a 250 rpm por 1 hora a 37 °C. Por fim, as suspensões de bactérias foram plaqueadas com o auxílio de uma alça de Drigalski em placas p60 contendo meio LB ágar (Tryptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 10 g/L, ágar 15 g/L; pH 7,5) e o antibiótico de seleção ampicilina (100 µg/mL). Incubou-se, então, as placas a 37 °C por 16 horas, aguardando-se a formação das colônias bacterianas.

A semeadura de uma colônia crescida foi feita em um pré-inóculo de 35 mL de meio LB líquido (Tryptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH 7,5), contendo o antibiótico de seleção ampicilina (100 µg/mL). Os falcons foram colocados sob agitação em *shaker* a 250 rpm a 37 °C por um período de, aproximadamente, 16 horas. No dia seguinte, esse pré-inóculo foi diluído em 450 mL

de meio LB líquido contendo a mesma concentração de antibiótico de seleção, esperando-se até que a densidade ótica de 0,6 fosse atingida. A absorbância dos inóculos foi medida em espectrofotômetro UV-VIS UV-1280 (Shimadzu<sup>®</sup>), utilizando-se como branco somente o meio LB líquido na ausência de bactérias. Depois de atingida a absorbância mencionada, adicionou-se o indutor de expressão IPTG (isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo, Sigma-Aldrich), mantendo os inóculos sob agitação de 250 rpm por 3 horas. Após a indução (Apêndice 1, Figura 31), os inóculos foram transferidos para tubos específicos a fim de serem centrifugados em centrífuga Sorvall a 8000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram descartados e os pellets bacterianos ressuspensos em 5,5 mL de tampão (50 mM Tris pH7,5, 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 5 mM de  $MgCl_2$ ) acrescido de inibidores de proteases (10  $\mu$ g/ml aprotinina, 10  $\mu$ g/ml leupeptina, 1 mM PMSF). Após isso, a suspensão foi transferida para tubos corex de vidro de 15 mL e estes colocados em gelo. Prosseguiu-se, então, com a lise bacteriana em ultrasonicador Vibra-Cell<sup>™</sup> VC 505 (SONICS<sup>®</sup>), utilizando-se 12 ciclos de 1 minuto, com intervalos de 1 minuto entre os ciclos (amplitude de 70%). Após a sonicação, o lisado foi centrifugado a 14.000 rpm por 30 minutos a 4 °C em centrífuga Sorvall. Coletou-se, em seguida, o sobrenadante (lisado bacteriano) contendo as proteínas de fusão para ser utilizado na etapa seguinte de purificação.

A quantificação das proteínas recombinantes foi realizada em gel de poliacrilamida, estabelecendo-se uma curva padrão de BSA (1  $\mu$ g, 2,5  $\mu$ g, 5  $\mu$ g, 7,5  $\mu$ g, 10  $\mu$ g e 20  $\mu$ g). O gel foi corado em solução de Coomassie blue (10% ácido acético, 30% MeOH em água) por 1 hora e descorado na mesma solução sem adição do Coomassie blue por 3 horas (Apêndice 1, Figura 32).

A purificação das proteínas recombinantes foi feita por cromatografia de afinidade, utilizando-se da resina Sepharose 4B (GE Healthcare). Para isso, 30 µg de cada uma das proteínas recombinantes foram incubadas com 20 µL de sepharose 4B (*slurry* a 50%) previamente lavada três vezes com PBS (80 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 100 mM NaCl, pH 7,2), intercalando-se centrifugações de 3.000 rpm por 3 minutos a 4 °C. Ajustou-se, então, o volume final de reação para cada isca e os lisados bacterianos foram deixados incubando sob rotação constante com a resina por 1 h e 30 minutos a 4 °C. Após esse tempo, as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 3 minutos a 4 °C e as iscas lavadas por cinco vezes com tampão (50 mM Tris pH 7,5, 0,5% Triton X-100, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) acrescido de inibidores de proteases (1 mM PMSF, 2 µg/mL leupeptina, 2 µg/mL aprotinina), com centrifugações intercaladas a 3.000 rpm por 3 minutos a 4 °C (Apêndice 1, Figura 33). Após a última centrifugação, os sobrenadantes foram removidos para as incubações com os lisados celulares.

## 4.8 *PULL DOWN* DE PROTEÍNAS

### 4.8.1 GST-Cdc42

A validação das proteínas por *pull down* foi realizada incubando-se os lisados com as iscas GST, GST-Cdc42WT e GST-Cdc42G12V. Os lisados tratados/não tratados foram obtidos de acordo com o item 4.3.1. Para o ensaio, ajustou-se previamente a concentração de proteínas dos lisados celulares para que essas não fossem diferentes entre cada uma das condições e cada reação foi diluída no mesmo tampão de lise sem NP-40, a fim de se obter uma concentração final de 0,5% de NP-40 na etapa de ligação (diluição 1:2). Em seguida, os lisados totais foram incubados com as iscas na proporção 20:1 (600 µg de proteína total:30 µg de

isca), sendo os tubos mantidos sob rotação constante a 4 °C por 1 hora. Após a etapa de ligação, as amostras foram centrifugadas a 600 x g por 3 minutos à temperatura de 4°C. As iscas foram, então, lavadas duas vezes com tampão Pierce modificado (25 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% NP-40) acrescido de inibidores de proteases (2 µg/mL leupeptina, 2 µg/mL aprotinina A, 2 µg/mL pepstatina A, 1 mM PMSF) e fosfatases (1 mM de ortovanadato de sódio e 1 mM de fluoreto de sódio) nas mesmas condições de centrifugação supracitadas. Por fim, os sobrenadantes foram completamente removidos e os complexos proteicos submetidos à desnaturação a 105 °C em tampão de Laemmli 5x para Western blotting (He, 2016), sendo as proteínas separadas de acordo com o item 3.6. Como controle da presença das proteínas nos lisados, separou-se uma parte do lisado total a ser utilizado nos experimentos como input para o Western blotting. Essa fração correspondia de 10%-20% da quantidade de proteína total utilizada em cada *pull down*. Como controle de eventuais interações inespecíficas das proteínas parceiras com a resina, esta foi incubada também apenas com os lisados celulares, ou seja, na ausência de qualquer proteína recombinante.

#### 4.8.2 PAK-PBD-GST

Para o *pull down* de atividade de Cdc42, a proteína recombinante PAK-PBD-GST foi produzida em bactérias *E. coli* (BL21) e quantificada de acordo com o descrito no item 4.7. Para o ensaio, os lisados celulares foram preparados a partir de placas p100 com 70% de confluência celular 24 h após o plaqueamento. Os lisados foram feitos em tampão RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7,2; 1% Triton X-100; 0,5% deoxicolato de sódio; 0,1% SDS; 500 mM NaCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>) acrescido de inibidores de proteases (2 µg/mL leupeptina, 2 µg/mL aprotinina A, 2 µg/mL

pepstatina A, 1 mM PMSF) e fosfatases (1 mM de ortovanadate de sódio e 1 mM de fluoreto de sódio). 30 µg de iscas PAK-PBD-GST foram incubadas com 500 µg de proteína total dos respectivos lisados e os tubos deixados sob rotação a 4 °C por 1h30min. Após esse tempo, as amostras foram centrifugadas a 2000 rpm por 3 minutos a 4 °C. Em seguida, foram realizadas três lavagens intercaladas com tampão B (Tris com 1% Triton X-100, 150mM NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1mM NaF, 10 mg/ml aprotinina e leupeptina, 1mM PMSF) nas mesmas condições de centrifugação supracitadas. Por fim, todo o sobrenadante foi removido e as iscas suspensas em tampão desnaturante (Laemmli 5x) para a corrida eletroforética (He, 2016). Como inputs foram utilizados 50 µg de proteína total de cada lisado.

#### 4.9 IMUNOFLUORESCÊNCIA E MICROSCOPIA CONFOCAL

Para a determinação da localização subcelular e colocalização das proteínas estudadas, foram utilizadas a microscopia confocal e de fluorescência widefield.

##### 4.9.1 Preparo de amostras

O preparo das amostras submetidas à imunofluorescência confocal foi feito plaqueando-se as células 24 horas antes sobre lamínulas (Knittel Glass<sup>®</sup>, Alemanha). As células foram, então, submetidas ao tratamento ou não e, após os tempos relativos a cada experimento, o meio foi removido, seguindo-se duas lavagens de 2 minutos cada com PBS (80 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.H<sub>2</sub>O, 100 mM NaCl, pH 7,2). Após as lavagens, as células foram fixadas com MeOH 100% a -20 °C e incubadas nessa mesma temperatura por 10 minutos. Após mais duas lavagens com PBS (2 minutos cada), as lamínulas foram bloqueadas com 3% BSA/PBS (acrescido de 10% de soro fetal bovino) por 30 minutos à temperatura

ambiente. Seguiram-se duas lavagens com PBS e incubação com os respectivos anticorpos primários em câmara úmida a temperatura ambiente por 3 horas. Após a incubação, as células foram lavadas novamente três vezes com PBS (5 minutos cada) e incubadas com os respectivos anticorpos secundários, sendo deixadas por mais 1 hora em câmara úmida a temperatura ambiente. Por fim, as lamínulas foram lavadas com PBS três vezes (5 minutos cada), montadas sobre lâminas de vidro (Knittel Glass<sup>®</sup>, Alemanha) contendo Vecta Shield<sup>®</sup> (Vector Laboratories, Burlingame, Califórnia) e armazenadas em geladeira a 4°C até o momento das análises.

#### 4.9.2 Aquisição de imagens

As imagens foram adquiridas em microscópio confocal LSM 780 (Zeiss), utilizando-se da objetiva de 63x, no INFAR-Escola Paulista de Medicina, sob supervisão da Profa. Dra. Helena Nader, e analisadas no programa Zen 2.3 (Blue edition).

#### 4.10 ENSAIO DE LIGAÇÃO DE PROXIMIDADE (PLA)

Para avaliar as interações proteína-proteína também foi utilizado o ensaio de ligação de proximidade (*Proximity Ligation Assay*; *PLA*). Tal ensaio baseia-se na utilização de anticorpos secundários conjugados a pequenos oligonucleotídeos, os quais quando a uma distância de no máximo 40 nm são capazes de sofrerem uma reação de hibridização. Essa reação é amplificada com o auxílio de uma DNA polimerase, mimetizando uma reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*, PCR). Em seguida, aos produtos amplificados são adicionados oligonucleotídeos conjugados a fluoróforos, os quais pareiam em várias regiões da

sequência amplificada, possibilitando a identificação da presença da interação proteína-proteína estudada (Weibrecht *et al.*, 2010).

Para o ensaio, as células foram plaqueadas, tratadas e fixadas conforme descrito no item 4.9.1. Após a fixação com metanol 100%, prosseguiu-se com o ensaio de acordo com o protocolo descrito pelo kit Duolink FlowPLA<sup>®</sup> (Sigma Aldrich). Foram utilizadas como controles do experimento as células incubadas somente com os anticorpos primários, e células incubadas exclusivamente com as sondas PLA. As imagens foram adquiridas em microscópio de fluorescência widefield DMI8 (Leica) e analisadas no software Las X.

#### 4.11 ENSAIOS CLONOGÊNICOS

As colônias isoladas foram obtidas a partir do plaqueamento em duplicata ou triplicata de células em baixa densidade, em placas de 35 mm de diâmetro (1500 células), 24h antes da exposição à radiação UVC. Após o estresse genotóxico, as células eram mantidas em incubadora a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por 10-12 dias, com trocas de meio a cada 48 horas. Em seguida, as colônias foram fixadas com formaldeído 10% por 10 minutos e coradas com solução de cristal violeta 0,5% (Franken *et al.*, 2006). Por fim, as colônias foram contadas manualmente e fotografadas. Com relação aos ensaios de colônia utilizando-se de transfecção transiente, as células eram plaqueadas previamente em placas p24 e transfectadas com as respectivas construções plasmidiais após 24 horas. Por fim, as células eram tripsinizadas após 24 horas de transfecção, contadas e replaqueadas em placas p35 (1500 células) para o ensaio clonogênico. Após 24 horas, as células eram submetidas às respectivas doses de UVC.

**PARTE I - VALIDAÇÃO DE PARCEIROS DE CDC42 EM CONDIÇÕES DE  
INSTABILIDADE GENÔMICA (14-3-3 $\eta$ , PAK-4 e PHB-2)**

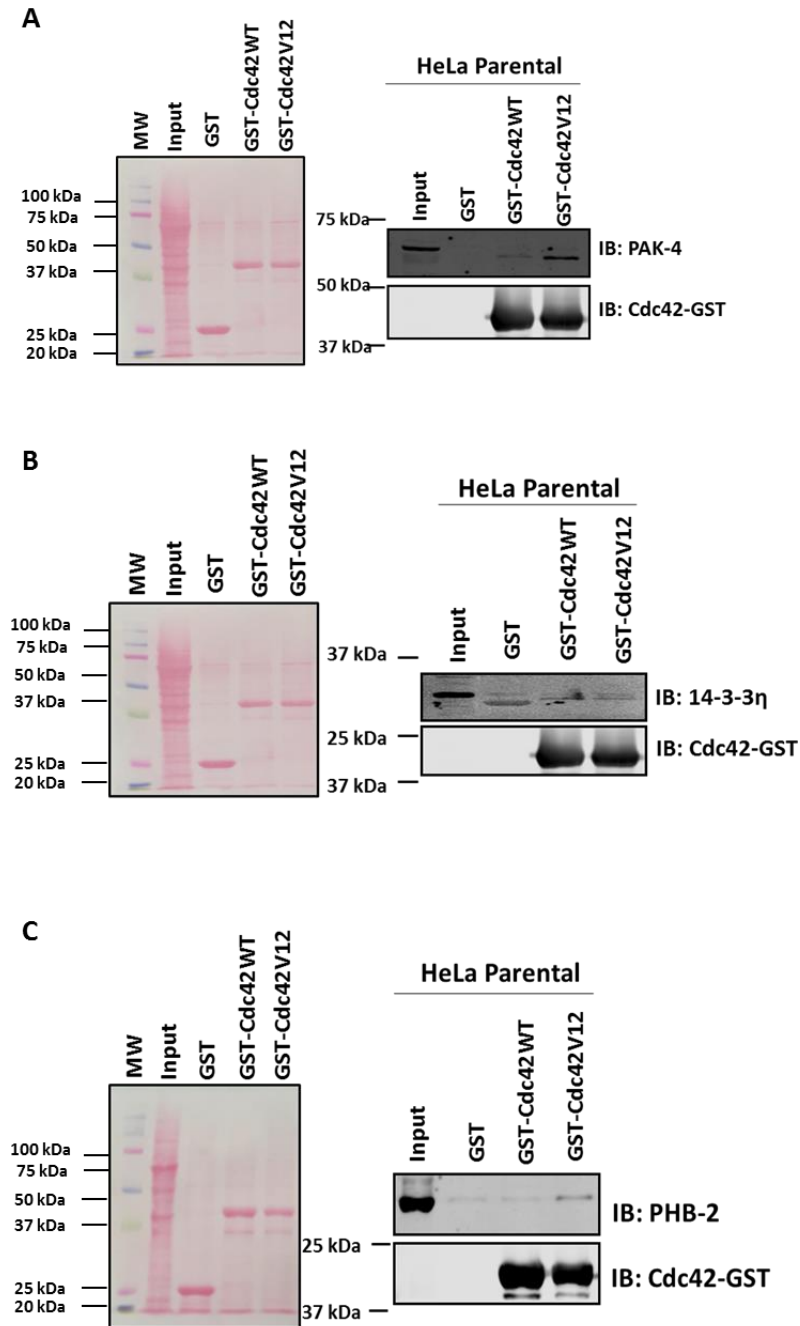


## 5 RESULTADOS

### 5.1 AVALIAÇÃO DE INTERAÇÕES FÍSICAS POR *PULL DOWN*

O ensaio de *pull down* seguido de imunoblotting permite validar as interações encontradas previamente pela técnica de purificação por afinidade (*pull down*) seguida de identificação por proteômica *shotgun* (Einarson, 2004; García-Mata *et al.*, 2006; Einarson, Pugacheva e Orlinick, 2007). Para isso, ajustou-se previamente a escala de iscas/proteína total a fim de que fosse possível reproduzir o experimento separando-se as proteínas em SDS-PAGE. Assim, após a purificação por afinidade utilizando as iscas GST-Cdc42WT e GST-Cdc42-G12V, além da isca controle GST, as proteínas-alvo foram sondadas com anticorpos específicos. Como controle interno dos experimentos de *pull down*, utilizou-se a proteína PAK-4, uma conhecida efetora de Cdc42. Tal proteína interage fisicamente com Cdc42 através do domínio CRIB (Cdc42/Rac1 *interactive binding motif*) e de sua porção N-terminal quando esta se encontra predominantemente no estado ativo. Os resultados obtidos para o *pull down* de PAK-4 corroboram a sua interação com a isca de Cdc42 constitutivamente ativa, comparando-se à isca selvagem (Cdc42WT), como demonstrado na figura 15A. Uma vez confirmada a capacidade estrutural de as iscas interagirem com parceiros tradicionais no estado ativo, prosseguiu-se com o *pull down* seguido de imunoblotting para a proteína parceira 14-3-3 $\eta$ . Os resultados obtidos demonstram que esta é capaz de interagir tanto com Cdc42 ativa (Cdc42-G12V) como com Cdc42 selvagem (Cdc42-G12V), inferindo-se que a interação não requer necessariamente que Cdc42 esteja no estado ativo (Figura 15B). Por outro lado, a validação entre a interação Cdc42 e PHB-2 mostra uma preferência desta

parceira pelo estado ativo de Cdc42 (isca Cdc42-G12V), como mostrado na figura 15C.



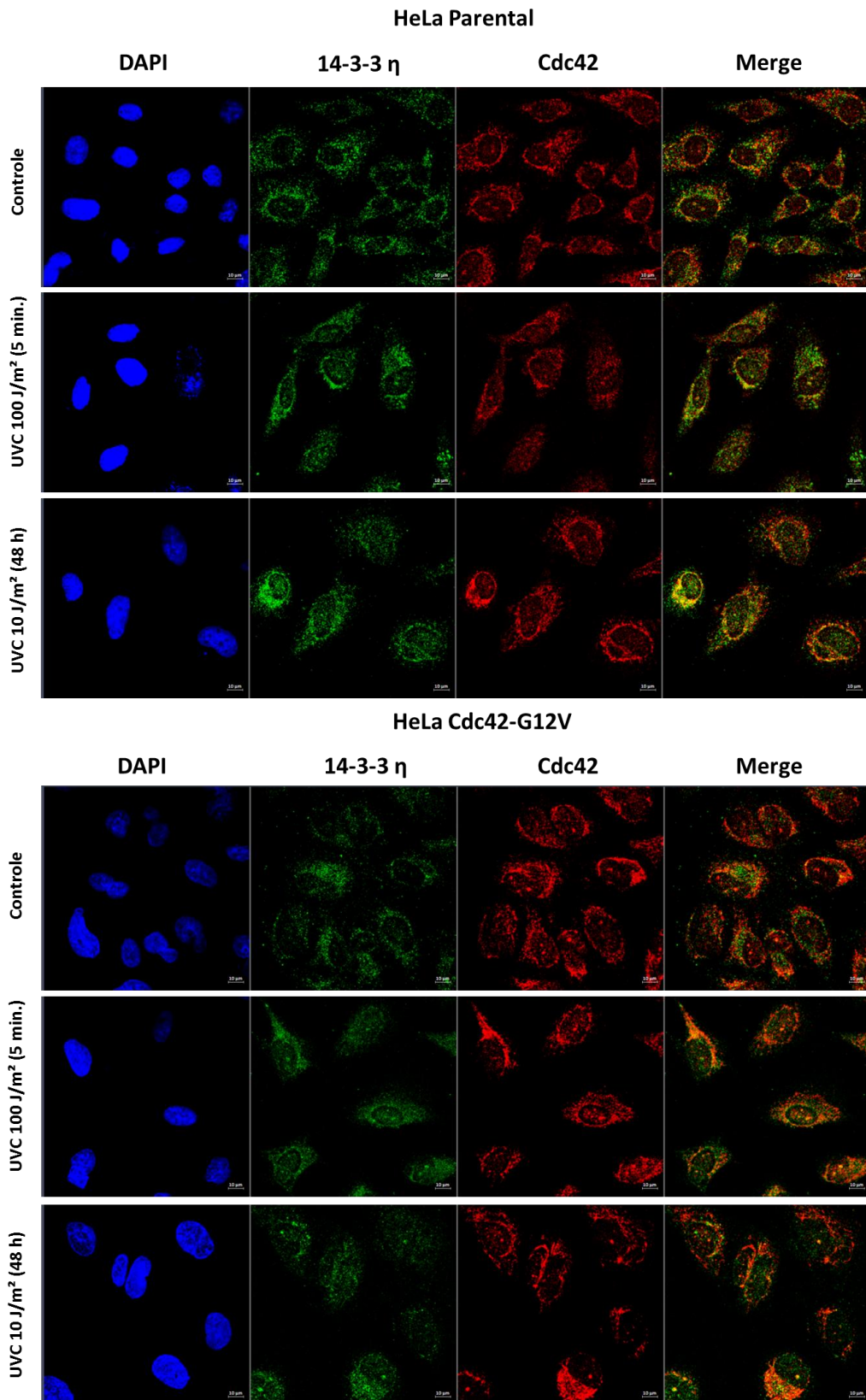
**Figura 13 - Validação da interação física entre Cdc42 e as proteínas parceiras PAK-4, 14-3-3 $\eta$  e PHB-2.** **A.** *Pull down* seguido de imunoblotting para a proteína parceira PAK-4. PAK-4 interage fortemente com a isca ativa de Cdc42 (Cdc42-G12V). **B.** *Pull down* seguido de imunoblotting para a proteína parceira 14-3-3 $\eta$ . A interação independe do estado do status de Cdc42 **C.** *Pull down* seguido de imunoblotting para a proteína parceira PHB-2. Cdc42 ativa interage mais intensamente com PHB-2. Os resultados são representativos de pelo menos dois experimentos independentes.

## 5.2 AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DAS INTERAÇÕES POR MICROSCOPIA CONFOCAL (COLOCALIZAÇÃO)

A imunofluorescência por microscopia confocal permite identificar a localização celular de Cdc42 e das proteínas alvo, as quais podem estar fisicamente bastante próximas entre si, sugerindo uma possível interação entre elas (Dunn, Kamocka e McDonald, 2011). Para isso, foram realizadas duplas marcações com anticorpos primários específicos e diferentes para Cdc42 e cada uma das proteínas estudadas. Tais marcações foram realizadas padronizando-se primeiramente o agente de fixação (metanol 100%, metanol:acetona 50:50 e paraformaldeído 4% em PBS) com o objetivo de identificar possíveis localizações artefatuais que ocasionalmente podem ocorrer neste tipo de ensaio. A fixação com metanol 100% foi então escolhida para prosseguir com as duplas marcações por se mostrar mais fidedigna na distribuição espacial de Cdc42 e de algumas proteínas parceiras, como 14-3-3 $\eta$ .

A análise por confocal para o experimento de dupla marcação para Cdc42/14-3-3 $\eta$  indicou a predominância de colocalização entre as duas proteínas na linhagem HeLa parental, tanto na condição de estresse moderado como forte (Figura 16). Por outro lado, a sublinhagem clonal não apresentou muitos pontos de colocalização, tanto na condição controle como nas condições tratadas.

