

**Papel da ribonucleoproteína heterogênea nuclear K no reparo
de DNA em célula epidermóide oral**

Ana Júlia Rossoni Carvalho

**Ribeirão Preto
2023**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Papel da ribonucleoproteína heterogênea nuclear K no reparo de DNA em célula
epidermóide oral**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências
e Biotecnologia da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto para
obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Imunologia e
Fisiopatologia

Orientado(a): Ana Júlia Rossoni Carvalho

Orientador(a): Andreia Machado Leopoldino

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em 24/05/2023. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2023

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.

Carvalho, Ana Júlia Rossoni

Papel da ribonucleoproteína heterogênea nuclear K no reparo de DNA em célula epidermóide oral. Ribeirão Preto, 2023.

65 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências e Biotecnologia.

Orientador: Leopoldino, Andreia Machado.

1. hnRNP K 2. Câncer de cabeça e pescoço. 3. Reparo de erro de pareamento de bases. 4. Mitocôndria.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Ana Júlia Rossoni Carvalho

Título do trabalho: Papel da ribonucleoproteína heterogênea nuclear K no reparo de DNA em célula epidermóide oral

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Imunologia e Fisiopatologia

Orientador(a): Prof. Dra. Andreia Machado Leopoldino

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Aos meus pais, por me darem todas as ferramentas para eu explorar o mundo.

Agradecimentos

Aos meus pais, minha mãe Sandra e meu pai Agnaldo, por sempre estarem ao meu lado, me incentivando a explorar e experimentar o mundo desde o começo. À minha irmã Letícia pela convivência compartilhada esses anos todos juntas em Ribeirão Preto.

À minha família, de São Paulo e Goiás, que são meus grandes propulsores e que me fazem sempre seguir em frente, caminhando com a certeza de que sou apoiada por eles.

À querida professora Andréia, por todos os momentos de paciência e aprendizado que tive ao seu lado. Uma pessoa incrível que sempre buscou um balanço entre o bem-estar e trabalho de seus alunos, e um exemplo de ética e pesquisa que levarei para toda a minha vida.

À indescritível técnica Cristiana, por ter me iniciado nessa caminhada e que no meio do caminho tornou-se mais do que uma colega, mas sim uma irmã para mim. Por todos os momentos vividos, todas as risadas, confidências e histórias compartilhadas.

À todo o grupo do laboratório, que já se foram e que ainda estão lá: Lucas, Gabriel, Samara, Thaís, Pablo, Laís, Fernanda, Raquel, Andrea, Tati, Gabriela e Laura. Por todos os momentos vividos dentro do laboratório, que faziam trabalhar ser muito mais leve, e me garantiu amizades para toda a vida.

Ao grupo do prof. Sérgio Akira, em especial ao Emerson e Juliana, por me auxiliarem em diferentes experimentos e estarem sempre disponíveis. E ao prof. Sérgio Akira, por disponibilizar o espaço físico para que meus experimentos se completassem.

Aos meus amigos de fora da USP, Marina, Maycon, Thaís e Viviana, que são meu porto-seguro em toda a adversidade, desde a graduação. A minhas amigas Isabella, Isabelly e Nayme, que mesmo longe estão sempre perto, independente do tempo que tomemos para nos falar. A Luíza, que me faz rir nos momentos mais inoportunos, e a Mariana, que é o meu segundo porto-seguro e a pessoa que mais me entende no mundo.

À todos os funcionários e professores da pós-graduação em Biociências e Biotecnologia, por suas contribuições diretas e indiretas e por todos os debates levantados em disciplinas ou fora delas.

À Fapesp, pelo auxílio financeiro à pesquisa (#2016/19103-2) e pela bolsa de mestrado (#2019/16914-8).