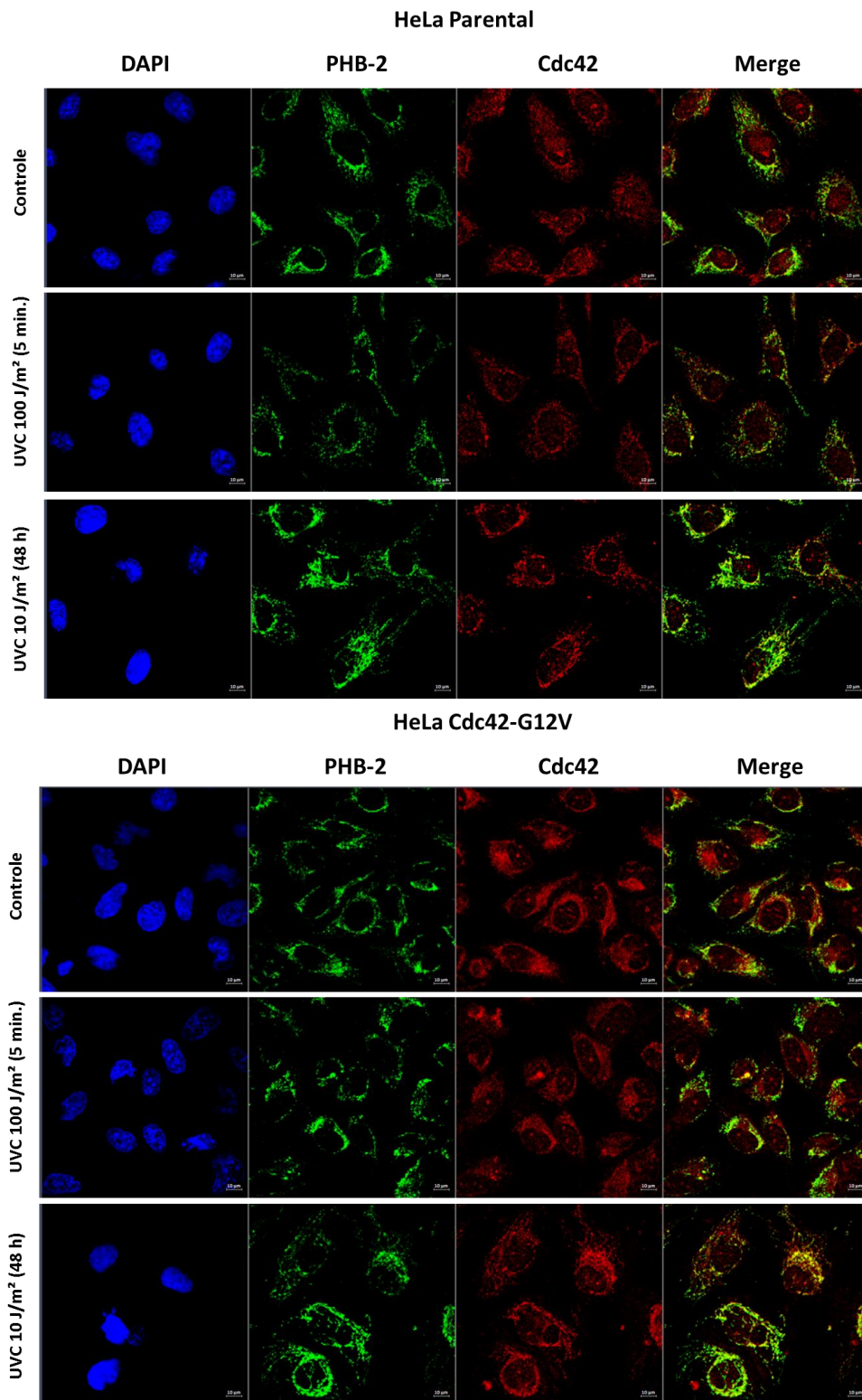
Já as análises de colocalização por microscopia confocal para a dupla marcação Cdc42/PHB-2 demonstram que essas proteínas encontram-se muito próximas após o tratamento na linhagem HeLa parental mas, principalmente, na sublinhagem HeLa Cdc42-G12V (Figura 17).



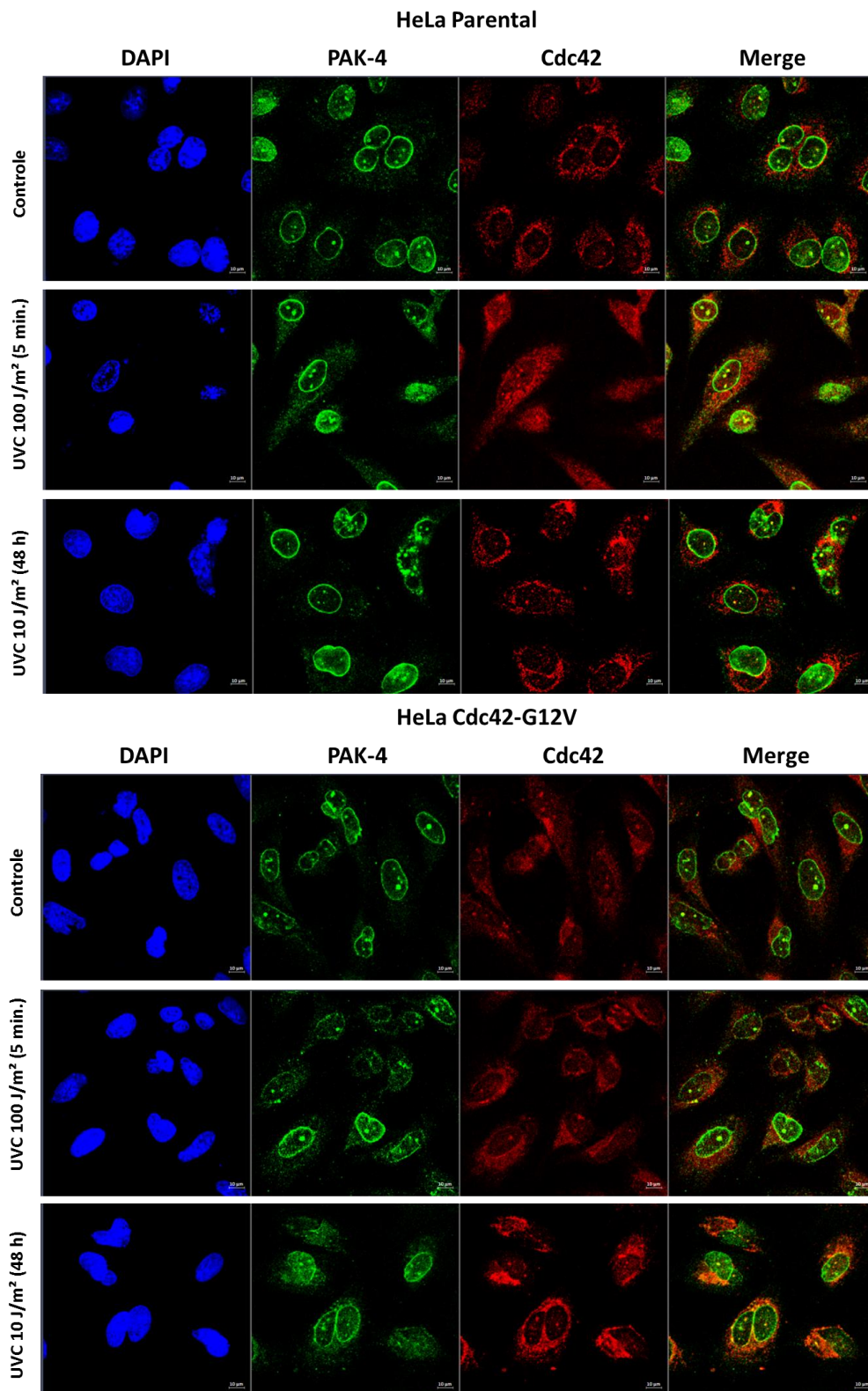
**Figura 14 - Colocalização por microscopia de fluorescência confocal para Cdc42/14-3-3 $\eta$  nas linhagens HeLa parental e HeLa Cdc42-G12V.** As células foram incubadas com os anticorpos primários monoclonais rabbit anti-14-3-3 $\eta$  (1:250, Cell Signaling) e mouse anti-Cdc42 (1:100, Santa Cruz). Na figura, observa-se um aumento de colocalização na linhagem HeLa Parental submetida à radiação UVC (10 J/m<sup>2</sup>, 48 h) comparada ao seu respectivo controle. Já a sublinhagem HeLa Cdc42-G12V não apresentou pontos de colocalização, com ou sem tratamento.  $\text{---}$  = 10  $\mu\text{m}$ .

Analisando-se o padrão de marcação de PHB-2, observa-se uma localização predominantemente citoplasmática e mais perinuclear, enquanto que Cdc42 apresenta-se difusa no citoplasma. Tal marcação reproduz a distribuição da expressão endógena dessas proteínas, à semelhança dos dados experimentais encontrados na literatura (Wei *et al.*, 2017). A partir destes experimentos, pontos de colocalização mais intensos após estresse moderado provocado por radiação ultravioleta do tipo C (10 J/m<sup>2</sup>; 24 horas) foram observados na sublinhagem clonal HeLa Cdc42-G12V. Assim, propõe-se que Cdc42 esteja bastante próxima a PHB-2 após estresse em estruturas como: mitocôndria, retículo endoplasmático e complexo de Golgi.

Por fim, com o intuito de investigar melhor as interações endógenas de Cdc42/PAK-4 pós-estresse com radiação UVC, realizou-se a dupla marcação para essas proteínas (Figura 18). Como existem poucos estudos demonstrando a distribuição endógena da proteína PAK-4 na ausência de estímulos (Siu *et al.*, 2010), o padrão de distribuição aqui mostrado corresponde a uma intensa localização circundando provavelmente o envelope nuclear, enquanto que a localização citoplasmática aparenta ser menos proeminente. Por outro lado, a localização nucleolar mostrou-se bastante intensa e coincidente com uma marcação nucleolar para Cdc42. Além disso, não foi possível observar pontos de colocalização citoplasmáticos, bem como próximos à membrana plasmática em ambas as linhagens celulares por microscopia confocal. No entanto, é possível observar uma colocalização mais intensa na região perinuclear em células da linhagem HeLa Cdc42-G12V após estresse moderado.



**Figura 15 - Colocalização por microscopia confocal de fluorescência para Cdc42/PHB-2 nas linhagens HeLa parental e HeLa Cdc42-G12V.** As células foram previamente plaqueadas sob lamínulas 24 horas antes de serem irradiadas, coletadas e fixadas em metanol 100%. As células foram incubadas com os anticorpos primários rabbit anti-PHB-2 (1:250, Cell Signaling) e mouse anti-Cdc42 (1:100, Santa Cruz). Na figura, observa-se um aumento de colocalização em ambas as linhagens submetidas a estresse moderado por radiação UVC (10 J/m<sup>2</sup>, 48 h) comparada aos seus respectivos controles. Esse aumento de colocalização é mais pronunciado na sublinhagem HeLa Cdc42-G12V. —= 10 µm.



**Figura 16 - Colocalização por microscopia confocal de fluorescência para Cdc42/PAK-4 nas linhagens HeLa parental e HeLa Cdc42-G12V.** As células foram previamente plaqueadas sob lamínulas 24 horas antes de serem irradiadas, coletadas e fixadas em metanol 100%. As células foram incubadas com os anticorpos primários rabbit anti-PAK-4 (1:200, Cell Signaling) e mouse anti-Cdc42 (1:100, Santa Cruz). Na figura, observa-se um aumento de colocalização na sublinhagem HeLa Cdc42-G12V submetida a estresse moderado por radiação UVC (10 J/m<sup>2</sup>, 48 h) comparada ao seu respectivo controle. ─ = 10 µm.

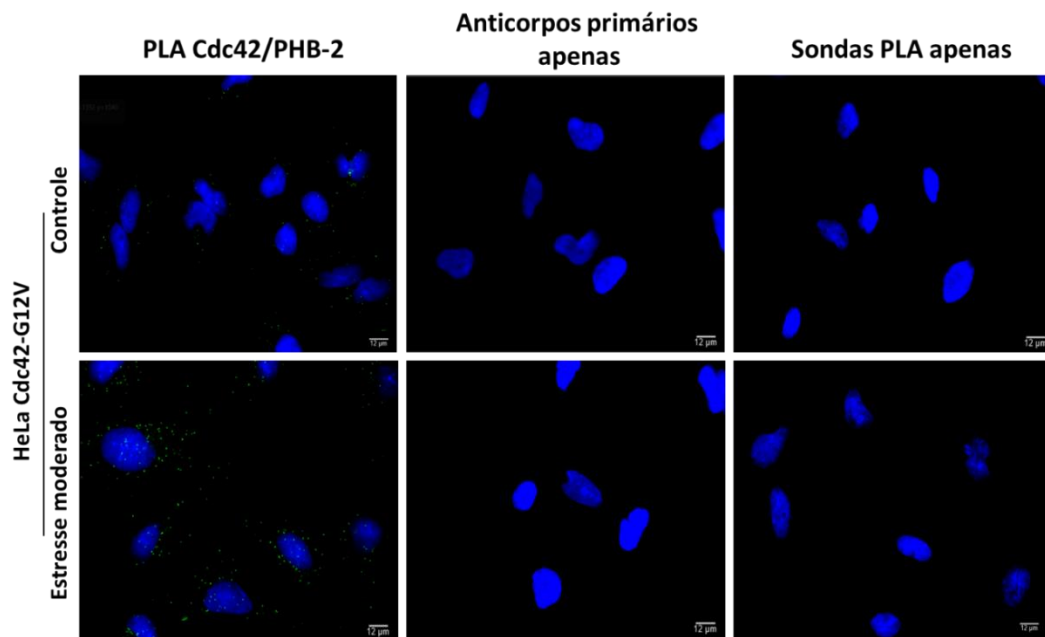
### 5.3 VALIDAÇÃO DAS INTERAÇÕES DESCRITAS POR COLOCALIZAÇÃO ATRAVÉS DE ENSAIO DE LIGAÇÃO DE PROXIMIDADE (PLA)

Com o intuito de validar os resultados de colocalização encontrados na sublinhagem HeLa Cdc42-G12V, prosseguimos com o ensaio de ligação de proximidade, o qual permite verificar com maior precisão interações bastante próximas (< 40 nm de distância) (Weibrecht *et al.*, 2010). Este corroborou a elevada probabilidade de que as proteínas parceiras estudadas estejam de fato interagindo nas condições de tratamento descritas, como já comprovado nas condições basais do item 5.1.

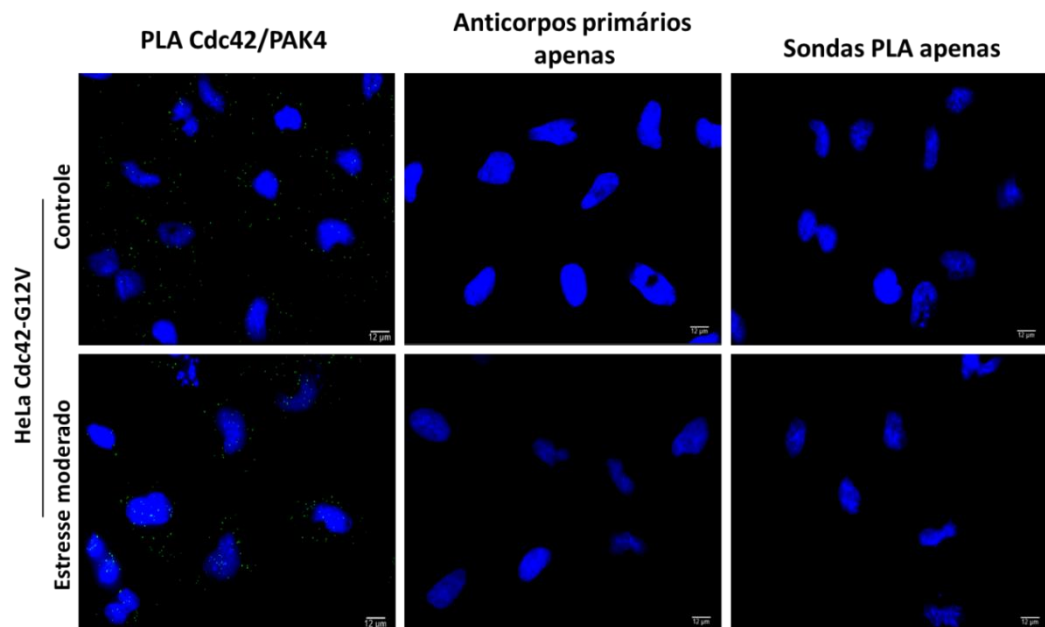
No caso da dupla marcação para Cdc42/PHB-2, foi possível observar um aumento do número de pontos por células após o tratamento com radiação UVC nas mesmas condições a que estas células foram submetidas anteriormente nas análises de colocalização (Figura 19). Além disso, um padrão de distribuição e de localização muito similar das interações foi encontrado, ou seja, estas ocorrem mais próximas à região perinuclear.

O ensaio de ligação de proximidade para Cdc42/PAK-4 mostrou que, após estresse moderado por radiação UVC, ocorre um discreto aumento de pontos por célula na sublinhagem HeLa Cdc42-G12V, denotando o aumento da interação entre as duas proteínas (Figura 20). Também é possível observar que, após o tratamento, há uma realocação da interação ao redor do núcleo, sugerindo um papel perinuclear à semelhança dos resultados encontrados na colocalização por microscopia confocal. De modo contrário, as células não submetidas ao tratamento apresentam uma distribuição difusa pelo citoplasma.





**Figura 17 - Ensaio de ligação de proximidade para as proteínas Cdc42 e PHB-2.** Interação entre Cdc42/PHB-2 na sublinhagem clonal HeLa-Cdc42-G12V sob condições de estresse moderado (10 J/m<sup>2</sup>, incubação por 24 h). As células foram previamente plaqueadas sob lamínulas 24 horas antes de serem irradiadas, coletadas e fixadas em metanol 100%. As células foram incubadas com os anticorpos primários rabbit anti-PHB-2 (1:250, Cell Signaling) e mouse anti-Cdc42 (1:100, Santa Cruz) por 3 horas em câmara úmida a temperatura ambiente. Para a interação Cdc42/PHB-2 observa-se um aumento de interação após tratamento com UVC (10 J/m<sup>2</sup>, 48 h) em relação ao controle. ┆ = 12 μm.



**Figura 18 - Ensaio de ligação de proximidade para as proteínas Cdc42 e PAK-4.** Interação entre Cdc42/PAK-4 na sublinhagem clonal HeLa-Cdc42-G12V sob condições de estresse moderado (10 J/m<sup>2</sup>, incubação por 24 h). As células foram previamente plaqueadas sob lamínulas 24 horas antes de serem irradiadas, coletadas e fixadas em metanol 100%. As células foram incubadas com os anticorpos primários rabbit anti-PAK-4 (1:250, Cell Signaling) e mouse anti-Cdc42 (1:100, Santa Cruz) por 3 horas em câmara úmida a temperatura ambiente. Para a interação Cdc42/PAK4 observa-se uma redistribuição da interação próxima ao núcleo após tratamento com UVC (10 J/m<sup>2</sup>, 48 h) em relação ao controle. ┆ = 12 μm.

## 6 DISCUSSÃO

A proteína Cdc42 tem sido descrita como um importante regulador de processos biológicos que podem envolver, direta ou indiretamente, instabilidade genômica. A fim de identificar e validar possíveis parceiros que desempenham algum papel neste contexto, ensaios de *pull down* com as iscas recombinantes de Cdc42 no estado selvagem e ativo foram realizados. Tais iscas permitiram uma varredura inicial em lisados celulares de adenocarcinoma cervical (HeLa) e fibroblastos humanos imortalizados (MRC5) tratados ou não com radiação ultravioleta do tipo C. A identificação de diversos parceiros de Cdc42 potencialmente envolvidos nessa resposta a estresse genotóxico por espectrometria de massas permitiu uma posterior seleção dos alvos, correlacionando-os com as suas funções biológicas envolvendo processos que regulam a estabilidade genômica celular (Silva *et al.*, 2019). Nesse sentido, os resultados de *pull down* seguido de imunoblotting para as três proteínas alvo corroboram os dados apontados na abordagem prévia (proteômica *shotgun*) (Figura 15). Demonstrou-se, por exemplo, que a proteína 14-3-3 $\eta$  é precipitada por Cdc42 nos ensaios, independente do estado de atividade da GTPase (Figura 15B). A interação física entre membros da família 14-3-3 e GTPases atípicas já foi descrita anteriormente, uma vez que 14-3-3 interage fisicamente com Rnd através de seu domínio C-terminal, acomodando a sua cauda lipídica e favorecendo o sequestro citosólico a fim de inativar essa GTPase, que encontra-se constitutivamente ligada à GTP (Riou *et al.*, 2013). Apesar disso, inexistem até o momento estudos demonstrando esta mesma correlação para GTPases típicas e centrais como Rac, Rho e Cdc42. Por outro lado, alguns estudos têm sugerido a presença de uma sequência consenso de reconhecimento para membros da família 14-3-3, a qual incluiria o resíduo de Serina 71 de Rac1 e Cdc42

(Brandwein e Wang, 2017). Essa sequência consenso é geralmente fosforilada por Akt em resposta a EGF, expondo o sítio para o possível reconhecimento de 14-3-3 (Schoentaube *et al.*, 2009; Schwarz *et al.*, 2012). Dessa forma, torna-se interessante propor que, em resposta a outros estímulos (como radiação UVC), Akt também seja capaz de fosforilar Cdc42 (Ser71) o que, por consequência, levaria a um reconhecimento de 14-3-3 a fim de que esta atue regulando a localização subcelular da GTPase após estresse genotóxico. Apesar de se constituir em uma proteína adaptadora, geralmente assistindo processos rápidos envolvendo interações múltiplas entre proteínas, os achados obtidos a partir dos ensaios de colocalização na linhagem HeLa parental (Figura 16) sugerem que 14-3-3 $\eta$  esteja atuando junto à Cdc42 por um tempo considerável após o dano, o que remete a um provável redirecionamento de Cdc42 citoplasmática para compartimentos subcelulares específicos após estresse genotóxico com um propósito de regulação e/ou adaptação celular em resposta ao dano. Por outro lado, a linhagem HeLa Cdc42-G12V não apresentou pontos de colocalização entre Cdc42 e 14-3-3 $\eta$ . Como os resultados de *pull down* demonstraram a independência da necessidade de ativação da GTPase para que a interação ocorra (Figura 15), torna-se interessante atribuir à colocalização citoplasmática observada na linhagem HeLa parental a uma interação endógena entre Cdc42 inativa e 14-3-3 $\eta$ , a qual parece ser mais preponderante em linhagens que possuam a expressão de níveis normais de Cdc42 ciclando regularmente entre os estados inativo e ativo. Embora a interação Cdc42/14-3-3 $\eta$  tenha sido identificada na proteômica, nos ensaios de *pull down* e colocalização, os ensaios de ligação de proximidade não foram capazes de detectá-la. Tal fato pode ser decorrente de aspectos relacionados ao anticorpo utilizado para 14-3-3 $\eta$ , ajustes no protocolo da técnica ou pela natureza/abundância da interação, uma vez que esta

foi fracamente precipitada em condições *in vitro* (*pull down*) e pouco abundante em condições *in vivo* (imunofluorescência confocal).

Em seguida, validou-se a interação entre Cdc42 e PHB-2 por *pull down* (Figura 15), colocalização (Figura 17) e PLA (Figura 19). Todos os ensaios corroboraram a interação descrita. No caso da interação física (*pull down*) (Figura 15C), é possível inferir uma maior interação com a GTPase no estado ativo, fato concomitantemente corroborado por um estudo descrevendo a interação entre ambas as proteínas por *pull down* de atividade (isca PAK-PBD-GST) e por co-precipitação (Ma *et al.*, 2017). No entanto, os resultados obtidos pelo mesmo grupo não fazem distinção se a proibitina precipitada foi PHB-1 ou PHB-2. Além disso, não foram descritas as regiões de Cdc42 requeridas para que a interação ocorra, abrindo espaço para estudos que objetivem caracterizar detalhadamente as regiões estruturais necessárias para tal interação.

Já com relação ao padrão de colocalização observado nos ensaios de imunofluorescência (Figura 17), foi possível visualizar que a interação parece ocorrer em níveis basais (sem dano), sendo intensificadas após o dano na sublinhagem clonal HeLa Cdc42-G12V. Além disso, o padrão de distribuição da interação também se mostrou interessante, pois regiões perinucleares parecem apresentar uma maior concentração dos focos observados, sugerindo a presença da interação em organelas como complexo de Golgi, mitocôndrias e retículo endoplasmático. Tais focos de interação foram também detectados no ensaio de ligação de proximidade (Figura 19).

Particularmente, a localização mitocondrial de Cdc42 tem sido reportada com pouca frequência (Kowluru, Chen e Tannous, 2003), ao passo que a sua presença no complexo de Golgi já foi descrita, regulando processos como o tráfego de

vesículas (transporte retrógrado/anteretrógrado de COP). Nesse sentido, foi demonstrado que a superexpressão de Cdc42 ativa (mutante F28L) é capaz de aumentar o tráfego entre o complexo de Golgi e retículo endoplasmático, levando a um fenótipo de transformação tumoral. Esse fenótipo é abolido quando se promovem mutações em resíduos essenciais de Cdc42-F28L para a interação física com  $\gamma$ -COP (Chen *et al.*, 2005).

Portanto, a probabilidade de uma interação relacionada ao complexo de Golgi/retículo endoplasmático parece mais factível com base nos dados obtidos e correlações com a literatura (Nalbant *et al.*, 2004). Além disso, os dados de proteômica para os lisados de HeLa mostram a presença do complexo de cotâmeros (linha 142, COPG1/2, Apêndice 2, Tabela 2) precipitados por Cdc42, sendo que a interação entre PHB-2 e COPG1 foi detectada em estudo de ampla escala no qual interações proteína-proteína foram identificadas por purificação de afinidade seguida de espectrometria de massas utilizando PHB-2 como isca (Ewing *et al.*, 2007). Portanto, embora não tenham sido utilizados marcadores específicos para essa organela celular, torna-se factível especular que a interação Cdc42/PHB-2 seja importante para o transporte vesicular no complexo de Golgi/retículo endoplasmático e que, esse papel deve estar associado de algum modo à resposta celular pós-estresse por radiação UV, ainda a ser esclarecido.

Nesse cenário, diversos estudos têm revelado, por exemplo, papéis anteriormente desconhecidos para a GTPase Cdc42 em diferentes estruturas subcelulares. No caso específico do complexo de Golgi, as funções propostas para a sua presença incluem até o momento: (1) a atuação como reservatório citoplasmático da proteína, a fim de “repor” a sua presença na membrana plasmática quando o recrutamento e ativação desta são necessários; (2) um papel

independente da atuação na membrana plasmática, ainda inexplorado; (3) a coordenação conjunta com a presença na membrana plasmática, com o intuito de regular a polaridade celular (Baschieri e Farhan, 2012). Esta última foi evidenciada pelo estudo mencionado anteriormente, o qual demonstrou que Cdc42 e PHB-2 são capazes de regular a direcionalidade da migração de células de câncer colorretal quando estas são estimuladas com o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Ma *et al.*, 2017).

Assim, os resultados obtidos utilizando-se de três técnicas diferentes e complementares confirmam a interação física entre Cdc42 e PHB-2, e a preferência pelo estado ativo da GTPase. Além disso, associam a localização de ambas em posições bastante específicas no citoplasma, remetendo-se a uma provável presença da interação no complexo de Golgi. Se esse for o caso, esta é mais uma evidência de que GTPases, em particular Cdc42, são passíveis de ativação fora da membrana plasmática, a exemplo da já sugerida ativação local de Cdc42 no complexo de Golgi (Baschieri e Farhan, 2012).

Por fim, a interação física com PAK-4 requer, além do domínio de interação clássico CRIB, a região N-terminal de PAK-4, como demonstrado por estudo recente descrevendo a estrutura cristalográfica do complexo Cdc42/PAK-4 (Ha e Boggon, 2018). Os resultados obtidos para o *pull down* revelam esta preferência pelo estado ativo (Figura 15A), porém também servem de controle positivo interno do próprio ensaio, denotando que as iscas recombinantes de Cdc42 geradas em bactérias são estruturalmente capazes de interagir com PAK-4. Classicamente, a interação Cdc42/PAK-4 foi inicialmente implicada na ativação de filopódios e na regulação da polaridade celular em junções célula-célula (Callow *et al.*, 2002; Qu *et al.*, 2002). Apesar disso, os resultados obtidos a partir das análises de colocalização (Figura

18) e do ensaio de ligação de proximidade (Figura 20) sugerem novamente um papel perinuclear para a interação entre as duas proteínas. A distribuição subcelular de PAK-4 na literatura mostra que esta proteína tem sido associada a processos envolvendo principalmente o citoesqueleto (formação de filopódios) em células endoteliais de aorta porcina (Abo, 1998) e fibroblastos (Callow, 2005). No entanto, estudos recentes têm demonstrado que PAK-4 desempenha papel essencial em estruturas como o nucléolo, regulando a proliferação, migração e invasão de células de câncer de ovário (Siu *et al.*, 2010). Nesse sentido, embora a presença de Cdc42 nuclear não tenha sido reportada, esta possui sequência de importação nuclear à semelhança de outras GTPases típicas já detectadas no núcleo. Além disso, a presença de KPNA2 nas análises de proteômica (linha 23, KPNA2, Apêndice 2, Tabela 2) pode indicar que, à semelhança de Rac1, Cdc42 também seja importada para o núcleo via KPNA2 (Sandrock *et al.*, 2010). Interessante notar, por exemplo, que as imunofluorescências para Cdc42 endógena mostram a sua possível presença no nucléolo, colocalizando com PAK-4. Portanto, uma maior exploração dessa interação nucleolar torna-se interessante.

Além disso, PAK-4 é responsável pelo transporte nucleocitoplasmático de  $\beta$ -catenina, regulando os níveis nucleares desta proteína, a qual está envolvida na transcrição de genes associados à via de sinalização de Wnt (Li *et al.*, 2012). No caso particular dos dados obtidos por microscopia confocal, foi possível identificar uma maior colocalização na sublinhagem clonal HeLa Cdc42-G12V novamente em regiões perinucleares (Figura 18). Tal padrão também foi notado nos ensaios de ligação de proximidade, sendo possível observar que a interação Cdc42/PAK-4 torna-se mais “organizada” ao redor do núcleo após o estresse por radiação UVC (Figura 20). Novamente, é possível sugerir que essa localização se dê em estruturas

como o complexo de Golgi, uma vez que esta proteína já foi observada nessa região em estudo anterior (Qu *et al.*, 2002). Especula-se, com base em dados obtidos para PAKs do grupo II, que a ativação promovida por Cdc42 não seja essencial para a atividade catalítica desta quinase sobre os seus substratos-alvo, mas sim que a sinalização ativa de Cdc42 possa desempenhar papel preponderante na realocização subcelular das PAKs do grupo II (Dart e Wells, 2013). Estudos utilizando sondas *in vivo* demonstraram que PAK-4 é ativada no complexo de Golgi, bem como Cdc42 também se encontra presente nessa organela (Baschieri e Farhan, 2012). Além disso, PAK-4 ativa é capaz de induzir a transformação de células normais de modo bastante semelhante à Cdc42 ativa (Abo, 1998). Embora a ativação local de PAK-4 por Cdc42 não tenha sido formalmente demonstrada, assim como a interação Cdc42/PHB-2 no complexo de Golgi, tais dados sugerem que tal fenômeno possa ocorrer, uma vez que uma GEF bastante específica de Cdc42 (Tuba) já foi descrita interagindo fisicamente com a proteína GM130 do complexo de Golgi em células HeLa (Kodani *et al.*, 2009).

Os resultados aqui mostrados, portanto, confirmam a interação preferencial de PAK-4 com a GTPase Cdc42 no estado ativo, além de indicarem uma localização de ambas as proteínas em regiões próximas ao envelope nuclear (complexo de Golgi). Tais dados apontam novamente para uma ativação de parceiros da GTPase em outras regiões que não a membrana plasmática, uma vez que as interações detectadas no ensaio de ligação de proximidade provavelmente se referem a GTPase no estado ativo.

Por fim, também é possível sugerir que os pontos observados estejam correlacionados às mitocôndrias, pois PAK-4 possui papel inibitório sobre a caspase-8 em resposta a estímulos apoptóticos provocados por radiação ultravioleta, TNF e



carenciamento de soro (Jaffer e Chernoff, 2002; Dart e Wells, 2013). Nesse cenário em particular, nenhuma correlação foi estabelecida ainda para a dependência desses processos mediados por PAK-4 em relação às GTPases.

**PARTE II – EXPLORAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE CDC42 E Cdc42EP3/Borg2  
E SUA INFLUÊNCIA PARA A RESPOSTA A ESTRESSE GENOTÓXICO**

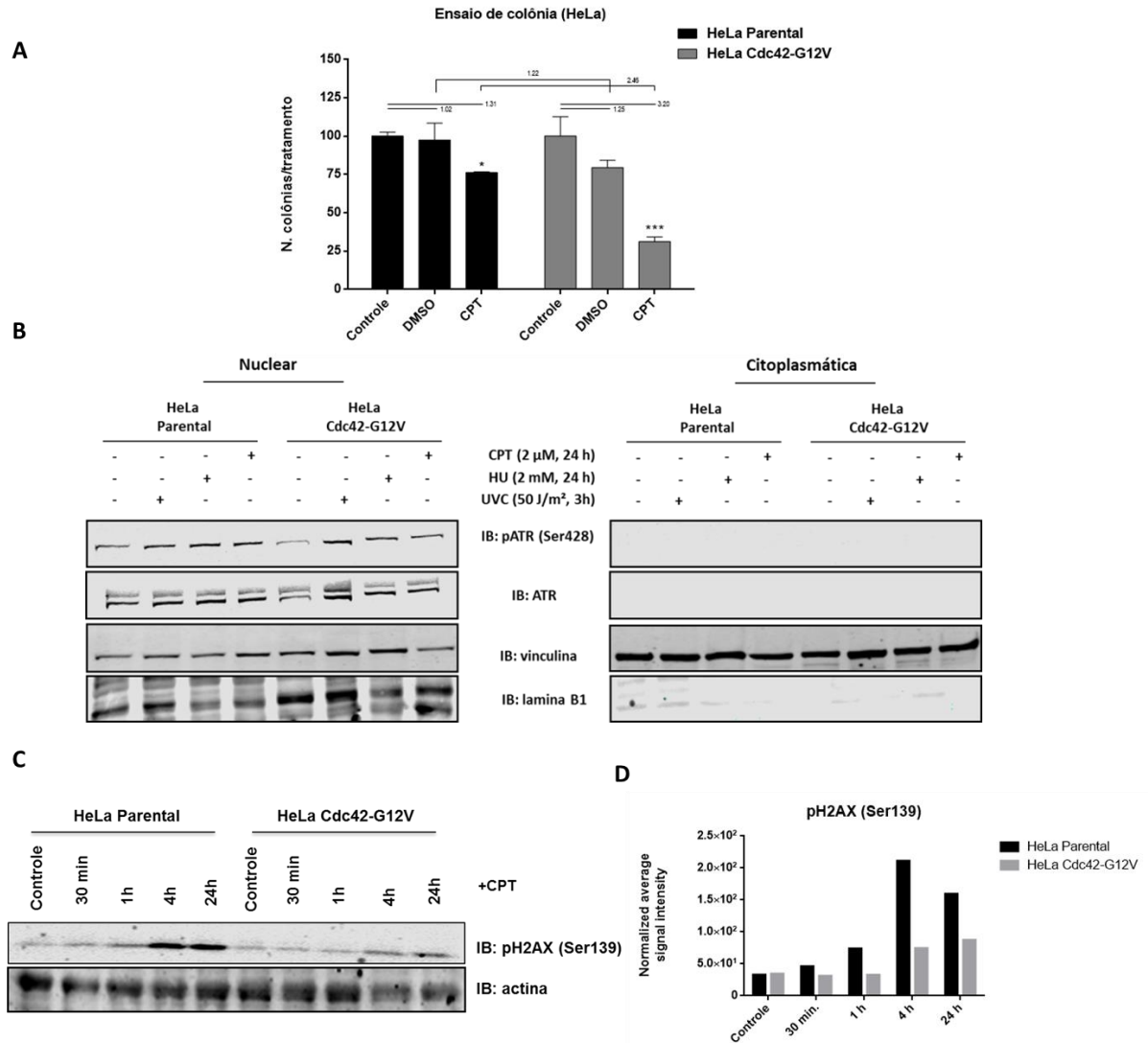
## 5 RESULTADOS

### 5.1 INFLUÊNCIA DA HIPERATIVAÇÃO DE CDC42 SOBRE A SOBREVIVÊNCIA CELULAR E FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS DE DDR APÓS ESTRESSE GENOTÓXICO

Um fenótipo interessante das sublinhagens clonais HeLa Cdc42-G12V é a sua reduzida sobrevivência celular e um atraso na fosforilação da proteína H2AX após exposição à radiação do tipo UVC, como demonstrado anteriormente por nosso grupo (Ascer *et al.*, 2015). Com o intuito de verificar se essa resposta biológica seria UVC-específica ou se outros agentes genotóxicos seriam capazes de também promover tais efeitos, foram conduzidos ensaios clonogênicos e avaliado o perfil de fosforilação da proteína H2AX após exposição ao indutor de estresse replicativo camptotecina. Como indicado na figura 21A, a ativação constitutiva de Cdc42 em linhagens HeLa tratadas com camptotecina leva a uma redução acentuada da sobrevivência celular se comparada à linhagem HeLa parental. Com relação ao padrão de fosforilação da proteína H2AX (Figura 21C e D), a linhagem parental apresentou uma maior ativação inicial (30 min-1h), a qual se manteve elevada a partir de 4 h (4-24 h). Por outro lado, os níveis de pH2AX são fracamente induzidos na sublinhagem clonal em tempos iniciais (30 min-1h), tornando-se elevados a partir de 4h e atingindo o seu pico em 24h. É interessante notar, portanto, que há uma atenuação da fosforilação após o dano em sublinhagens HeLa Cdc42-G12V, além do atraso na fosforilação/ativação ao longo das 24 h também para este agente genotóxico de diferente modo de ação.

A fosforilação de H2AX é um importante marcador para reconhecimento de danos ao DNA, principalmente daqueles provocados por quebras na dupla fita. Tal proteína é fosforilada por ATM/ATR no seu resíduo de serina 139. Portanto,

prosseguiu-se investigando o perfil de fosforilação de ATR em resposta à radiação do tipo UVC em ambas as linhagens.



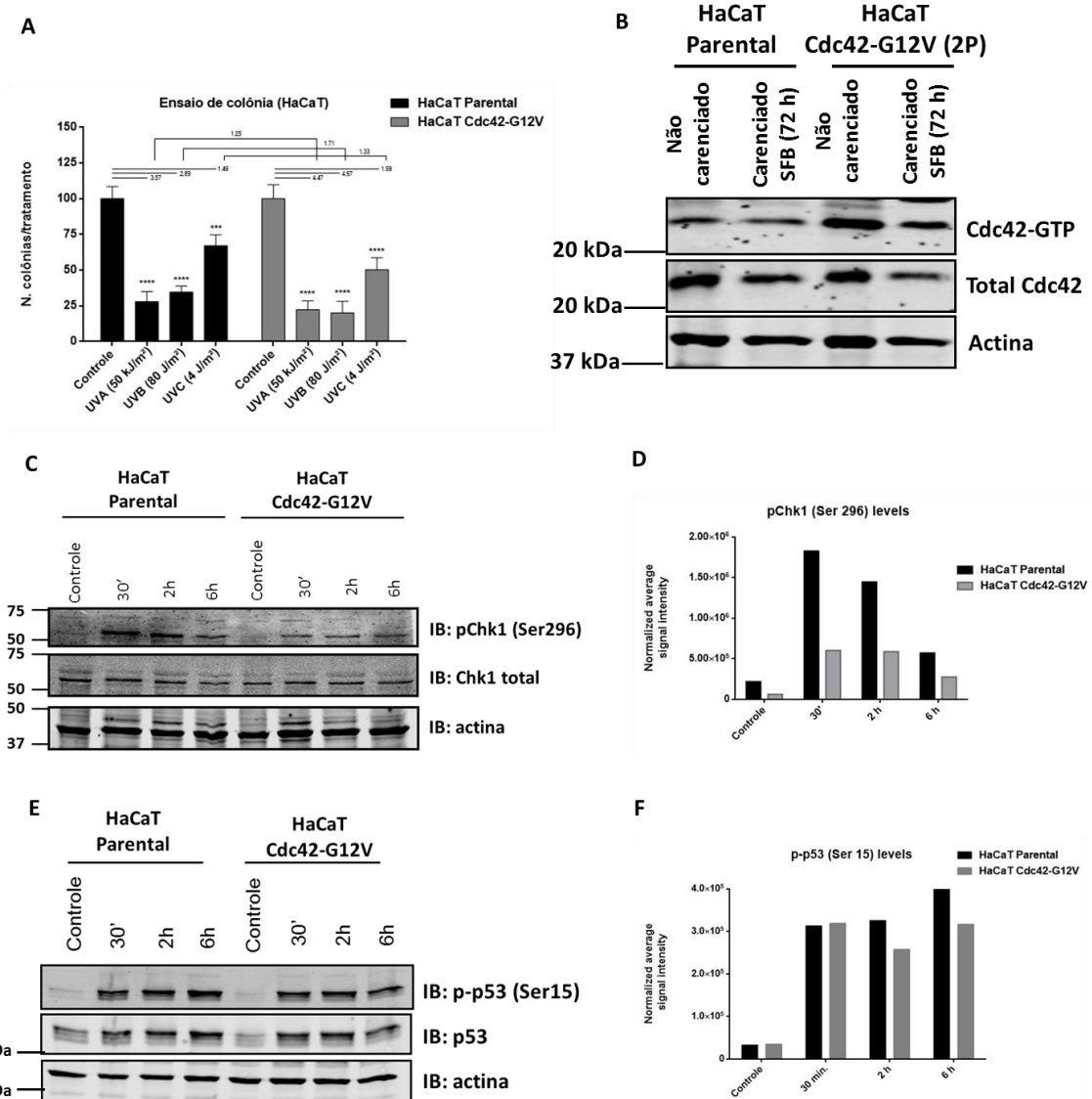
**Figura 19 - Ensaios realizados nas linhagens HeLa parental e HeLa Cdc42-G12V.** A. Ensaio clonogênico para HeLa parental e HeLa Cdc42-G12V.  $1,5 \times 10^3$  células foram plaqueadas em placas p35-well 24h previamente ao tratamento com  $0,1 \mu\text{M}$  de camptotecina (CPT) por 1 h. Após 10 dias, as colônias foram fixadas, coradas e contadas. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes realizados em triplicata para cada condição. Two-way ANOVA (\* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; Dunnett's comparison test) foi realizado para HeLa Cdc42-G12V versus HeLa Parental, pareado com base em cada condição controle. B. Perfil de fosforilação de ATR em células HeLa parental e HeLa Cdc42-G12V. As frações nucleares foram coletadas após indução do dano ao DNA com diversos agentes genotóxicos e Western blotting para pATR/ATR. Os resultados são representativos de pelo menos dois experimentos independentes. C. Perfil de fosforilação de H2AX em HeLa parental versus HeLa Cdc42-G12V. Ambas as linhagens celulares foram tratadas com CPT  $2 \mu\text{M}$  e coletadas nos tempos indicados para posterior análise por imunoblotting. D. Quantificação dos níveis de pH2AX. O resultado é representativo de pelo menos dois experimentos independentes.

Como mostrado na figura 21B, a ativação de ATR em resposta a UVC parece não apresentar diferenças significativas entre as linhagens estudadas, mesmo em presença de outros agentes genotóxicos, como camptotecina e hidroxiureia. Tais resultados demonstram que vias paralelas de sinalização podem estar contribuindo para as diferenças de fosforilação de H2AX observadas tanto em resposta à radiação UVC como à camptotecina.

Com o intuito de avaliar se as respostas de sobrevivência celular seriam também linhagem dependente, foram conduzidos ensaios clonogênicos em linhagens de queratinócitos humanos normais (HaCaT) expressando endogenamente Cdc42 selvagem (Cdc42-WT) e sublinhagens expressando exogenamente Cdc42 ativa (Cdc42G12V). O *pull down* de atividade para Cdc42, realizado para ambas as linhagens, corrobora que a sublinhagem clonal apresenta maiores níveis de Cdc42 ativa em condições basais quando comparada à linhagem parental (Figura 22B). Tais níveis mais elevados são mantidos mesmo após carenciamento de soro fetal bovino por longos períodos (72h), o que demonstra a ativação constitutiva de Cdc42 nessas linhagens na ausência de fatores de crescimento, os quais geralmente são responsáveis pela ativação desta GTPase.

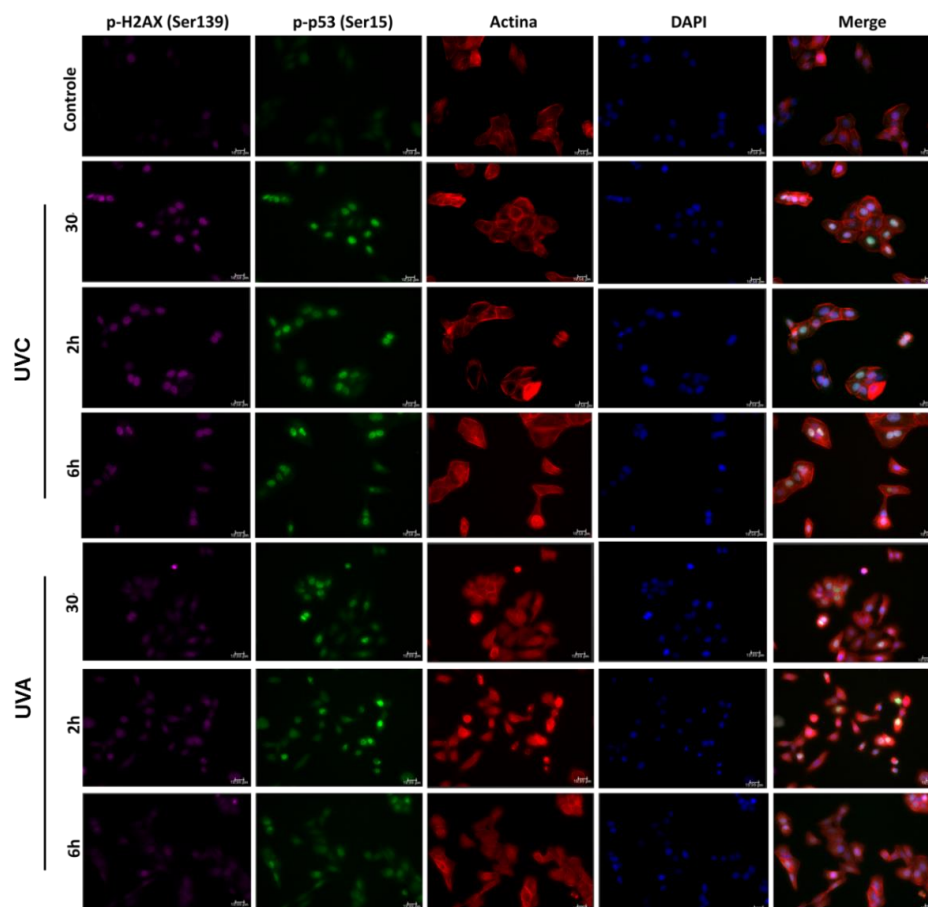
Uma vez caracterizadas quanto ao *status* de Cdc42, as células HaCaT foram expostas a diferentes tipos de radiação (UVA, UVB e UVC), sendo avaliada a sobrevivência celular através de ensaios clonogênicos. Como demonstrado na figura 22A, o clone HaCaT Cdc42-G12V apresenta uma menor sobrevivência frente à linhagem parental após ser submetido à radiação do tipo UVC. Tal redução também é possível observar frente às radiações UVA e UVB, embora não sejam observadas diferenças estatisticamente significantes quando comparadas à linhagem HaCaT parental. Além disso, a fosforilação da proteína Chk1, mediada principalmente por

ATR em resposta à radiação do tipo UVC, apresentou um aumento sustentado ao longo do tempo (30 min – 6h) na sublinhagem clonal (Figura 22C e D).

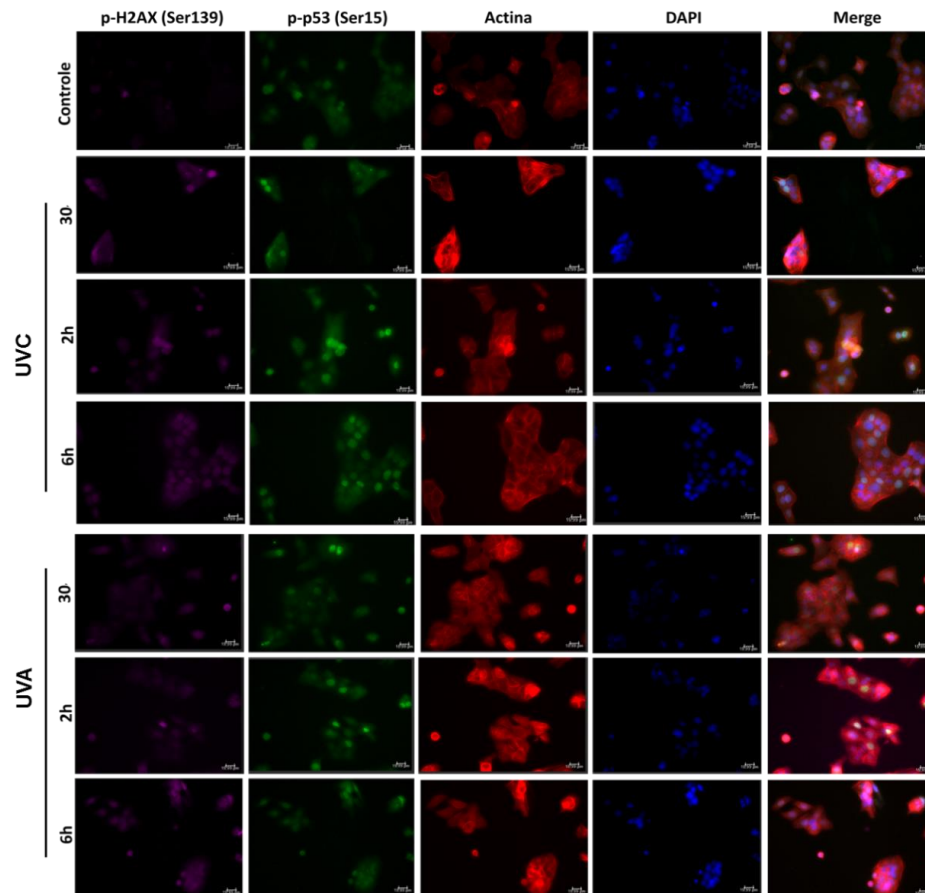


**Figura 20 - Ensaio realizado nas linhagens HaCaT parental e HaCaT Cdc42-G12V. A.** Ensaio clonogênico para HaCaT parental e HaCaT Cdc42-G12V.  $1,5 \times 10^3$  células foram plaqueadas em placas p35-well 24h previamente ao tratamento com radiações UVA (50 kJ/m<sup>2</sup>), UVB (80 J/m<sup>2</sup>) e UVC (4 J/m<sup>2</sup>). Após 10 dias, as colônias foram fixadas, coradas e contadas. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes realizados em triplicate para cada condição. Two-way ANOVA (\*\*p < 0.001; \*\*\*\*p < 0.0001; Dunnett's comparison test) foi realizado para HaCaT Cdc42-G12V versus HaCaT Parental, pareado com base em cada condição controle. **B.** Pull down de atividade para as células HaCaT parental e HaCaT Cdc42-G12V. As células foram submetidas ao carenciamento de soro e coletadas após 72 h de incubação com as iscas. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes. **C.** Perfil de fosforilação de Chk1 nas células HaCaT parental versus HaCaT Cdc42-G12V. Ambas as linhagens celulares foram tratadas com radiação UVC (10 J/m<sup>2</sup>) e coletadas para análise por imunoblotting. **D.** Quantificação dos níveis de pChk1. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes realizados em duplicata. **E.** Perfil de fosforilação de p53 nas células HaCaT parental versus HaCaT Cdc42-G12V. Ambas as linhagens celulares foram tratadas com radiação UVC (10 J/m<sup>2</sup>) e coletadas para análise por imunoblotting. **F.** Quantificação dos níveis de p-p53. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes realizados em duplicata.

Por fim, a fosforilação da proteína H2AX e p53 em ambas as linhagens foi analisada por imunofluorescência. As figuras 23 e 24 mostram que, à semelhança da sublinhagem HeLa Cdc42-G12V, o clone HaCaT Cdc42-G12V apresenta uma fosforilação atenuada de H2AX quando tratado com radiação UVC e, em menor extensão, à radiação UVA. Por outro lado, a fosforilação de p53 (Ser15), mostrada nas figuras 22E e F, aparenta sustentar níveis mais elevados na linhagem parental a partir de 2h após exposição à radiação UVC. Além disso, os resultados de imunofluorescência (Figuras 23 e 24) para p-p53 (Ser15) também sugerem que essa fosforilação seja mais intensa para a linhagem HaCaT parental em relação à linhagem clonal frente exposição às radiações UVA e UVC.



**Figura 21 - Imunofluorescência para as células HaCaT parental tratadas ou não com radiação UVC (6 J/m<sup>2</sup>) e radiação UVA (80 kJ/m<sup>2</sup>).** As células foram previamente plaqueadas em lamínulas 24h antes dos tratamentos, coletas e fixadas em PFA 4%/PBS nos tempos indicados. Na figura, observa-se uma maior fosforilação de H2AX e p53 para a linhagem HaCaT parental após os tratamentos com ambas as radiações. ─ = 10 μm.

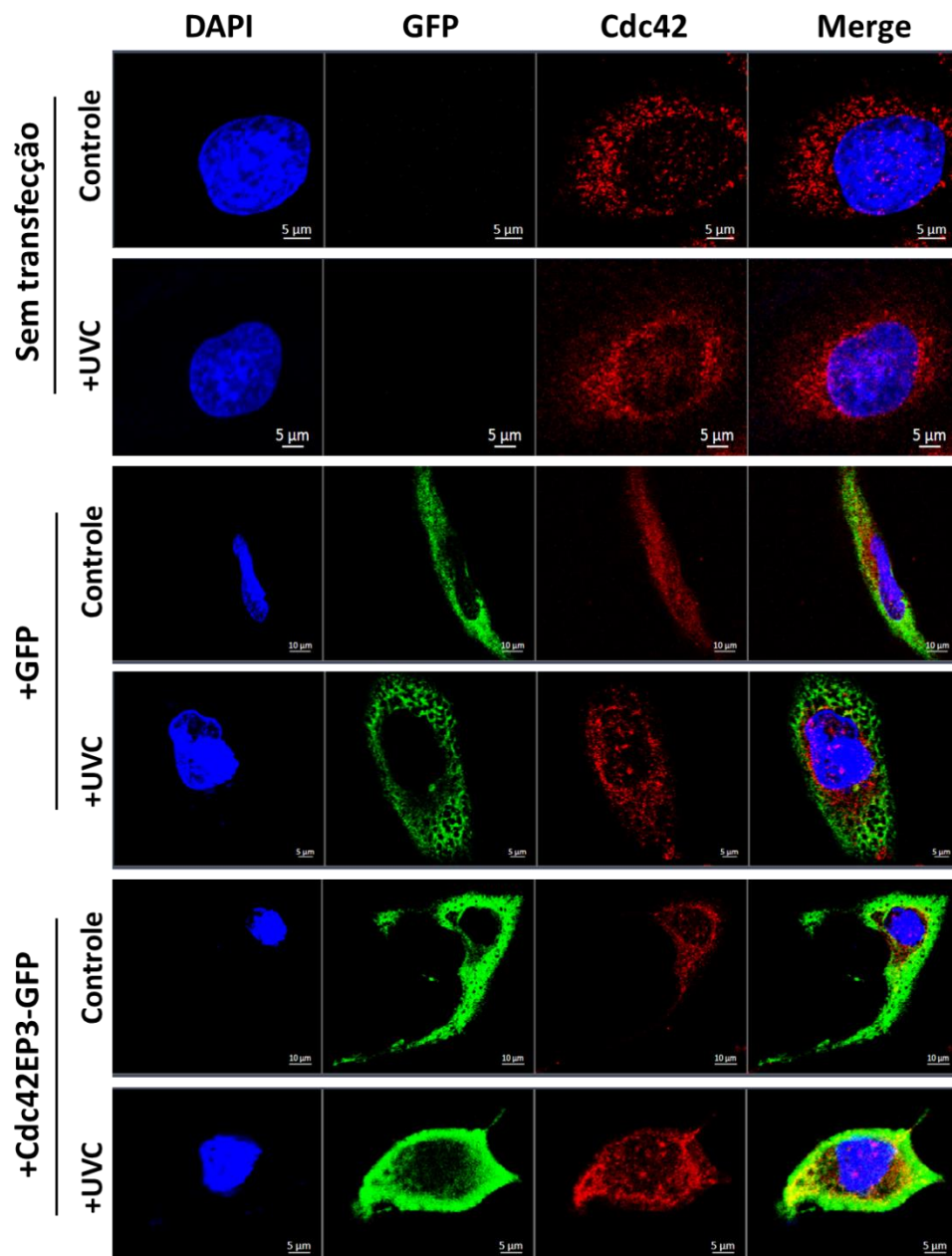


**Figura 22 -** Imunofluorescência para as células HaCaT Cdc42-G12V tratadas ou não com radiação UVC (6 J/m<sup>2</sup>) e radiação UVA (80 kJ/m<sup>2</sup>). As células foram previamente plaqueadas em lamínulas 24h antes dos tratamentos, coletas e fixadas em PFA 4%/PBS nos tempos indicados. Na figura, observa-se uma atenuação da fosforilação de H2AX e p53 para a sublinhagem HaCaT Cdc42-G12V após os tratamentos com ambas as radiações. ─ = 15 μm.



## 5.2 AVALIAÇÃO DA LOCALIZAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE CDC42 E CDC42EP3/BORG2 POR MICROSCOPIA CONFOCAL

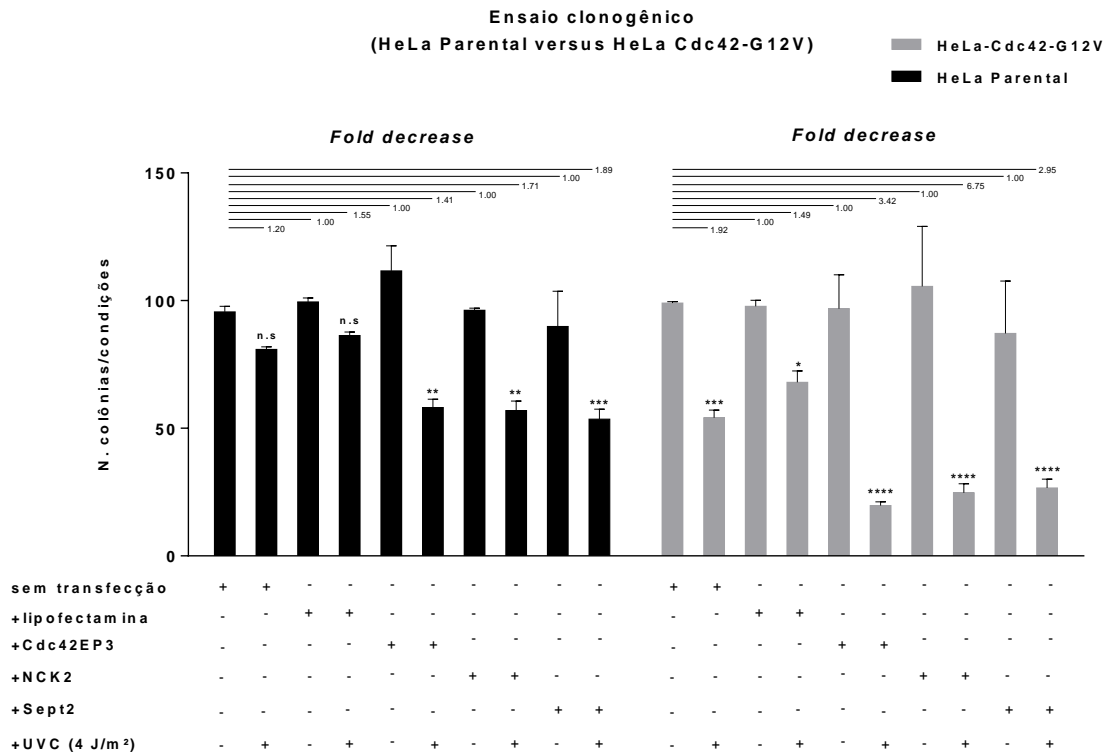
Como já mencionado anteriormente, a partir dos resultados da análise proteômica obtidos para a linhagem HeLa parental, identificou-se também, de forma sistemática, a proteína efetora de Cdc42, Cdc42EP3/Borg2, especificamente nas condições tratadas com UVC (Apêndice 3, Figura 34) (Silva *et al.*, 2019). Tal proteína é regulada negativamente por Cdc42 ativa (Cdc42-GTP) (Joberty *et al.*, 2001) e atua mediando diversas funções relacionadas ao remodelamento do citoesqueleto de septina e actina em fibroblastos associados ao câncer (CAFs) (Calvo *et al.*, 2015; Farrugia e Calvo, 2017) e células epiteliais de rim canino (MDCK) (Joberty *et al.*, 2001). Para validar a interação descrita pela literatura e identificada em nossos ensaios prévios, as células HeLa parentais foram transfectadas com uma construção Cdc42EP3-GFP, prosseguindo-se com a análise por microscopia confocal para verificar a colocalização com a Cdc42 endógena. A partir dos resultados mostrados na figura 25, é possível observar um aumento de pontos de colocalização próximos à membrana e em regiões perinucleares após tratamento com radiação UVC (estresse forte, resposta rápida). Por outro lado, nas células transfectadas apenas com GFP, este não colocaliza com Cdc42 endógena.



**Figura 23 - Análise de colocalização entre Cdc42 e Cdc42EP3 em células HeLa parentais expressando ectopicamente Cdc42EP3-GFP/Borg2.** As células foram transientemente transfectadas com Cdc42EP3-GFP 24h antes de serem submetidas à dose de radiação UVC (100 J/m<sup>2</sup>; 5 min.). Após o tratamento, as células foram marcadas para Cdc42 endógena e GFP. Os resultados são representativos de pelo menos dois experimentos independentes.

### 5.3 INFLUÊNCIA DA EXPRESSÃO ECTÓPICA DE CDC42EP3 E NCK2 SOBRE A SOBREVIVÊNCIA CELULAR EM LINHAGENS COM DIFERENTES BACKGROUNDS DE CDC42 ATIVA

A observação feita por nosso grupo de que sublinhagens clonais HeLa Cdc42-G12V e HaCaT Cdc42-G12V apresentam uma menor sobrevivência celular após exposição a agentes genotóxicos (como radiação UVC e camptotecina) em relação às respectivas linhagens parentais HeLa e HaCaT e, de que Cdc42EP3 poderia estar envolvida nessa resposta, levou-nos a avaliar a influência de Cdc42EP3 sobre a sobrevivência celular. Para isso, promoveu-se a expressão ectópica transiente de Cdc42EP3 nas linhagens HeLa parental e HeLa Cdc42-G12V. Como indicado na figura 26, a expressão ectópica de Cdc42EP3 contribui significativamente para uma redução da sobrevivência celular da linhagem HeLa parental. Essa redução se torna ainda mais significativa na sublinhagem HeLa Cdc42-G12V. Tais dados sugerem, portanto, que a expressão transiente de Cdc42EP3 é capaz de aumentar a sensibilidade celular à radiação UVC de maneira dependente de Cdc42 no estado ativo.



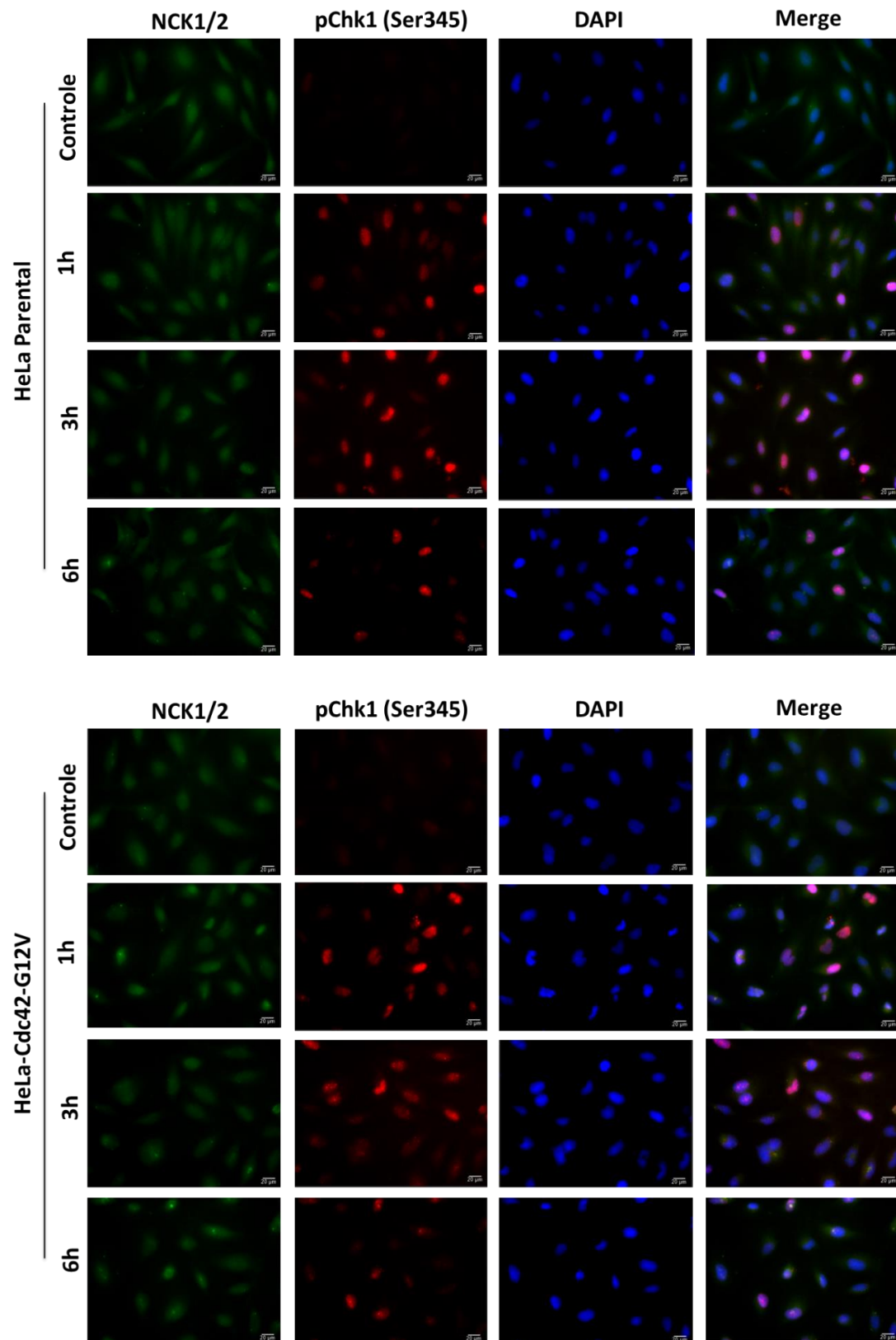
**Figura 24 - Ensaios clonogênicos para as linhagens HeLa parental e HeLa Cdc42-G12V.** As células foram transfectadas ou não com Cdc42EP3, NCK2 ou Sept2 24 h previamente ao tratamento com radiação UVC (4 J/m<sup>2</sup>). Após 10 dias, as colônias foram fixadas, marcadas e contadas manualmente. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes realizados em triplicate para cada condição. Two-way ANOVA (n.s.= não significativo; \*p < 0.05; \*\*\*p < 0.001; \*\*\*\*p < 0.0001; Dunnett's comparison test) foi realizado para as linhagens HeLa Cdc42-G12V versus HeLa parental, pareado com base em cada condição controle. O termo *fold decrease* refere-se à razão numérica entre a respectiva condição indicada e o controle (não tratado/não transfectado) para cada linhagem.

O citoesqueleto de septina e actina é profundamente afetado após estresse genotóxico por radiação UVA, hidroxureia e mitomicina C. Tal remodelamento provoca a translocação da proteína NCK para o núcleo através da associação dimérica com a proteína SOCS7, modulando vias de sinalização de DDR em células de adenocarcinoma cervical (HeLa) e fibroblastos embrionários de camundongos (MEFs) (Kremer, Adang e Macara, 2007). Por esta justificativa, verificou-se a influência da expressão ectópica de Sept2 e de NCK2 sobre a sobrevivência celular antes e após o dano por UVC na linhagem parental HeLa e clonal HeLa Cdc42-G12V. Os resultados obtidos para os ensaios clonogênicos com as construções Sept2 e NCK2 mostram que a expressão transiente de ambas as proteínas

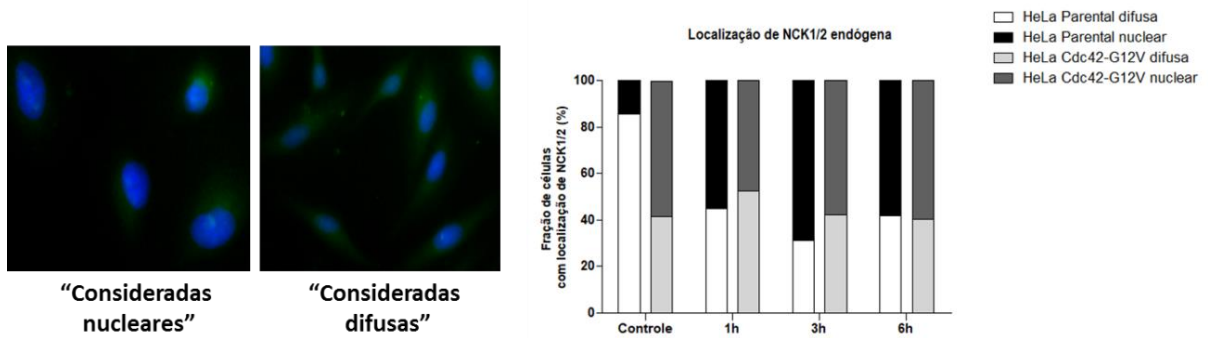
sensibilizam a linhagem HeLa parental. Essa redução na sobrevivência celular observada após o tratamento com radiação UVC ocorre em maior extensão na sublinhagem HeLa Cdc42-G12V, também sugerindo que essa redução seja dependente da ativação constitutiva de Cdc42, à semelhança do observado para os resultados da expressão transiente de Cdc42EP3.

#### 5.4 LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DE NCK1/2 APÓS ESTRESSE POR RADIAÇÃO UVC EM LINHAGENS COM DIFERENTES BACKGROUNDS DE CDC42 ATIVA

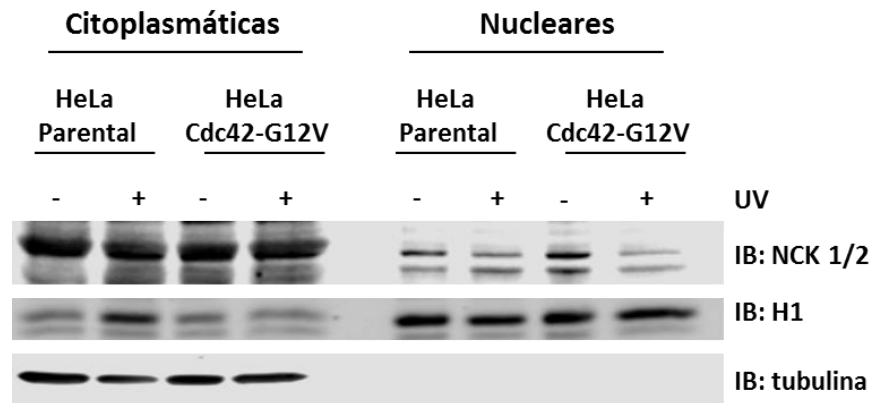
Como descrito anteriormente, a localização subcelular de NCK1/2 parece ser preponderante para a modulação de DDR observada frente a danos ao DNA (Kremer, Adang e Macara, 2007). Analisou-se, em seguida, a localização de NCK1/2 em ambas as linhagens com ou sem tratamento por UVC. Para esse propósito, foram realizadas imunofluorescências marcando-se NCK1/2 e pChk1 endógenas nas linhagens HeLa parental e HeLa Cdc42-G12V. Como esperado, a linhagem HeLa parental apresentou uma distribuição predominantemente citoplasmática de NCK1/2 (Figura 27), sendo que após o tratamento com UVC, ocorre a translocação gradual de NCK para o núcleo, atingindo um pico de acúmulo nuclear após 3 h do dano (Figura 28). Estes experimentos de imunofluorescência foram posteriormente submetidos a uma semi-quantificação dos resultados a fim de se ter mais segurança em sua interpretação molecular e biológica (Figura 28).



**Figura 25 - Relocalização subcelular de NCK1/2 pós-estresse com radiação UVC.** Células HeLa e HeLa-Cdc42-G12V foram submetidas a dose de 50 J/m<sup>2</sup> de UVC e fixadas nos tempos acima indicados. A localização nuclear foi estimada através da sobreposição com o marcador de DNA DAPI. Para a imunofluorescência, as células foram incubadas com os anticorpos anti-NCK1/2 (1:100, Santa Cruz) e anti-pChk1 (Ser345) (1:200, Cell Signaling) por 3 horas. ┆┆ = 20 μm.

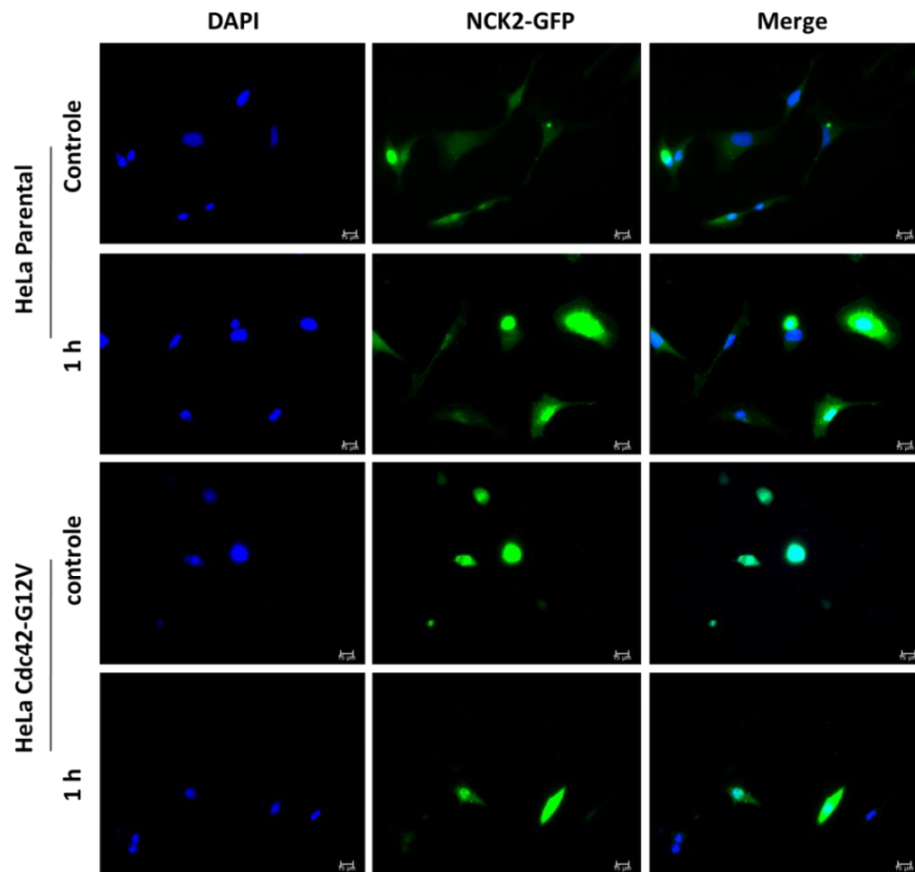


**Figura 26 - Estimativa da localização subcelular de NCK1/2 pós-irradiação UVC.** Ao menos 150 células por condição foram agrupadas como predominantemente difusas ou nucleares. O resultado é representativo de dois experimentos independentes.



**Figura 27 - Fracionamento celular de HeLa Parental e HeLa Cdc42-G12V.** As células foram tratadas com 10 J/m<sup>2</sup> de radiação UVC e os lisados obtidos após 3 horas de incubação. O resultado é representativo de dois experimentos independentes.

Por outro lado, a sublinhagem Cdc42-G12V apresenta uma maior localização nuclear de NCK1/2 mesmo na ausência de tratamento. Esse padrão específico também pode ser observado para as respectivas linhagens em imunofluorescências utilizando-se anticorpo anti-GFP, realizadas após expressão ectópica de NCK2 (Figura 30), e em ensaios de fracionamento celular (Figura 29), sugerindo que a expressão exógena de Cdc42 ativa é capaz de alterar a localização subcelular de NCK1/2 na ausência de tratamento por radiação UVC.



**Figura 28 - Expressão ectópica de NCK2 nas linhagens HeLa Parental e HeLa Cdc42-G12V.** As células foram transfectadas 24 horas antes de serem submetidas ao tratamento com radiação UVC (50 J/m<sup>2</sup>). Para a imunofluorescência, utilizou-se o anticorpo primário mouse anti-GFP (1:250; Santa Cruz) e secundário chicken anti-mouse Alexa Fluor 488 (1:500; Invitrogen).  $\text{---}$  = 15  $\mu\text{m}$ .



## 6 DISCUSSÃO

A pequena GTPase Cdc42 é uma proteína reguladora essencial para o remodelamento do citoesqueleto de actina e septina, controle do ciclo celular e tráfego vesicular (Cerione, 2004). Nosso grupo demonstrou anteriormente que a hiperativação de Cdc42 é capaz de interferir com a sobrevivência celular e modificar o status de fosforilação de proteínas de resposta a danos ao DNA (DDR) em linhagem de adenocarcinoma cervical (HeLa) (Ascer *et al.*, 2015). Na parte II desta dissertação, explorou-se inicialmente se essas respostas biológicas seriam reproduzíveis em outros modelos celulares e sob outros tipos de danos, pois o papel dual de Cdc42 (pro ou anti-oncogênico) parece ser dependente do contexto celular estudado (Stengel e Zheng, 2011).

Nesse sentido, nosso grupo demonstrou que a sublinhagem clonal HeLa Cdc42-G12V apresenta um atraso na fosforilação da proteína H2AX (Ser139) e uma atenuação na fosforilação da proteína Chk1 (Ser296) em resposta à radiação UVC. Os resultados para a fosforilação de H2AX (Ser139) na sublinhagem HeLa Cdc42-G12V tratada com camptotecina, um inibidor de topoisomerase I, corroboram àqueles obtidos para o tratamento com UVC; ou seja, a ativação constitutiva de Cdc42 é capaz de promover um atraso/atenuação na fosforilação desta proteína (Figura 21C e D). Tais dados sugerem, portanto, que este padrão ocorra em resposta a danos que causem tanto quebra de fita simples (UVC e camptotecina), como de dupla fita, uma vez que essas últimas podem ser induzidas por camptotecina através do colapso da forquilha de replicação quando esta encontra o complexo camptotecina-topoisomerase I, principalmente considerando o tempo de exposição prolongado (24h) à droga (Liu *et al.*, 2000). Essa atenuação também pode ser observada em resposta a UVA e UVC nas imunofluorescências para p-H2AX

(Ser139) em sublinhagem clonal HaCaT Cdc42-G12V quando comparadas à linhagem HaCaT Parental (Figuras 23 e 24).

A fosforilação de H2AX no resíduo de serina 139 é promovida principalmente pela ativação de ATM/ATR, mas também por quinases como JNK1. Foi demonstrado, por exemplo, que JNK1 é capaz de fosforilar H2AX (Ser 139) em resposta à radiação ultravioleta do tipo A em células Jurkat (Sluss e Davis, 2006). Como a ativação constitutiva de Cdc42 também é capaz de ativar a via de JNK em resposta à radiação ultravioleta, espera-se que ocorra a sua contribuição para o resultado final observado (Chuang *et al.*, 1997; Fritz e Henninger, 2015). No entanto, se a ativação constitutiva de Cdc42 contribui para a ativação de JNK1 e esta, por consequência, fosforila H2AX, esperava-se que a sublinhagem clonal apresentasse uma maior intensidade de pH2AX em resposta à radiação comparada à linhagem HeLa Parental. Os estudos da literatura envolvendo a ativação constitutiva de Cdc42 e sua relação com a fosforilação de JNK, porém, não exploram a cinética dessa ativação. Resultados preliminares obtidos (Apêndice 5, Figura 36) indicam, por exemplo, que o atraso na fosforilação de JNK na sublinhagem HeLa Cdc42-G12V é condizente com o atraso na fosforilação de H2AX, sugerindo que essa modulação possa de fato estar ocorrendo. Muito se tem proposto, também, que um adequado balanço na ciclagem da GTPase para sua interação apropriada com efetores *downstream* pode contribuir sobremaneira para as respostas finais observadas (Farrugia e Calvo, 2017). Portanto, o padrão de fosforilação final de H2AX observado na sublinhagem clonal HeLa Cdc42-G12V pode ser resultado da ativação de outras vias em consonância com a ativação promovida por ATM/ATR em resposta ao dano.

Por outro lado, no caso da proteína pChk1 (Ser296), esperava-se que a sublinhagem clonal HaCaT Cdc42-G12V apresentasse uma atenuação de sua fosforilação frente à radiação UVC, à semelhança da sublinhagem HeLa Cdc42-G12V, o que de fato ocorreu (Figuras 22C e D). A proteína Chk1 é fosforilada principalmente por ATR em seus resíduos de serina 317, 345 e 366 após radiação UV (Zhao e Piwnicka-Worms, 2002). Além disso, Chk1 sofre autofosforilação intra/intermolecular no resíduo de serina 296 em resposta à radiação UV. Sabe-se, porém, que a fosforilação deste resíduo (Ser296) em resposta à UV ocorre após as fosforilações nos resíduos 317 e 345 promovidos por ATR (Okita *et al.*, 2012). Tal padrão para pChk1 encontrado na sublinhagem HaCaT Cdc42-G12V pode conferir a essas células a capacidade de serem também mais afetadas pela radiação UVC em relação à linhagem HaCaT Parental, o que se traduz nos resultados clonogênicos para HaCaT parental versus HaCaT Cdc42-G12V (Figura 22A). Se o padrão de fosforilação de proteínas *upstream* a Chk1, como ATR, a qual promove importantes fosforilações em Chk1, já se encontram modificados nessas células permanece em aberto, o que também poderia justificar as diferenças de fosforilação observadas para pH2AX observada para a linhagem HeLa Cdc42-G12V. Dados preliminares para a ativação de ATR em resposta a camptotecina, hidroxiureia e radiação UVC sugerem que não há diferenças significativas de fosforilação para esta proteína comparando-se a linhagem HeLa parental à HeLa Cdc42-G12V (Figura 21B). Porém, são necessários mais experimentos para evidenciar a modulação diferencial de ATR sobre Chk1 e pH2AX para ambas as linhagens.

Alterações no padrão de fosforilação de proteínas de DDR, como Chk2, já foram reportados para efetores de Cdc42. Foi demonstrado, por exemplo, que ao ser silenciada, a proteína PAK5 é capaz de levar a uma redução na fosforilação de Chk2

em resposta à cisplatina. Esse estudo, porém, não estabelece nenhuma correlação com o *status* de Cdc42, e nem propõe se o fenômeno observado é dependente ou não de ATM/ATR (Zhang *et al.*, 2015). Essa efetora, porém, não foi encontrada nas condições tratadas por UVC em nossas análises prévias de proteômica e interactoma.

Com o intuito de procurar por possíveis alvos que fossem responsáveis por essa alteração de fosforilação de Chk1 observada em sublinhagens clonais HeLa Cdc42-G12V e HaCaT Cdc42-G12V, buscou-se nos resultados de proteômica prévios de nosso grupo, possíveis efetores de Cdc42 que tivessem alguma correlação indireta já estabelecida com estresse genotóxico (Silva *et al.*, 2019). Um dos principais parceiros encontrados nas amostras de HeLa tratadas com radiação UVC foi a proteína Cdc42EP3 (Apêndice 3, Figura 34), pertencente à família Borg, as quais são efetoras de Cdc42 (Farrugia e Calvo, 2017). De fato, os resultados de colocalização na linhagem HeLa parental expressando exogenamente Cdc42EP3 mostram uma grande proximidade entre esta proteína e Cdc42 após estresse forte por radiação UVC em regiões perinucleares, e também próximo à membrana plasmática (Figura 25), sugerindo uma modulação de Cdc42 sobre Cdc42EP3-Septinas após estresse por UVC. A família das Borgs é responsável por regular o citoesqueleto de septina e actina (Joberty *et al.*, 2001), além de interagir com MK5 e ERK3 para regular a morfologia de células dendríticas (Brand, F. *et al.*, 2012; Brand, Frank *et al.*, 2012).

As septinas são um grupo de proteínas ligadoras de GTP organizadas *in vivo* como complexos heterooligoméricos responsáveis pela citocinese, polaridade celular e como adaptadoras de proteínas de membrana e do citoesqueleto (Kinoshita, 2006; Bridges e Gladfelter, 2015; Spiliotis e Dolat, 2015). Surpreendentemente, foi

descoberto que as septinas são capazes de interferir com as vias de DDR. A depleção das septinas 2 e 7, por exemplo, afeta negativamente a fosforilação de p53 (Ser15) em resposta à radiação UV, enquanto que a depleção de NCK1/2 atenua a fosforilação de Chk2 (Thr68) e de p53 (Ser15) em resposta à radiação UV. Tais respostas são acopladas, ou seja, a depleção das septinas por silenciamento ou por estresse genotóxico (UV, hidroximetilureia, mitomicina) leva ao acúmulo nuclear de NCK1/2 e SOCS7, portanto favorecendo a modulação de proteínas de DDR (Chk2 e p53) por NCK1/2 através de mecanismos ainda incertos. De modo contrário, a presença das septinas 2 e 7 parece restringir NCK1/2 ao citoplasma (Kremer, Adang e Macara, 2007). Tais respostas sobre proteínas de DDR foram exploradas para as proteínas Chk2 e p53, mas não para pChk1 e pH2AX.

Neste contexto, como uma das principais reguladoras de septinas, investigou-se se a proteína Cdc42EP3 poderia servir de elo entre as respostas observadas para a ativação constitutiva de Cdc42 e as respostas observadas para a depleção das septinas por agentes genotóxicos ou silenciamento propostas pela literatura. Sabe-se, por exemplo, que o ganho de função para Cdc42 (Cdc42-G12V) é capaz de “desmontar” os filamentos de septina, convertendo-os em agregados dispersos pelo citoplasma. Além disso, já foi demonstrado que essa desagregação é decorrente da regulação negativa de Cdc42 ativa sobre membros da família Borg, como Borg3 (Cdc42EP5) (Joberty *et al.*, 2001). Portanto, torna-se factível especular que a hiperativação da GTPase deva promover uma modulação diferencial do citoesqueleto de septina e consequente alteração da regulação de NCK1/2 sobre as vias de DDR. Os resultados de imunofluorescência para a marcação endógena de NCK1/2 mostram a presença predominantemente citoplasmática desta proteína na linhagem HeLa parental, a qual se torna mais localizada no núcleo após estresse por

radiação UVC (Figuras 27 a 30). Esse comportamento corrobora os dados da literatura, os quais demonstram que NCK1/2 é encaminhada para o núcleo em células HeLa após estresse por radiação UVA, hidroximetilureia e mitomicina C (Kremer, Adang e Macara, 2007). Por outro lado, é interessante notar que esse padrão mais nuclear evidenciado na linhagem HeLa parental tratada é muito similar aos resultados obtidos para a localização de NCK1/2 na sublinhagem HeLa Cdc42-G12V na ausência de tratamentos (Figuras 27 e 28). Nesse sentido, é possível que a ativação constitutiva de Cdc42 possa promover a realocação de NCK1/2 para o núcleo em virtude da desestabilização dos filamentos de septina. Como evidenciado anteriormente por nosso grupo, a fosforilação de Chk1 mantém-se atenuada nessas células (Ascer *et al.*, 2015). Isto também pode ser evidenciado no ponto de 3h das imunofluorescências para NCK1/2 endógena e pChk1 (Ser345) na sublinhagem HeLa Cdc42-G12V comparada a uma ativação aparentemente mais intensa referente ao mesmo ponto de 3h para a linhagem HeLa parental (Figura 27). Portanto, é possível que NCK1/2 atue modulando os níveis de pChk1 como consequência da correta dinâmica da rede filamentosa de septina e sinalização mediada por SOCS7/NCK1/2 atuando sobre vias de DDR.

Por outro lado, a redução de sobrevivência celular após exposição à radiação UVC observada para a expressão transiente das proteínas Cdc42EP3, Sept2 e NCK2 nos ensaios clonogênicos sugere que tais proteínas possuam papéis relevantes na sensibilização de células HeLa ao dano por UVC, e que a presença de Cdc42 ativa reforça esta resposta (Figura 26). No caso da efetora Cdc42EP3, sabe-se que a sua expressão ectópica em fibroblastos associados ao câncer (CAFs), estavelmente expressando Cdc42EP3 e transientemente transfectados com Cdc42-G12V, provoca a desagregação do citoesqueleto de septina (Sept2) e a redução de

actina filamentosa perinuclear. Nessas células, a ativação constitutiva de Cdc42 promove a formação de vesículas enriquecidas de Cdc42 com Cdc42EP3. Por outro lado, a expressão exógena transiente de Cdc42 inativa (Cdc42-N17T) nessas mesmas células também leva à desestruturação dos filamentos de septina. Nesse caso, porém, não foi observado esse padrão vesicular (Farrugia e Calvo, 2017). Isto sugere que a GTPase precisa ciclar regularmente entre os estados ativo e inativo para a correta modulação do citoesqueleto de septina ou que parceiros proteicos desconhecidos atuem de forma complementar à regulação de Cdc42/Cdc42EP3 sobre as septinas.

Como a expressão ectópica de Cdc42EP3 em células HeLa favorece a formação dos filamentos de septina, esperava-se a não alteração ou um aumento da resistência à radiação UVC, enquanto que a expressão transiente de Cdc42EP3 na sublinhagem HeLa Cdc42-G12V não deveria reduzir ainda mais a sobrevivência celular após o dano. Isto porque a desestabilização da rede filamentosa de septinas leva ao acúmulo nuclear de NCK1/2 e, portanto, uma rede mais “estável”, favorecida pela expressão transiente de Cdc42EP3 na linhagem HeLa parental, deveria potencializar a sinalização e a atuação de NCK1/2 sobre as vias de DDR. Já para a sublinhagem HeLa Cdc42-G12V, a co-expressão de Cdc42EP3 com Cdc42 ativa deveria recuperar parcialmente os filamentos de septina, e portanto, favorecer a sinalização de NCK1/2 sobre vias de DDR.

Partindo desse mesmo pressuposto, era esperado que a expressão ectópica de Sept2 promovesse efeitos semelhantes aos propostos para Cdc42EP3, o que de fato acontece (Figura 26). Como demonstrado anteriormente, a expressão transiente de Sept2 em células HeLa favorece a formação filamentosa das septinas, possivelmente favorecendo a sinalização adequada de SOCS7/NCK1/2 para o

núcleo após o dano. Por outro lado, a expressão transiente de Sept2 na sublinhagem HeLa Cdc42-G12V deveria recuperar a rede filamentosa de septinas desestabilizada pela ativação constitutiva de Cdc42, recuperando o fenótipo responsivo dessas células à radiação UVC quanto à ativação eficiente das vias de DDR.

Por fim, a expressão ectópica de NCK2 também é capaz de sensibilizar ambas as linhagens e, em maior extensão, a sublinhagem HeLa Cdc42-G12V (Figura 26). Nesse sentido, a translocação de NCK1/2 para o núcleo requer a assistência de SOCS7. Como não se espera que os níveis de expressão de SOCS7 se alterem em ambas as linhagens, a introdução de NCK2 nesse cenário não deveria favorecer a redução de sobrevivência celular em ambas as linhagens. Como SOCS7 realiza o transporte nucleocitoplasmático de NCK1/2 e também interage com a septina 6 (Kremer, Adang e Macara, 2007), é possível especular que o balanço entre SOCS7 citoplasmática ligada à septina 6 ou livre seja essencial para a resposta final observada.

Tais dados, tomados em conjunto, sugerem que o eixo Cdc42-Cdc42EP3-Sept2-NCK2 é capaz de interferir com a sobrevivência celular, sendo necessários mais estudos os quais demonstrem a influência da modulação destas proteínas no contexto de ativação das vias de DDR, assim como o papel de Cdc42 ativa sobre este eixo de proteínas, as quais parecem ser importantes para a regulação da estabilidade genômica.



## 7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados descritos neste trabalho, pode-se concluir que:

### Parte I:

- Cdc42 é capaz de interagir com PAK-4, PHB-2 e 14-3-3 $\eta$ ;
- A interação de Cdc42 com PAK-4 e PHB-2 potencialmente está associada ao Complexo Golgi;
- Caso comprovada, a interação de Cdc42 com PAK-4 e PHB-2 no Golgi parece ter um papel ainda a ser esclarecido no contexto de estresse genotóxico provocado por radiação UVC;
- A interação entre Cdc42 e 14-3-3 $\eta$  parece estar associada à localização subcelular de Cdc42 após o dano, reforçando a evidência de que Rho GTPases centrais (Rho, Rac, Cdc42) interagem fisicamente com a família 14-3-3;

### Parte II:

- A hiperativação de Cdc42 leva à atenuação da fosforilação das proteínas Chk1 e H2AX e redução da sobrevivência celular pós-danos ao DNA;
- O fenótipo observado para a hiperativação de Cdc42 parece não ser linhagem dependente/dano-específico;
- Cdc42 e Cdc42EP3/Borg2 colocalizam após exposição das células à radiação do tipo UVC;
- O eixo de proteínas composto por Cdc42EP3/Borg2-Sept2 e NCK1/2 afeta negativamente a sobrevivência celular após o tratamento das células com radiação do tipo UVC de modo dependente de Cdc42 ativa;
- A hiperativação de Cdc42 é capaz de relocalizar NCK1/2 para o núcleo.

## REFERÊNCIAS

ABO, A. PAK4, a novel effector for Cdc42Hs, is implicated in the reorganization of the actin cytoskeleton and in the formation of filopodia. **The EMBO Journal**, v. 17, n. 22, p. 6527-40, 1998.

ADAMS, A. E. M.; JOHNSON, D. I.; LONGNECKER, R. M.; SLOAT, B. F.; PRINGLE, J. R. CDC42 and CDC43, two additional genes involved in budding and the establishment of cell polarity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Cell Biology**, v. 111, n. 1, p.131-42, 1990.

AGUILERA, A.; GARCÍA-MUSE, T. Causes of Genome Instability. **Annual Review of Genetics**, v. 47, p. 1-32, 2013.

AGUILERA, A.; GÓMEZ-GONZÁLEZ, B. Genome instability: A mechanistic view of its causes and consequences. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, n. 3, p. 204-17, 2008.

AITKEN, A. 14-3-3 proteins: A historic overview. **Seminars in Cancer Biology**, v. 16, n. 3, p.162-72, 2006.

ANDE, S. R.; XU, Z.; GU, Y.; MISHRA, S. Prohibitin has an important role in adipocyte differentiation. **International Journal of Obesity**, v. 36, n. 9, p.1236-44, 2012.

ASCER, L. G.; MAGALHAES, Y. T.; ESPINHA, G.; OSAKI, J. H.; SOUZA, R. C.; FORTI, F. L. CDC42 Gtpase Activation Affects Hela Cell DNA Repair and Proliferation Following UV Radiation-Induced Genotoxic Stress. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 116, n. 9, p. 2086-97, 2015.

ASPENSTRÖM, P.; RUUSALA, A.; PACHOLSKY, D. Taking Rho GTPases to the next level: The cellular functions of atypical Rho GTPases. **Experimental Cell Research**, v. 313, n. 17, p.3673-9, 2007.

AWASTHI, P.; FOIANI, M.; KUMAR, A. ATM and ATR signaling at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 128, n. 23, p. 4255-62, 2016.

BAHOUE, W. F.; CAMPBELL, A. D.; WICHA, M. S. cDNA cloning and molecular characterization of MSE55, a novel human serum constituent protein that displays bone marrow stromal/endothelial cell-specific expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 20, p. 13986-92, 1992.

BASCHIERI, F.; FARHAN, H. Crosstalk of small GTPases at the Golgi apparatus. **Small GTPases**, v. 3, n. 2, p. 80–90, 2012.

BAVELLONI, A.; PIAZZI, M.; RAFFINI, M.; FAENZA, I.; BLALOCK, W. L. Prohibitin 2: At a communications crossroads. **IUBMB Life**, v. 2067, n. 4, p. 239-54, 2015.

BAZENET, C. E.; MOTA, M. A.; RUBIN, L. L. The small GTP-binding protein Cdc42 is required for nerve growth factor withdrawal-induced neuronal death. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 7, p. 3984-9, 2002.

BOETTLER, U.; SOMMERFELD, K.; VOLZ, N.; PAHLKE, G.; TELLER, N.; SOMOZA, V.; LANG, R.; HOFMANN, T.; MARKO, D. Coffee constituents as modulators of Nrf2 nuclear translocation and ARE (EpRE)-dependent gene expression. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 22, n. 5, p. 426-40, 2011.

BOKOCH, G. M.; WANG, Y.; BOHL, B. P.; SELLS, M. A.; QUILLIAM, L. A.; KNAUS, U. G. Interaction of the Nck adapter protein with p21-activated kinase (PAK1). **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 42, p. 25746-9, 1996.

BOUREUX, A.; VIGNAL, E.; FAURE, S.; FORT, P. Evolution of the Rho family of Ras-like GTPases in eukaryotes. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 1, p.203-16, 2007.

BRAND, F.; SCHUMACHER, S.; KANT, S.; MENON, M. B.; SIMON, R.; TURGEON, B.; BRITSCH, S.; MELOCHE, S.; GAESTEL, M.; KOTLYAROV, A. The Extracellular Signal-Regulated Kinase 3 (Mitogen-Activated Protein Kinase 6 [MAPK6])-MAPK-Activated Protein Kinase 5 Signaling Complex Regulates Septin Function and Dendrite Morphology. **Molecular and Cellular Biology**, v. 32, n. 13, p. 2467–2478, 2012.

BRAND, FRANK; SCHUMACHER, S.; KANT, S.; MENON, M.; SIMON, R.; TURGEON, B.; BRITSCH, S.; MELOCHE, S.; GAESTEL, M.; KOTLYAROV, A. The ERK3 (MAPK6)-MAPKAP kinase 5 signalling complex regulates septin function and dendrite morphology. **Molecular and Cellular Biology**, v.32, n. 13, p. 2467–2478, 2012.

BRANDWEIN, D.; WANG, Z. Interaction between Rho GTPases and 14-3-3 proteins. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 10, 2017.

BRIDGES, A. A.; GLADFELTER, A. S. Septin form and function at the cell cortex. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 28, p. 17173-80, 2015.

BRIGGS, M. W.; SACKS, D. B. IQGAP proteins are integral components of cytoskeletal regulation. **EMBO Reports**, v. 4, n. 6, p. 571–574, 2003.

BUDAY, L.; WUNDERLICH, L.; TAMÁS, P. The Nck family of adapter proteins: Regulators of actin cytoskeleton. **Cellular Signalling**, v. 14, n. 9, p.723-31, 2002.

BURBELO, P. D.; DRECHSEL, D.; HALL, A. A conserved binding motif defines numerous candidate target proteins for both Cdc42 and Rac GTPases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 29071-29074, 1995.

BUSTELO, X. R.; SAUZEAU, V.; BERENJENO, I. M. GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: Regulation, effectors and functions in vivo. **BioEssays**, v. 29, n. 4, p. 356-70, 2007.

CALLOW, M. G. PAK4 mediates morphological changes through the regulation of GEF-H1. **Journal of Cell Science**, v. 118, p.1861-72, 2005.

CALLOW, M. G.; CLAIRVOYANT, F.; ZHU, S.; SCHRYVER, B.; WHYTE, D. B.; BISCHOFF, J. R.; JALLAL, B.; SMEAL, T. Requirement for PAK4 in the anchorage-independent growth of human cancer cell lines. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 550-558, 2002.

CALVO, F.; RANFTL, R.; HOOPER, S.; FARRUGIA, A. J.; MOEENDARBARY, E.; BRUCKBAUER, A.; BATISTA, F.; CHARRAS, G.; SAHAI, E. Cdc42EP3/BORG2 and Septin Network Enables Mechano-transduction and the Emergence of Cancer-Associated Fibroblasts. **Cell Reports**, v.13, n. 12, p 2699–2714, 2015.

CERIONE, R. A. **Cdc42: New roads to travel** **Trends in Cell Biology**, v. 14, n. 3, p.127-132, 2004.

CHEN, F.; MA, L., PARRINI, M.C.; MAO, X., LOPEZ, M.; WU, C. Cdc42 is required for PIP2-induced actin polymerization end early development but not for cell viability. **Current Biology**, v. 10, n. 13, p. 758-765, 2000.

CHEN, J. L.; FUCINI, R. V.; LACOMIS, L.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; TEMPST, P.; STAMNES, M. Coatamer-bound Cdc42 regulates dynein recruitment to COPI vesicles. **Journal of Cell Biology**, v. 169, n. 3, p. 383–389, 2005.

CHEN, J.; ZHANG, M. The Par3/Par6/aPKC complex and epithelial cell polarity. **Experimental Cell Research**, v. 319, n. 10, p.1357-64, 2013.

CHEN, Y.; LI, Z.; DONG, Z.; BEEBE, J.; YANG, K.; FU, L.; ZHANG, J.-T. 14-3-3 $\sigma$  Contributes to Radioresistance By Regulating DNA Repair and Cell Cycle via PARP1 and CHK2. **Molecular Cancer Research**, v. 15, n. 4, p.418-428, 2017.

CHOU, M. M.; MASUDA-ROBENS, J. M.; GUPTA, M. L. Cdc42 promotes G1 progression through p70 S6 kinase-mediated induction of cyclin E expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 37, p.35241-7, 2003.

CHUANG, T. H.; HAHN, K. M.; LEE, J. D.; DANLEY, D. E.; BOKOCH, G. M. The small GTPase Cdc42 initiates an apoptotic signaling pathway in Jurkat T lymphocytes. **Molecular Biology of the Cell**, v. 8, n 9, p.1687-98, 1997.

COOK, D. R.; ROSSMAN, K. L.; DER, C. J. Rho guanine nucleotide exchange factors: Regulators of Rho GTPase activity in development and disease. **Oncogene**, v. 33, n 31, p.4021-35, 2014.

DART, A. E.; WELLS, C. M. P21-activated kinase 4 - Not just one of the PAK. **European Journal of Cell Biology**, v. 92, n. 4-5, p. 129-38, 2013.

DART, D. A.; BROOKE, G. N.; SITA-LUMSDEN, A.; WAXMAN, J.; BEVAN, C. L. Reducing prohibitin increases histone acetylation, and promotes androgen independence in prostate tumours by increasing androgen receptor activation by adrenal androgens. **Oncogene**, v. 31, n. 43, p. 4588-98, 2012.

DAVIS, A. J.; CHEN, D. J. DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. **Translational Cancer Research**, v. 2, n. 3, p. 130-143, 2013.

DEEVI, R.; FATEHULLAH, A.; JAGAN, I.; NAGARAJU, M.; BINGHAM, V.; CAMPBELL, F. C. PTEN regulates colorectal epithelial apoptosis through Cdc42 signalling. **British Journal of Cancer**, v. 105, n. 9, p 1313–1321, 2011.

DOUGHERTY, M. K. Unlocking the code of 14-3-3. **Journal of Cell Science**, v. 117, p. 1875-84, 2004.

DOVAS, A.; COUCHMAN, J. R. RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities. **Biochemical Journal**, v. 390, p.1-9, 2005.

DUBASH, A. D.; GUILLUY, C.; SROUGI, M. C.; BOULTER, E.; BURRIDGE, K.; GARCÍA-MATA, R. The small GTPase RhoA localizes to the nucleus and is activated by Net1 and DNA damage signals. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, e17380, 2011.

DUNN, K. W.; KAMOČKA, M. M.; MCDONALD, J. H. A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 300, n. 4, p.C723-42, 2011.

EINARSON, M. B. Detection of protein-protein interactions using the GST fusion protein pull-down technique. **Nature Methods**, v. 1, p. 275-276, 2004.

EINARSON, M. B.; PUGACHEVA, E. N.; ORLINICK, J. R. GST Pull-down. **Cold Spring Harbor Protocols**, 2007.

ESPINHA, G.; OSAKI, J. H.; COSTA, E. T.; FORTI, F. L. Inhibition of the RhoA GTPase activity increases sensitivity of melanoma cells to UV radiation effects. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 6012642, 2016.

ESPINHA, G.; OSAKI, J. H.; MAGALHAES, Y. T.; FORTI, F. L. Rac1 GTPase deficient HeLa cells present reduced DNA repair, proliferation, and survival under UV or gamma irradiation. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 404, n. 1-2, p.281-97, 2015.

EWING, R. M. *et al.* Large-scale mapping of human protein-protein interactions by mass spectrometry. **Molecular Systems Biology**, v. 3, n. 89, 2007.

FARRUGIA, A. J.; CALVO, F. The Borg family of Cdc42 effector proteins Cdc42EP1-5. **Biochemical Society Transactions**, v. 44, n. 6, p. 1709-1716, 2016.

FARRUGIA, A. J.; CALVO, F. Cdc42 regulates Cdc42EP3 function in cancer-associated fibroblasts. **Small GTPases**, v. 8, n. 1, p. 49-57, 2017.

FLORIAN, M. C. *et al.* Cdc42 activity regulates hematopoietic stem cell aging and rejuvenation. **Cell Stem Cell**, v. 10, n. 5, p. 520-30, 2012.

FRANKEN, N. A. P.; RODERMOND, H. M.; STAP, J.; HAVEMAN, J.; BREE, C. VAN. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315-9, 2006.

FRITZ, G.; HENNINGER, C. Rho gtpases: Novel players in the regulation of the DNA damage response?. **Biomolecules**, v. 5, n. 4, p. 2417-34, 2015.

FU, H.; SUBRAMANIAN, R. R.; MASTERS, S. C. 14-3-3 Proteins: Structure, Function, and Regulation. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 40, p. 617-47, 2002.

FU, P.; YANG, Z.; BACH, L. A. Prohibitin-2 binding modulates insulin-like growth factor-binding protein-6 (IGFBP-6)-induced rhabdomyosarcoma cell migration. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 41, p. 29890-900, 2013.

FURNARI, B.; RHIND, N.; RUSSELL, P. Cdc25 mitotic inducer targeted by Chk1 DNA damage checkpoint kinase. **Science**, v. 277, n. 5331, p. 1495-7, 1997.

GADÉA, G.; LAPASSET, L.; GAUTHIER-ROUVIÈRE, C.; ROUX, P. Regulation of Cdc42-mediated morphological effects: A novel function for p53. **EMBO Journal**, v. 21, n. 10, p. 2373-82, 2002.

GARCIA-MATA, R.; BOULTER, E.; BURRIDGE, K. The “invisible hand”: Regulation of RHO GTPases by RHOGDIs. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 12, n. 8, p.493-504, 2011.

GARCÍA-MATA, R.; WENNERBERG, K.; ARTHUR, W. T.; NOREN, N. K.; ELLERBROEK, S. M.; BURRIDGE, K. Analysis of activated GAPs and GEFs in cell lysates. **Methods in Enzymology**, v. 406, p. 425-37, 2006.

GEIGER, H.; ZHENG, Y. **Cdc42 and aging of hematopoietic stem cells****Current Opinion in Hematology**, v. 20, n 4, p. 295–300, 2013.

GJOERUP, O.; LUKAS, J.; BARTEK, J.; WILLUMSEN, B. M. Rac and Cdc42 are potent stimulators of E2F-dependent transcription capable of promoting retinoblastoma susceptibility gene product hyperphosphorylation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 30, p. 18812-8, 1998.

GOOSEN, N. Nucleotide Excision Repair in Eukaryotes. *In: Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition*, v. 5, n. 10, a012609, 2013.

GOTTIFREDI, V.; KARNI-SCHMIDT, O.; SHIEH, S.-Y.; PRIVES, C. p53 Down-Regulates CHK1 through p21 and the Retinoblastoma Protein. **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, n. 4, p.1066-76, 2001.

GU, Y.; CHAE, H. D.; SIEFRING, J. E.; JASTI, A. C.; HILDEMAN, D. A.; WILLIAMS, D. A. RhoH GTPase recruits and activates Zap70 required for T cell receptor signaling and thymocyte development. **Nature Immunology**, v. 7, n. 11, p.1182-90, 2006.

HA, B. H.; BOGGON, T. J. CDC42 binds PAK4 via an extended GTPase-effector interface. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 3, p 531-536, 2018.

HAJAS, G.; BACSI, A.; AGUILERA-AGUIRRE, L.; HEGDE, M. L.; TAPAS, K. H.; SUR, S.; RADAK, Z.; BA, X.; BOLDOGH, I. 8-Oxoguanine DNA glycosylase-1 links DNA repair to cellular signaling via the activation of the small GTPase Rac1. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 61, p. 384-94 2013.

HALL, A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. **Science** v. 279, n. 5350, p. 509-14, 1998.

HALL, A.; NOBES, C. D. Rho GTPases: Molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *In: Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 355, n. 1399, p. 965-70, 2000.

HARTMAN, A. M.; HIRSCH, A. K. H. Molecular insight into specific 14-3-3 modulators: Inhibitors and stabilisers of protein–protein interactions of 14-3-3. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 136, p. 573-584, 2017.

HARTWELL, L. H. Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis. **Experimental Cell Research**, v. 69, n. 2, p. 265-76, 1971.

HE, B.; FENG, Q.; MUKHERJEE, A.; LONARD, D. M.; DEMAYO, F. J.; KATZENELLENBOGEN, B. S.; LYDON, J. P.; O'MALLEY, B. W. A Repressive Role for Prohibitin in Estrogen Signaling. **Molecular Endocrinology**, v. 22, n. 2, p. 344-60, 2007.



HE, F. Laemmli-SDS-PAGE. **BIO-PROTOCOL**, Bio-101: e80, 2016.

HENSELEIT, U.; ZHANG, J.; WANNER, R.; HAASE, I.; KOLDE, G.; ROSENBAACH, T. Role of p53 in UVB-induced apoptosis in human HaCaT keratinocytes. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 109, n. 6, p. 722-7, 1997.

HIGGS, H. N.; POLLARD, T. D. Activation by Cdc42 and PIP2 of Wiskott-Aldrich Syndrome protein (WASp) stimulates actin nucleation by Arp2/3 complex. **Journal of Cell Biology**, v. 150, n. 6, p. 1311–1320, 2000.

HOEIJMAKERS, J. H. J. DNA Damage, Aging, and Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 15, p.1475-85, 2009.

HUELSENBECK, S. C.; SCHORR, A.; ROOS, W. P.; HUELSENBECK, J.; HENNINGER, C.; KAINA, B.; FRITZ, G. Rac1 protein signaling is required for DNA damage response stimulated by topoisomerase II poisons. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 46, p. 38590-9, 2012.

ICHIMURA, T.; ISOBE, T.; OKUYAMA, T.; TAKAHASHI, N.; ARAKI, K.; KUWANO, R.; TAKAHASHI, Y. Molecular cloning of cDNA coding for brain-specific 14-3-3 protein, a protein kinase-dependent activator of tyrosine and tryptophan hydroxylases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 19, p. 7084-8, 1988.

JAFFE, A. B.; HALL, A. RHO GTPASES: Biochemistry and Biology. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 21, p. 247-69. 2005.

JAFFER, Z. M.; CHERNOFF, J. p21-Activated kinases: Three more join the Pak. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 34, n. 7, p.713-7, 2002.

JOBERTY, G.; PERLUNGHER, R. R.; MACARA, I. G. The Borgs, a New Family of Cdc42 and TC10 GTPase-Interacting Proteins. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, n. 10, p. 6585-97 1999.

JOBERTY, G.; PERLUNGHER, R. R.; SHEFFIELD, P. J.; KINOSHITA, M.; NODA, M.; HAYSTEAD, T.; MACARA, I. G. Borg proteins control septin organization and are negatively regulated by Cdc42. **Nature Cell Biology**, v. 10, p. 861-6, 2001.

JOO, E.; TSANG, C. W.; TRIMBLE, W. S. Septins: Traffic control at the cytokinesis intersection. **Traffic**, v. 6, n. 8, p. 626-34, 2005.

KASTAN, M. B.; BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 316-23 2004.

KINOSHITA, M. Diversity of septin scaffolds. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 18, n.1, p. 54-60, 2006.

KODANI, A.; KRISTENSEN, I.; HUANG, L.; SUTTERLIN, C. GM130-dependent Control of Cdc42 Activity at the Golgi Regulates Centrosome Organization. **Molecular Biology of the Cell**, v. 20, n. 4, p.1192-200, 2009.

KOWLURU, A.; CHEN, H. Q.; TANNOUS, M. Novel roles for the Rho subfamily of GTP-binding proteins in succinate-induced insulin secretion from  $\beta$ TC3 cells: Further evidence in support of the succinate mechanism of insulin release. **Endocrine Research**, v. 29, n. 3, p. 363-76, 2003.

KREMER, B. E.; ADANG, L. A.; MACARA, I. G. Septins Regulate Actin Organization and Cell-Cycle Arrest through Nuclear Accumulation of NCK Mediated by SOCS7. **Cell**, v. 130, n. 5, p. 837-502007, 2007.

KRISTJÁNSDÓTTIR, K.; RUDOLPH, J. Cdc25 phosphatases and cancer. **Chemistry and Biology**, v. 11, n. 8, p.1043-51, 2004.

KUMAR, R.; SANAWAR, R.; LI, X.; LI, F. Structure, biochemistry, and biology of PAK kinases. **Gene**, v. 605, p. 20-31, 2017.

LATONEN, L.; LAIHO, M. Cellular UV damage responses - Functions of tumor suppressor p53. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1755, n. 2, p.71-89, 2005.

LEHMAN, T. A.; MODALI, R.; BOUKAMP, P.; STANEK, J.; BENNETT, W. P.; WELSH, J. A.; METCALF, R. A.; STAMPFER, M. R.; FUSENIG, N.; ROGAN, E. M.; HARRIS, C. C. P53 mutations in human immortalized epithelial cell lines. **Carcinogenesis**, v. 14, n. 5, p. 833-9, 1993.

LI, W.; FAN, J.; WOODLEY, D. T. Nck/Dock: An adapter between cell surface receptors and the actin cytoskeleton. **Oncogene**, v. 20, n. 44, p. 6403-17, 2001.

LI, YAN; SHAO, Y.; TONG, Y.; SHEN, T.; ZHANG, J.; LI, YANSHU; GU, H.; LI, F. Nucleo-cytoplasmic shuttling of PAK4 modulates  $\beta$ -catenin intracellular translocation and signaling. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1823, n. 2, p.465-75, 2012.

LI, Z.; DONG, X.; WANG, Z.; LIU, W.; DENG, N.; DING, Y.; TANG, L.; HLA, T.; ZENG, R.; LI, L.; WU, D. Regulation of PTEN by Rho small GTPases. **Nature Cell Biology**, v. 7, n. 4, p. 399-404, 2005.

LIU, L.F.; DESAI, S.D.; LI, T.K.; MAO, Y.; SUN, M.; SIM, S.P. Mechanism of action of camptothecin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, V. 922, p. 1-10, 2000.

LIU, Q.; GUNTUKU, S.; CUI, X.S.; MATSUOKA, S., CORTEZ, D., TAMAI, K. Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G2/M DNA damage checkpoint. **Genes and Development**, v. 14, n. 12, p. 1448–1459, 2000.

LIU, Y.; XIAO, H.; TIAN, Y.; NEKRASOVA, T.; HAO, X.; LEE, H. J.; SUH, N.; YANG, C. S.; MINDEN, A. The Pak4 Protein Kinase Plays a Key Role in Cell Survival and Tumorigenesis in Athymic Mice. **Molecular Cancer Research**, v. 6, n. 7, p. 1215-24, 2008.

LOMBARD, D. B.; CHUA, K. F.; MOSTOSLAVSKY, R.; FRANCO, S.; GOSTISSA, M.; ALT, F. W. DNA repair, genome stability, and aging. **Cell**, v. 120, n. 4, p. 497-512, 2005.

LÓPEZ-OTÍN, C.; BLASCO, M. A.; PARTRIDGE, L.; SERRANO, M.; KROEMER, G. The hallmarks of aging. **Cell**, v. 153, n. 6, p. 1194–1217, 2013.

LU, W.; KATZ, S.; GUPTA, R.; MAYER, B. J. Activation of Pak by membrane localization mediated by an SH3 domain from the adaptor protein Nck. **Current Biology**, v.7, n. 2, p. 85-94, 1997.

MA L-L, SHEN L, TONG G-H, TANG N, LUO Y, GUO L-L. Prohibitin, relocated to the front ends, can control the migration directionality of colorectal cancer cells. **Oncotarget**, v. 8, n. 44, p. 76340-76356, 2017.

MADAULE, P.; AXEL, R. A novel ras-related gene family. **Cell**, v. 41, n. 1, p.31-40, 1985.

MARTIN-BELMONTE, F.; GASSAMA, A.; DATTA, A.; YU, W.; RESCHER, U.; GERKE, V.; MOSTOV, K. PTEN-Mediated Apical Segregation of Phosphoinositides Controls Epithelial Morphogenesis through Cdc42. **Cell**, v. 128, n. 2, p. 383-97, 2007.

- MARTINELLI, S.; KRUMBACH OHF, PANTALEONI F, COPPOLA S, AMIN E, PANNONE L. Functional Dysregulation of CDC42 Causes Diverse Developmental Phenotypes. **American Journal of Human Genetics**, v. 102, n. 2, p. 309-320, 2018.
- MCCLUNG, J. K.; DANNER, D. B.; STEWART, D. A.; SMITH, J. R.; SCHNEIDER, E. L.; LUMPKIN, C. K.; DELL'ORCO, R. T.; NUELLE, M. J. Isolation of a cDNA that hybrid selects antiproliferative mRNA from rat liver. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 164, n. 3, p. 1316-22, 1989.
- MERKWIRTH, C.; LANGER, T. Prohibitin function within mitochondria: Essential roles for cell proliferation and cristae morphogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1793, n. 1, p.27-32, 2009.
- MILTON, A. H.; KHAIRE, N.; INGRAM, L.; O'DONNELL, A. J.; THANGUE, N. B. LA. 14-3-3 Proteins integrate E2F activity with the DNA damage response. **EMBO Journal**, v. 25, n. 5, p. 1046–1057, 2006.
- MOEHRLE, B. M.; GEIGER, H. Aging of hematopoietic stem cells: DNA damage and mutations?. **Experimental Hematology**, v. 44, n. 10, p.895-901, 2016.
- MOON, S. Y.; ZHENG, Y. Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. **Trends in Cell Biology**, v. 13, n. 1, p.13-22, 2003.
- MORREALE, A.; VENKATESAN, M.; MOTT, H. R.; OWEN, D.; NIETLISPACH, D.; LOWE, P. N.; LAUE, E. D. Structure of Cdc42 bound to the GTPase binding domain of PAK. **Nature Structural Biology**, v. 7, n. 5, p.384-8, 2000.
- MOSTOWY, S.; COSSART, P. Septins: The fourth component of the cytoskeleton. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, p. 183-194, 2012.
- NALBANT, P.; HODGSON, L.; KRAYNOV, V.; TOUTCHKINE, A.; HAHN, K. M. Activation of endogenous Cdc42 visualized in living cells. **Science**, v. 305, n. 5690, p. 1615-9, 2004.
- NEGRINI, S.; GORGOULIS, V. G.; HALAZONETIS, T. D. Genomic instability an evolving hallmark of cancer. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 3, p.220-8, 2010.
- NEUBAUER, K.; ZIEGER, B. The Mammalian Septin Interactome. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 5, n. 3, 2017.

NOGUCHI, S.; YAMADA, N.; KUMAZAKI, M.; YASUI, Y.; IWASAKI, J.; NAITO, S.; AKAO, Y. Socs7, a target gene of microRNA-145, regulates interferon- $\beta$  induction through STAT3 nuclear translocation in bladder cancer cells. **Cell Death and Disease**, v. 4, e4822013, 2013.

OBSIL, T.; OBSILOVA, V. Structural basis of 14-3-3 protein functions. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 22, n. 7, p. 663-72, 2011.

OKITA, N.; MINATO, S.; OHMI, E.; TANUMA, S. I.; HIGAMI, Y. DNA damage-induced CHK1 autophosphorylation at Ser296 is regulated by an intramolecular mechanism. **FEBS Letters**, v. 586, n. 22, p.3974-9, 2012.

OLSON, M. F.; ASHWORTH, A.; HALL, A. An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. **Science**, v. 269, n. 5228, p.1270-2, 1995.

OSAKI, J. H.; ESPINHA, G.; MAGALHAES, Y. T.; FORTI, F. L. Modulation of RhoA GTPase Activity Sensitizes Human Cervix Carcinoma Cells to  $\gamma$ -Radiation by Attenuating DNA Repair Pathways. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 6012642, 2016.

PARK, G. Y.; HAN, J. Y.; HAN, Y. K.; KIM, S. D.; KIM, J. S.; JO, W. S.; CHUN, S. H.; JEONG, D. H.; LEE, C. W.; YANG, K.; LEE, C. G. 14-3-3 eta depletion sensitizes glioblastoma cells to irradiation due to enhanced mitotic cell death. **Cancer Gene Therapy**, v.21, p. 158–163, 2014.

PÉREZ-YÉPEZ, E. A.; SALDÍVAR-CERÓN, H. I.; VILLAMAR-CRUZ, O.; PÉREZ-PLASENCIA, C.; ARIAS-ROMERO, L. E. p21 Activated kinase 1: Nuclear activity and its role during DNA damage repair. **DNA Repair**, v. 65, p. 42-46, 2018.

PONTUS ASPENSTRÖM. Effectors for the Rho GTPases. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 11, p.95–102, 1999.

PORTER, A. P.; PAPAIOANNOU, A.; MALLIRI, A. Deregulation of Rho GTPases in cancer. **Small GTPases**, v. 7, n. 3, p. 123-38, 2016.

QU, J.; CAMMARANO, M. S.; SHI, Q.; HA, K. C.; LANEROLLE, P. DE; MINDEN, A. Activated PAK4 Regulates Cell Adhesion and Anchorage-Independent Growth. **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, n. 10, p. 3523-3533, 2002.

RANE, C. K.; MINDEN, A. P21 activated kinases: Structure, regulation, and functions. **Small GTPases**, 5: e28003, 2014.

RASTOGI, R. P.; RICHA; KUMAR, A.; TYAGI, M. B.; SINHA, R. P. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. **Journal of Nucleic Acids**, 592980, 2010.

REARDON, J. T.; SANCAR, A. Nucleotide Excision Repair. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, v. 79, p. 183-235, 2005.

RIOU, P.; KJÆR, S.; GARG, R.; PURKISS, A.; GEORGE, R.; CAIN, R.J. 14-3-3 proteins interact with a hybrid prenyl-phosphorylation motif to inhibit G proteins. **Cell**, v. 153, n.3, p.640-53, 2013.

RIZWANI, W.; ALEXANDROW, M.; CHELLAPPAN, S. Prohibitin physically interacts with MCM proteins and inhibits mammalian DNA replication. **Cell Cycle**, v. 8, n. 10, p. 1621–1629, 2009.

ROHATGI, R.; NOLLAU, P.; HENRY HO, H. Y.; KIRSCHNER, M. W.; MAYER, B. J. Nck and Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Synergistically Activate Actin Polymerization through the N-WASP-Arp2/3 Pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 26448-26452, 2001.

SANCAR, A.; LINDSEY-BOLTZ, L. A.; UNSAL-KAÇMAZ, K.; LINN, S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. **Annual Review of Biochemistry**, v. 73, p. 39-85, 2004.

SANDROCK, K.; BIELEK, H.; SCHRADI, K.; SCHMIDT, G.; KLUGBAUER, N. The nuclear import of the small GTPase Rac1 is mediated by the direct interaction with karyopherin  $\alpha 2$ . **Traffic**, v. 11, n. 2, p.198-209, 2010.

SCHAEFER, A.; REINHARD, N. R.; HORDIJK, P. L. Toward understanding RhoGTPase specificity: Structure, function and local activation. **Small GTPases**, v. 5, n.2, p6, 2014.

SCHOENTAUBE, J.; OLLING, A.; TATGE, H.; JUST, I.; GERHARD, R. Serine-71 phosphorylation of Rac1/Cdc42 diminishes the pathogenic effect of Clostridium difficile toxin A. **Cellular Microbiology**, v. 11, n. 12, p. 1816-26, 2009.

SCHUMACHER, B.; GARINIS, G. A.; HOEIJMAKERS, J. H. J. Age to survive: DNA damage and aging. **Trends in Genetics**, v. 24, n. 2, p. 77-85, 2008.

SCHWARZ, J.; PROFF, J.; HÄVEMEIER, A.; LADWEIN, M.; ROTTNER, K.; BARLAG, B.; PICH, A.; TATGE, H.; JUST, I.; GERHARD, R. Serine-71 phosphorylation of Rac1 modulates downstream signaling. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, e44358, 2012.

SHEN, Z. Genomic instability and cancer: An introduction. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 3, n. 1, p. 1-3, 2011.

SHILOH, Y. ATM and ATR: Networking cellular responses to DNA damage. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 11, n. 1, p. 71-7, 2001.

SINHA, S.; YANG, W. Cellular signaling for activation of Rho GTPase Cdc42. **Cellular Signalling**, v. 20, n. 11, p.1927-34, 2008.

SIU, M. K. Y. CHAN, H.Y.; KONG, D.S.H.; WONG, E.S.Y.; WONG, O.G.W.; NGAN, H.Y.S. p21-activated kinase 4 regulates ovarian cancer cell proliferation, migration, and invasion and contributes to poor prognosis in patients. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 43, p.18622-7, 2010.

SLUSS, H. K.; DAVIS, R. J. H2AX Is a Target of the JNK Signaling Pathway that Is Required For Apoptotic DNA Fragmentation. **Molecular Cell**, v. 23, n. 2, p.152-3, 2006.

SMITH, J.; MUN THO, L.; XU, N.; A. GILLESPIE, D. The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. In: **Advances in Cancer Research.**, v. 108, p.73-112, 2010.

SONG, S.; CONG, W.; ZHOU, S.; SHI, Y.; DAI, W.; ZHANG, H.; WANG, X.; HE, B.; ZHANG, Q. Small GTPases: Structure, biological function and its interaction with nanoparticles. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 14, n. 1, p.30-39, 2019.

SPILIOTIS, E. T.; DOLAT, L. Septins: Cytoskeletal Filaments with Structural and Regulatory Functions. In: **Encyclopedia of Cell Biology**, v. 2, p. 579-587, 2015.

STENGEL, K.; ZHENG, Y. Cdc42 in oncogenic transformation, invasion, and tumorigenesis. **Cellular Signalling**, v. 23, n.9, p.1415-23, 2011.

SUDHAHARAN, T.; GOH, W. I.; SEM, K. P.; LIM, K. B.; BU, W.; AHMED, S. Rho GTPase Cdc42 is a direct interacting partner of adenomatous polyposis coli protein and can alter its cellular localization. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, e16603, 2011.

SUN, L. G.; MA, K. W.; HUANG, H. L.; WEI, H. F.; WANG, L. Y. Molecular mechanism of regulation of Prohibitin 2 on transcriptional activity of myocyte enhancer factor 2. **Journal of Jilin University Medicine Edition**, 2009.

SZCZEPANOWSKA, J. Involvement of Rac/Cdc42/PAK pathway in cytoskeletal rearrangements. **Acta Biochimica Polonica**, v. 56, n. 2, p. 225-34, 2009.

TANG, S.; BAO, H.; ZHANG, Y.; YAO, J.; YANG, P.; CHEN, X. 14-3-3 $\epsilon$  Mediates the Cell Fate Decision-Making Pathways in Response of Hepatocellular Carcinoma to Bleomycin-Induced DNA Damage. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, e55268, 2013.

TCHERKEZIAN, J.; LAMARCHE-VANE, N. Current knowledge of the large RhoGAP family of proteins. **Biology of the Cell**, v. 99, n. 2, p.67-86, 2007.

TIBBETTS, R.S.; CORTEZ, D.; BRUMBAUGH, K.M.; SCULLY, R.; LIVINGSTON, D.; ELLEDGE, S. J.; ABRAHAM, R.T. Functional interactions between BRCA1 and the checkpoint kinase ATR during genotoxic stress. **Genes and Development**, 2000, v. 14, n. 23, p. 2989–3002.

WANG, L.; YANG, L.; DEBIDDA, M.; WITTE, D.; ZHENG, Y. Cdc42 GTPase-activating protein deficiency promotes genomic instability and premature aging-like phenotypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 4, p.1248-53, 2007.

WATSON, J. R.; OWEN, D.; MOTT, H. R. Cdc42 in actin dynamics: An ordered pathway governed by complex equilibria and directional effector handover. **Small GTPases**, v. 8, n. 4, p. 237-244, 2017.

WEI, Y.; CHIANG, W. C.; SUMPTER, R.; MISHRA, P.; LEVINE, B. Prohibitin 2 Is an Inner Mitochondrial Membrane Mitophagy Receptor. **Cell**, v. 168, n.(1-2), p. 224-238, e10, 2017.

WEIBRECHT, I.; LEUCHOWIUS, K. J.; CLAUSSON, C. M.; CONZE, T.; JARVIUS, M.; HOWELL, W. M.; KAMALI-MOGHADDAM, M.; SÖDERBERG, O. Proximity ligation assays: A recent addition to the proteomics toolbox. **Expert Review of Proteomics**, v. 7, n. 3, p. 401-9, 2010.



WELLS, C. M.; JONES, G. E. The emerging importance of group II PAKs. **Biochemical Journal**, v. 425, n. 3, p. 465-73, 2010.

WILLIAMS, C. L. The polybasic region of Ras and Rho family small GTPases: A regulator of protein interactions and membrane association and a site of nuclear localization signal sequences. **Cellular Signalling**, v. 15, n. 12, p. 1071-80, 2003.

XIAO, Z.; CHEN, Z.; GUNASEKERA, A. H.; SOWIN, T. J.; ROSENBERG, S. H.; FESIK, S.; ZHANG, H. Chk1 mediates S and G<sub>2</sub> arrests through Cdc25A degradation in response to DNA-damaging agents. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 24, p.21767-73, 2003.

YANG, W. Surviving the sun: Repair and bypass of DNA UV lesions. **Protein Science**, v. 20, n. 11, p. 1781–1789, 2011.

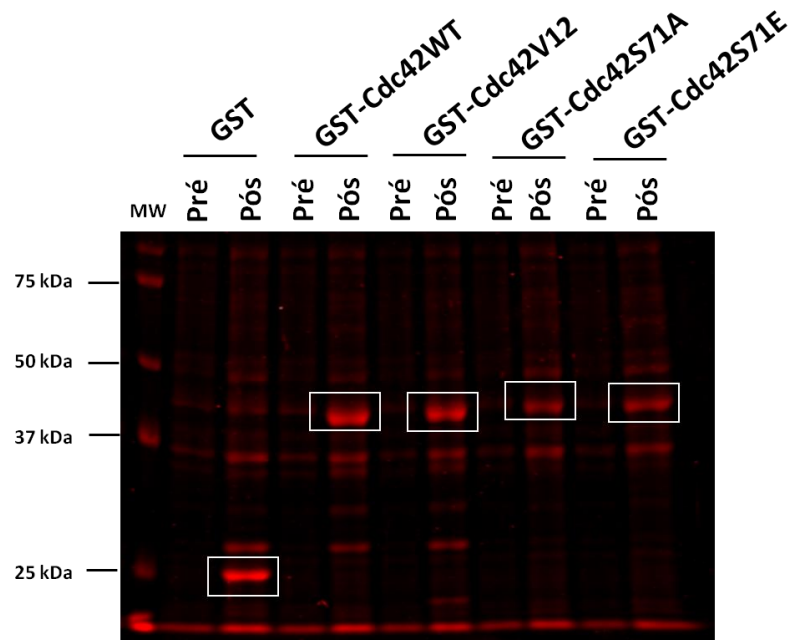
YE, D. Z.; FIELD, J. PAK signaling in cancer. **Cellular Logistics**, v. 2, n. 2, p.105-116, 2012.

ZHANG, D. G.; ZHANG, J.; MAO, L. L.; WU, J. X.; CAO, W. J.; ZHENG, J. N.; PEI, D. S. p21-Activated kinase 5 affects cisplatin-induced apoptosis and proliferation in hepatocellular carcinoma cells. **Tumor Biology**, v. 36, n. 5, p. 3685-91, 2015.

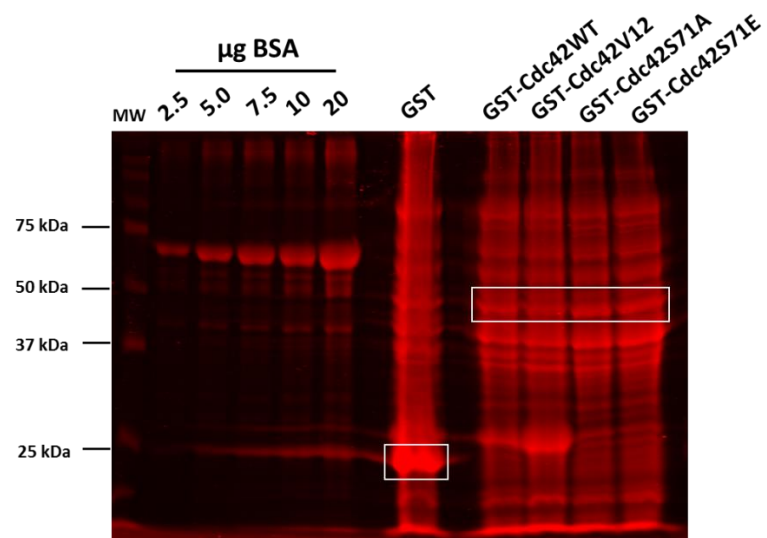
ZHAO, H.; PIWNICA-WORMS, H. ATR-Mediated Checkpoint Pathways Regulate Phosphorylation and Activation of Human Chk1. **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, n. 13, p. 4129-4139, 2002.

ZHOU, T. B.; QIN, Y. H. Signaling pathways of prohibitin and its role in diseases. **Journal of Receptors and Signal Transduction**, v. 33, n. 1, p.28-36, 2013.

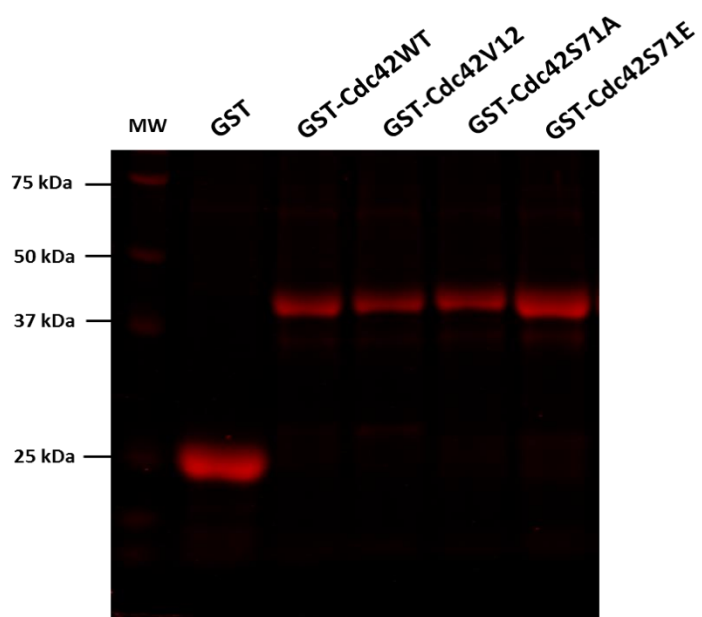
## APÊNDICE 1



**Figura 29 - Expressão das proteínas recombinantes em bactérias *E. coli* (BL21).** A indução foi realizada com 0,5 mM de IPTG ( $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo de isopropilo). Alíquotas foram coletadas dos respectivos inóculos previamente à adição do indutor de expressão e, após o tempo de indução final de 3 h. Após desnaturação das amostras em tampão de Laemmli 5x, prosseguiu-se com a corrida eletroforética e o gel foi corado com Coomassie blue e escaneado no equipamento Odyssey Licor (600 nm).



**Figura 30 - Quantificação das proteínas recombinantes no lisado bacteriano obtidas após sonicação.** As concentrações das proteínas no lisado bacteriano foram determinadas através de uma curva padrão de albumina bovina com cinco diferentes concentrações. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com Coomassie blue e escaneado no equipamento Odyssey Licor (600 nm).



**Figura 31 - Proteínas recombinantes purificadas por cromatografia de afinidade (Sephrose 4B).** Os sinais de iscas foram normalizados pela isca GST a fim de se obter quantidades equimolares entre as iscas. Após desnaturação das iscas em tampão de Laemmli 5x, prosseguiu-se com a corrida eletroforética. O gel foi corado com Coomassie blue e escaneado no equipamento Odyssey Licor (600 nm).

## APÊNDICE 2

**Tabela 2 - Lista de proteínas identificadas por espectrometria de massas em todas as amostras de HeLa, excluídas aquelas presentes nos controles GST.**

	Gene names	IDs of the major proteins	Score	Unique peptides	Sequence coverage [%]	KEGG name
1	ADRM1	Q16186	96.612	1	3.9	Proteasome
2	SERPINB1	P30740	91.146	3	9.2	Amoebiasis
3	PSMB1	P20618	87.239	4	24.1	Proteasome
4	AP3D1	O14617	84.382	2	3.2	Lysosome
5	FBNP1L	Q5TON5	74.607	6	11.2	Membrane trafficking, endocytosis
6	ATP5C1	P36542	63.379	2	7.4	Alzheimer's disease; oxidative phosphorylation
7	RAP1GDS1	P52306	61.886	15	30.8	GEF
8	IGF2BP1	Q9NZI8	60.843	2	7.1	Spliceosome
9	LARS	Q9P2J5	58.184	1	2.5	Aminoacyl-tRNA biosynthesis
10	TRAF7	Q6Q0C0	57.808	4	8.1	Ubiquitin ligase
11	IARS	P41252	56.217	3	2.5	Aminoacyl-tRNA biosynthesis
12	COPA	P53621	55.966	3	3.3	Neuroactive ligand-receptor interaction
13	<b>PHB2</b>	<b>Q99623</b>	<b>55.605</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>Apoptosis, cell cycle regulation</b>
14	PALLD	Q8WX93	55.479	3	9.4	Cytoskeleton dynamics
15	HNRNPAB	Q99729	54.899	3	12.3	Spliceosome
16	SF1	Q15637	52.223	2	7.1	Spliceosome
17	PRDX3	P30048	50.517	3	23.9	Peroxiredoxin 3, exosome, oxidative stress
18	LGALS7	P47929	50.055	1	8.1	Apoptosis
19	SLC16A3	O15427	48.674	3	7.3	MFS Transporter
20	RhoA;RhoC	P61586;P08134	47.106	2	14	Pathways in cancer; regulation of the actin cytoskeleton
21	TPM1	P09493	47.046	3	22.2	Cardiac muscle contraction
22	ALDH18A1	P54886	44.906	1	2.9	Arginine and proline metabolism
23	<b>KPNA2</b>	<b>P52292</b>	<b>43.87</b>	<b>3</b>	<b>10</b>	<b>Centrosome formation</b>
24	BTF3	P20290	42.334	2	24.1	Apoptosis
25	RARS	P54136	41.339	3	4.5	Aminoacyl-tRNA biosynthesis
26	<b>SEPT2</b>	<b>Q15019</b>	<b>41.108</b>	<b>3</b>	<b>15</b>	<b>Septin cytoskeleton</b>
27	KYNU	Q16719	40.174	2	6.7	Tryptophan metabolism
28	PGD	P52209	39.523	1	4.5	Metabolism
29	HSD17B10	Q99714	39.372	3	17.9	Alzheimer's disease
30	DPYSL2	Q16555	38.835	2	7.5	Axon guidance
31	FKBP10	Q96AY3	38.378	3	5.5	Chaperone and folding catalysts
32	TPD52L2	O43399	37.439	3	20.2	Tumor protein D52-Like 2
33	PHPT1	Q9NRX4	37.041	1	16.8	Fructose and mannose metabolism
34	ECHS1	P30084	36.346	1	4.5	Metabolism
35	CASP14	P31944	35.729	2	7.9	Apoptosis
36	PSMC5	P62195	35.058	2	6.8	Proteasome
37	GSR	P00390	33.857	2	6.8	Glutathione metabolism
38	ATPIF1	Q9UII2	33.562	2	17	Mitophagy, autophagy, membrane trafficking
39	LONP1	P36776	33.377	2	3	Mitochondrial biogenesis
40	HN1L	Q9H910	32.722	1	8	Cramped chromatin regulator homolog 1

	Gene names	IDs of the major proteins	Score	Unique peptides	Sequence coverage [%]	KEGG name
41	YARS	P54577	32.612	1	2.3	Aminoacyl-tRNA biosynthesis
42	PPP2R1A	P30153	32.031	2	5.1	Cell cycle - yeast;mRNA surveillance pathway
43	CAPNS1	P04632	31.751	2	10.4	Metabolism
44	ATP5H	O75947	31.624	1	12.4	Alzheimer's disease; oxidative phosphorylation
45	CAPZB	P47756	31.336	3	11.4	Cytoskeleton dynamics, exosome
46	CDKN2A	P42771	31.031	3	26.3	Cell cycle;P53 signalling pathway; pathways in cancer
47	SH3BGRL3	Q9H299	29.862	2	19.4	SH3 domain binding glutamate rich protein like 3
48	CBX3	Q13185	29.859	1	7.7	Spliceosome, heterochromatin binding protein
49	PCNP	Q8WW12	29.849	2	15.2	PEST proteolytic signal containing nuclear protein
50	TUBB3	Q13509	29.081	1	29.3	Gap junction;phagosome
51	PSAT1	Q9Y617	29.041	3	10.8	Metabolism
52	VARS	P26640	28.788	2	2.1	Aminoacyl-tRNA biosynthesis
53	GART	P22102	28.146	2	2	Metabolism
54	ATP6V1A	P38606	28.011	1	3.6	Oxidative phosphorylation
55	ANXA11	P50995	27.926	2	5.7	Apoptosis
56	SERPINB3	P29508	27.856	2	21.5	Amoebiasis
57	SSB	P05455	27.318	2	5.6	Systemic lupus erythematosus
58	H1FX	Q92522	26.842	2	13.1	Nucleosome assembly factors
59	TXNL1	O43396	26.744	1	7.6	Thioredoxin like 1
<b>60</b>	<b>Cdc42EP3</b>	<b>Q9UKI2</b>	<b>26.446</b>	<b>2</b>	<b>9.8</b>	<b>Septin cytoskeleton regulation</b>
61	TMOD3	Q9NYL9	26.364	2	7.1	Cytoskeleton dynamics
62	C9orf142	Q9BUH6	25.515	2	10.3	PAXX non-homologous end joining factor
63	GIT2	Q14161	25.459	3	9.1	Endocytosis
64	UGDH	O60701	24.835	8	25.1	Metabolism
65	PDCD5	O14737	24.071	3	30.4	Programmed cell death protein 5
66	CRIP2	P52943	23.98	1	15.4	Cysteine rich protein 2
67	UBE2L3	P68036	23.932	1	18	Ubiquitin-mediated proteolysis
68	SRM	P19623	23.686	2	7.6	Metabolism
69	RBM39	Q14498	23.552	2	4.9	RNA-binding protein, spliceosome
70	BZW2	Q9Y6E2	23.486	1	2.1	Basic leucine zipper and W2 domains 2
71	TBCA	O75347	23.082	2	26.9	Cytoskeleton dynamics
72	FKBP1A	P62942	23.034	1	12	FKBP prolyl isomerase 1A
73	MRM1	Q6IN84	23.016	5	20.1	Ribosome biogenesis
74	ACOT7	O00154	22.824	1	4.5	Biosynthesis of unsaturated fatty acids
75	KHDRBS1	Q07666	22.566	2	6.9	Spliceosome
76	CTNNA1	P35221	22.514	1	2	Adherens junction; pathways in cancer
77	FLNC	Q14315	22.253	1	3.6	Focal adhesion;MAPK signalling pathway
78	KARS	Q15046	22.181	2	5.7	Aminoacyl-tRNA biosynthesis
79	EHD2	Q9NZN4	22.128	1	2.9	Endocytosis
80	GALNT2	Q10471	21.818	1	1.9	Mucin type O-glycan biosynthesis
81	TOR1AIP1	Q5JTV8;Q5JTV8-3	21.764	2	4.3	Chaperone, folding catalysts
<b>82</b>	<b>PAK4</b>	<b>O96013</b>	<b>21.643</b>	<b>6</b>	<b>14.2</b>	<b>Focal adhesion; regulation of the actin cytoskeleton</b>

	Gene names	IDs of the major proteins	Score	Unique peptides	Sequence coverage [%]	KEGG name
83	HYOU1	Q9Y4L1	21.616	2	2.9	Protein processing in the endoplasmic reticulum
84	ACO1	P21399	20.977	1	0.9	Metabolism
85	UBE2N;UBE2NL	P61088;Q5JXB2	20.854	2	13.8	Ubiquitin-mediated proteolysis
86	COPE	O14579	20.763	1	7.8	Coatomer Protein Complex Subunit Epsilon
87	PSMD3	O43242	20.756	2	3.9	Proteasome
88	MARCKSL1	P49006	20.618	1	6.7	Fc gamma R-mediated phagocytosis
89	RBM8A	Q9Y5S9	20.266	1	11	RNA transport;spliceosome
90	ACO2	Q99798	19.971	1	2.1	Metabolism
91	BCCIP	Q9P287	19.949	1	5.5	Ribosome biogenesis
92	ACTR3	P61158	19.454	1	2.9	Cytoskeleton dynamics
93	MAPRE1	Q15691	19.367	2	9.3	Cytoskeleton dynamics, microtubule
94	EIF5B	O60841	19.002	1	1.6	RNA transport
95	ACADM	P11310	18.834	1	3.6	Fatty acid metabolism;PPAR signalling pathway
96	XPO1	O14980	18.442	1	1.1	Ribosome biogenesis in eukaryotes;RNA transport
97	AARS	P49588	18.281	1	1.5	Aminoacyl-tRNA biosynthesis
98	MYO1C	O00159	18.089	2	3	Cytoskeleton dynamics, exosome
99	YWHAH	Q04917	17.932	2	19.9	Cell cycle;neurotrophinsignalling pathway
100	IPO5	O00410	17.794	1	0.8	Ribosome biogenesis
101	HADH	Q16836	17.072	1	4.5	Metabolism
102	DIAPH1	O60610	16.916	1	1.2	Focal adhesion; regulation of the actin cytoskeleton
103	TMX1	Q9H3N1	16.692	1	4.3	Thioredoxin related transmembrane protein 1
104	NASP	P49321	16.627	1	4.5	Nucleosome assembly
105	OLA1	Q9NTK5	16.586	2	6.1	Centrosome regulation
106	MCM6	Q14566	16.351	1	1.6	Cell cycle;DNA replication
107	G6PD	P11413	16.171	5	9.3	Metabolism
108	PSMD11	O00231	15.968	2	5.7	Proteasome
109	BLMH	Q13867	15.846	1	2.4	Metabolism
110	RRM1	P23921	15.738	1	1.1	Metabolism
111	STMN2	Q93045	15.512	1	15.1	Stathmin 2
112	CSE1L	P55060	15.28	3	4.3	CSE1L antisense RNA 1
113	CALML5	Q9NZT1	15.103	2	21.2	Phosphatidylinositol signalling system
114	PABPC4	Q13310	14.852	2	12	mRNA surveillance pathway;RNA transport
115	TTC12	Q9H892	14.484	2	3.8	Tetratricopeptide repeat domain 12
116	SDHA	P31040	14.275	1	2.9	Alzheimer's disease; oxidative phosphorylation
117	NCAPD2	Q15021	14.215	2	1.5	Cell cycle - yeast
118	GLS	O94925	13.769	1	12.4	Metabolism
119	MASTL	Q96GX5	13.603	1	1.6	Metabolism
120	MTDH	Q86UE4	13.497	1	1.9	Metadherin
121	TRRAP	Q9Y4A5	13.413	1	0.3	Metabolism, histone modification
122	TMED9	Q9BVK6	13.183	1	4.7	Membrane trafficking
123	FAM129B	Q96TA1	13.013	2	3.5	Apoptosis
124	FKBP3	Q00688	12.998	1	6.7	FK506-binding protein 3, protein folding

	Gene names	IDs of the major proteins	Score	Unique peptides	Sequence coverage [%]	KEGG name
125	DNMBP	Q6XZF7	12.758	1	0.6	Dynamin-binding protein
126	TRIM60	Q495X7	12.625	1	2.5	Tripartite motif-containing protein 60
127	CMPK1	P30085	12.471	1	6.6	Pyrimidine metabolism
128	PMS1	P54277	12.294	2	3.1	DNA mismatch repair protein PMS1
129	IQGAP2	Q13576	12.169	1	2	Regulation of the actin cytoskeleton
130	SF3A2	Q15428	12.152	1	3	Spliceosome
131	Zinc finger protein 415	Q09FC8-4	12.102	1	2	Transcription factor
132	PSMC6	P62333	11.707	3	10.3	Proteasome
133	HIST1H2BL	Q99880	11.464	1	7.1	Systemic lupus erythaematosus
134	TNFRSF10B	O14763	11.328	1	2.4	Apoptosis; cytokine-cytokine receptor interaction
135	Cdc42EP4	Q9H3Q1	11.255	5	18.8	Septin cytoskeleton regulation
136	FTH1	P02794	11.154	2	9.3	Metabolism
137	GIT1	Q9Y2X7	10.849	7	15.5	Regulation of the actin cytoskeleton
138	SUMO2;SUMO4;SUMO3	P61956;Q6EEV6;P55854	10.58	2	31	RNA transport
139	PSME3	P61289	6.097	2	10.2	Proteasome
140	ATP5J2	P56134	5.533	1	26.5	Oxidative phosphorylation
141	VASP	P50552	4.816	3	6.3	Focal adhesion
<b>142</b>	<b>COPG1;COPG2</b>	<b>Q9Y678;Q9UBF2</b>	<b>3.69</b>	<b>2</b>	<b>2.5</b>	<b>Coatomer protein complex subunit gamma 1 and 2</b>
143	TRIM28	Q13263	2.652	2	2.6	Metabolism
144	U2AF2	P26368	2.342	2	7.2	Spliceosome
145	ARG1	P05089	2.268	1	4.7	Metabolism
146	EHD1;EHD3;EHD4	Q9H4M9;Q9NZN3;Q9H223	1.638	1	1.7	Endocytosis
147	PICALM	Q13492	1.557	1	2.5	Endocytosis
148	ANAPC13	Q9BS18	1.305	1	13.5	Cell cycle; ubiquitin-mediated proteolysis
149	GSTM5	P46439	1.282	0	29.4	Metabolism

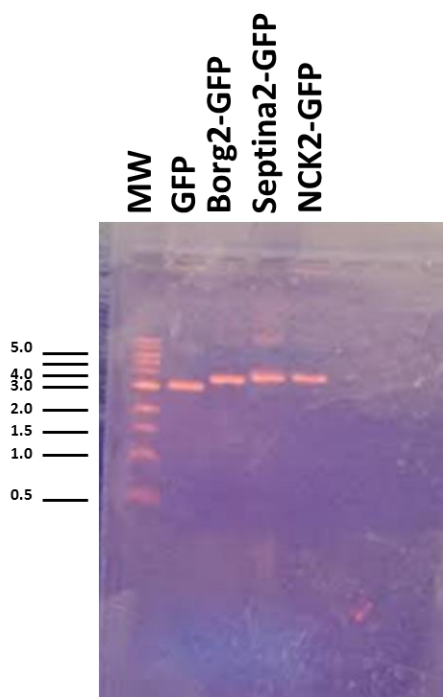
### APÊNDICE 3

HeLa 5min (-K)		HeLa 48h (-K)		MRC5 5min (-K)		MRC5 48h (-K)	
Uniprot Name	Protein ID	Uniprot Name	Protein ID	Uniprot Name	Protein ID	Uniprot Name	Protein ID
ADRM1_HUMAN	Q16186	2AAA_HUMAN	P30153	1433F_HUMAN	Q04917	ATIF1_HUMAN	Q9UII2
ATPG_HUMAN	P36542	ARGI1_HUMAN	P05089	ALDR_HUMAN	P15121	CING_HUMAN	Q9P2M7
BORG2_HUMAN	Q9UKI2	BORG2_HUMAN	Q9UKI2	APEX1_HUMAN	P27695	CPSF5_HUMAN	O43809
COPG_HUMAN	Q9Y678	CALL5_HUMAN	Q9NZT1	BAP31_HUMAN	P51572	DSG1_HUMAN	Q02413
COPG2_HUMAN	Q9UBF2	CASPE_HUMAN	P31944	CDC5L_HUMAN	Q99459	DYL1_HUMAN	P63167
DIAP1_HUMAN	O60610	COPG_HUMAN	Q9Y678	CING_HUMAN	Q9P2M7	DYL2_HUMAN	Q96FJ2
IQGA2_HUMAN	Q13576	COPG2_HUMAN	Q9UBF2	CNBP_HUMAN	P62633	GRB2_HUMAN	P62993
MARE1_HUMAN	Q15691	DNMBP_HUMAN	Q6XZF7	CUL4A_HUMAN	Q13619	H15_HUMAN	P16401
PCNP_HUMAN	Q8WW12	GIT2_HUMAN	Q14161	CUL4B_HUMAN	Q13620	IF1AX_HUMAN	P47813
SF3A2_HUMAN	Q15428	IF2B1_HUMAN	Q9NZI8	DYR_HUMAN	P00374	IF1AY_HUMAN	O14602
VASP_HUMAN	P50552	IQGA2_HUMAN	Q13576	ECHB_HUMAN	P55084	MATR3_HUMAN	P43243
		LEG7_HUMAN	P47929	EDC4_HUMAN	Q6P2E9	MCM7_HUMAN	P33993
		MRP_HUMAN	P49006	EHD4_HUMAN	Q9H223	PAI2_HUMAN	P05120
		MYO1C_HUMAN	O00159	EIF3F_HUMAN	O00303	PHB2_HUMAN	Q99623
		PABP4_HUMAN	Q13310	GRWD1_HUMAN	Q9BQ67	PSIP1_HUMAN	O75475
		PHB2_HUMAN	Q99623	HLAG_HUMAN	P17693	RO60_HUMAN	P10155
		SPB3_HUMAN	P29508	LYSC_HUMAN	P61626	SFRS1_HUMAN	Q07955
		SYAC_HUMAN	P49588	MATR3_HUMAN	P43243	STAU1_HUMAN	O95793
		SYRC_HUMAN	P54136	MCA3_HUMAN	O43324	SYLC_HUMAN	Q9P2J5
				MCM7_HUMAN	P33993	TMEDA_HUMAN	P49755
				NPL4_HUMAN	Q8TAT6	ZN622_HUMAN	Q96953
				P3H1_HUMAN	Q32P28		
				P53_HUMAN	P04637		
				PSD12_HUMAN	O00232		
				PSMD3_HUMAN	O43242		
				PXDN_HUMAN	Q92626		
				SMC2_HUMAN	O95347		
				SNAA_HUMAN	P54920		
				SNAB_HUMAN	Q9H115		
				TBB3_HUMAN	Q13509		
				TMEDA_HUMAN	P49755		
				TRIO_HUMAN	O75962		
				TYSY_HUMAN	P04818		
				VIGLN_HUMAN	Q00341		

**Figura 32 - Conjunto de proteínas exclusivamente detectadas nas amostras de HeLa ou MRC5 tratadas com radiação UVC.** Foram combinadas as proteínas identificadas com as iscas Cdc42-WT e Cdc42-G12V, excluindo-se as proteínas detectadas nos respectivos controles negativos (lisados não tratados) e proteínas ainda não depositadas em bases de dado de interação proteína-proteína.

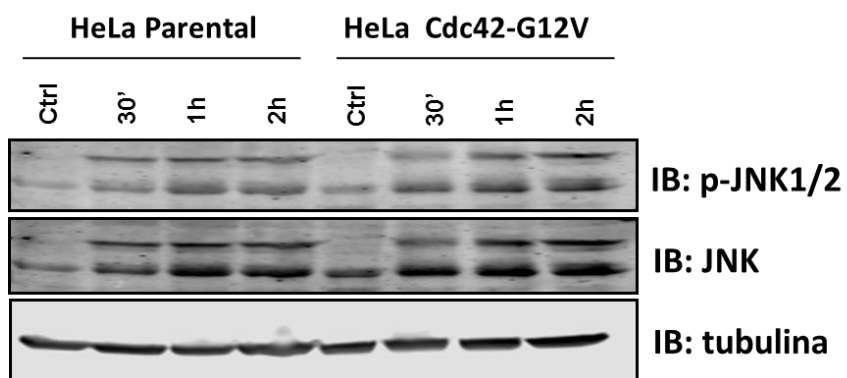


## APÊNDICE 4



**Figura 33 - Eletroforese em gel de agarose para as construções GFP, Borg2-GFP, Septina2-GFP e NCK2-GFP.** O gel foi preparado em porcentagem de 0,9% de agarose em tampão TBE 1x, sendo a corrida realizada sob voltagem constante de 60 V ao longo de 1h15min. 400 µg de plasmídeo de cada construção foram aplicados no gel. Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídeo por 1h e descorado em tampão TBE por 15 minutos. A revelação foi feita em transiluminador UV.

## APÊNDICE 5



**Figura 34 – Padrão de fosforilação para a proteína JNK1/2.** As linhagens foram tratadas com 10 J/m<sup>2</sup> de radiação UVC e as células coletadas após os tempos indicados. As amostras foram quantificadas e 100 µg de proteína total aplicados na corrida eletroforética. O Western blotting foi realizado de acordo com o descrito no item 4.6 da seção de materiais e métodos.

## **ANEXOS - SÚMULA CURRICULAR**

### **1. DADOS PESSOAIS**

Nome: Luiz Eduardo da Silva

Local e data de nascimento: Joinville-SC, 07/10/1990

### **2. EDUCAÇÃO**

- Mestrado em andamento em Ciências Biológicas (Bioquímica)  
Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2017-atual.
- Graduação em Farmácia com período sanduíche na St. John's University,  
NY/EUA.  
Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2011-2016.

### **3. FORMAÇÃO COMPLEMENTAR**

- Análise e processamento de imagens usando ImageJ. (Carga horária: 4h).  
Sociedade Brasileira de Biologia Celular, SBBC, Brasil. 2018 - 2018
- Animais de Laboratório e Pesquisa Experimental. (Carga horária: 20h).  
Universidade de São Paulo, USP, Brasil. 2018 - 2018
- Análise de DNA em Softwares. (Carga horária: 5h).  
Núcleo de Aprimoramento Científico, NAC, Brasil. 2017 - 2017
- Workshop on Phage Display. (Carga horária: 8h).  
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

### **4. OCUPAÇÃO**

- Bolsista de Mestrado CAPES/Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas  
(Bioquímica), USP, 2017-2019.
- Bolsista de Graduação Sanduíche CAPES/Ciência sem Fronteiras, UFPR, 2014-  
2015.
- Bolsista de Iniciação Científica Fundação Araucária-Paraná, UFPR, 2012-2014.

### **5. RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS**

**Silva, Luiz E.**; SOUZA, R. C. ; Forti, Fábio L. . Non-Canonical Role of Cdc42 GTPase and its Novel Interaction Partners in Genomic Instability Conditions. In: 48th

Annual Meeting of Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology, 2019, Águas de Lindóia.

**Silva, Luiz E.;** Souza, R. C. ; Kitano, E. S. ; Monteiro, L. F. ; Iwai, L. K. ; Forti, F. L. Search for novel players of Cdc42 GTPase pathway in genomic instability. In: XIX Congress of the Brazilian Society for Cell Biology, 2018, São Paulo.

**Silva, Luiz E.;** Monteiro, L. F. ; Iwai, L. K. ; Forti, F. L. ; Kitano, E. S. Search for novel players of Cdc42 GTPase pathway in genomic instability. In: Anais do VI Fundamental Aspects of DNA Repair and Mutagenesis, 2018.

**Silva, Luiz E.;** Riechi, N. S. C. ; Vendramin, M. E. ; Jasisnki, V. C. G. ; Barison, A.; Pontarolo, R. ; Campos, F. R. . Identificação de isodesacetiluaricina em subfração de folhas de *Annona rugulosa* por espectrometria de massas sequencial EM<sup>n</sup>. In: XII Jornada Farmacêutica e VI Mostra Acadêmica Integrada do Curso de Farmácia da UFPR, 2013, Curitiba. XII Jornada Farmacêutica e VI Mostra Acadêmica Integrada do Curso de Farmácia da UFPR, 2013.

**Silva, Luiz E.;** Riechi, N.S.C.; Vendramin, M.E.; Jasisnki, V.C.G.; Barison, A.; Pontarolo, R.; Campos, F.R. Identificação de acetogeninas diretamente em extratos e frações de espécies de Annonaceae através de LC-ESI-MSn. In: 5ª Semana Integrada de Ensino, Pesquisa e Extensão- 21º Encontro de Iniciação Científica da UFPR, 2013, Curitiba.

Campos, F.R.; **Silva, Luiz E.;** Jasisnki, V.C.G.; Pontarolo, R.; Barison, A; Vendramin, M. E. Screening for Annonaceous acetogenins in crude fractions from the leaves of *Annona rugulosa* by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. In: 5 Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas- BrMass, 2013, Campinas.

## 6. PUBLICAÇÕES

**Silva, L.E.;** Souza, R.; Kitano, E.; Monteiro, L.; Iwai, L.; Forti, F.L. Proteomic and interactome approaches reveal PAK4, PHB-2 and 14-3-3 $\eta$  as targets of the overactivated Cdc42 in cellular responses to genomic instability. *Journal of Proteome Research*, v. 18, n. 10, p. 3597-3614, **2019**.

**Silva, L.E.;** Forti, F.L. The Cdc42 Signaling Pathway and Genomic Stability in Diseases. Chapter XX. In: CDC42: Structure, Functions and Role in Disease, Nova publishers, (aceito para publicação, **2020**).

Russo, Lilian C. ; Minaya, Pault Y. ; **Silva, Luiz E.;** Forti, Fábio L. Assessing the Roles of Rho GTPases in Cell DNA Repair by the Nucleotide Excision Repair Pathway. *Methods in Molecular Biology*. 1ed.: Springer New York, **2018**, v. 1821, p. 319-338.

Campos, F.R. ; Bressan, J.; Godoy, V. C.J.; Zuccolotto, T.; **Da Silva, L.E.;** Cerqueira, L.B. (Asteraceae): Chemical Constituents and Biological Activities. *Chemistry & Biodiversity* (Print), **2016**, v. 13, p. 1-17.