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“To live in harmony with nature, we must know how to sing the same song as nature. To do that, we must understand nature. Good intentions aren’t enough. Science might be – if we use it wisely.”
— Terry Pratchett, *The Science of Discworld*

RESUMO

CARVALHO, A.J. R. **Papel da ribonucleoproteína heterogênea nuclear K no reparo de DNA em célula epidermóide oral.** 2023. 65f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

O aumento nos níveis da proteína ribonucleoproteína heterogênea K (hnRNP K) foi descrito em diversos tipos de câncer e associado ao pior prognóstico, incluindo o câncer oral. Esta proteína liga-se ao RNA e DNA e participa de diversas interações regulatórias proteína-proteína, sendo encontrada no núcleo, citoplasma e mitocôndrias. A proteína hnRNP K é alvo de diferentes modificações pós-traducionais como metilação e fosforilação, regulando sua interação com outras proteínas e sua localização subcelular, permitindo que ela participe de diferentes mecanismos de regulação gênica. O objetivo deste trabalho foi estudar a potencial função de hnRNP K no reparo de erro de pareamento de bases por meio de sua relação com a proteína YB1, importante para este sistema de reparo na mitocôndria. As linhagens celulares utilizadas foram de queratinócitos orais não tumorais com superexpressão ou redução da hnRNP K expostas ou não a tratamentos com metotrexato (que causam danos oxidativos no DNA) e U0126 (um inibidor de fosforilação capaz de inibir a fosforilação de hnRNP K e seu consequente transporte para o citoplasma). Por meio de análises de frações proteicas mitocondriais, nucleares e total por *Western blot*, e por imunofluorescência, evidenciou-se que o acúmulo de hnRNP K no núcleo leva ao aumento dos níveis de p53 e de YB1 na mitocôndria. Ensaio de mobilidade de mudança eletroforética de oligômeros contendo na sequência erro de pareamento de bases e inserções com os extratos proteicos mitocondriais e nucleares mostraram que as células superexpressando hnRNP K reduzem o reparo de erro de pareamento de bases mitocondrial. Por outro lado, ensaios de cometa mostraram que a superexpressão de hnRNP K em células expostas a danos oxidativos por metotrexato possuem um efeito protetor nas células. Desta maneira, a proteína hnRNP K possui um efeito negativo neste sistema de reparo do DNA mitocondrial, porém favorece a resistência à morte celular e regula indiretamente o sistema de reparo de erro de pareamento de bases, podendo também atuar por outros mecanismos, tais como a reprogramação metabólica e redução do estresse oxidativo.

Palavras-chave: hnRNP K, reparo de DNA, câncer de cabeça e pescoço, mitocôndria.

ABSTRACT

CARVALHO, A.J. R. **Role of heterogeneous ribonucleoprotein K in DNA repair in oral epidermoid cells.** 2023. 65f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Higher levels of the heterogeneous ribonucleoprotein K (hnRNP K) has been described in different types of cancer and is associated with worse a prognosis, including in oral cancers. This protein binds itself to RNA and DNA, participating in different protein-protein regulatory activities, and can be found in the nucleus, cytoplasm and mitochondria. HnRNP K is the target for different post-translational changes, such as methylation and phosphorylation, which regulate its interactions with other proteins and its subcellular localization, allowing hnRNP K to participate in different genomic regulation mechanisms. The aim of this study was to study hnRNP K's potential role in the mismatch repair system by its interaction with YB1, an important protein for the mitochondrial mismatch repair. We used normal oral keratinocytes cell lines (NOK-SI) with overexpression or lower levels of hnRNP K with or without treatment of methotrexate (which causes oxidating DNA damages) and U0126 (a phosphorylation inhibitor capable of inhibiting hnRNP K's phosphorylation and its subsequent translocation to the cytoplasm). Protein fraction analysis of mitochondrial, nucleus and whole cell lysates through western blot and immunofluorescence have shown that higher hnRNP K levels in the nucleus increases the levels of p53, as well as YB1 in the mitochondria. Electrophoretic mobility shift assays of oligomer sequences containing a mismatch or insertion with mitochondrial and nuclear protein fractions show hnRNP K overexpressing cells decreasing the mismatch repair in the mitochondria. On the other hand, comet assays show that hnRNP K overexpression in cells exposed to oxidative damages caused by methotrexate has a protective effect in the cells. HnRNP K, therefore, has a negative effect in the mismatch repair system of mitochondrial DNA, but favors cell death resistance, indirectly regulating the mismatch repair system, which can lead to hnRNP K protecting the cell by other means, such as metabolic reprogramming and lower levels of oxidating stress.

Keywords: hnRNP K, DNA repair, head and neck cancer, mitochondria.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Superexpressão da proteína hnRNP K em células NOK-SI..... | 20 |
| Figura 2. Supressão da proteína hnRNP K em células NOK-SI..... | 21 |
| Figura 3. Imunofluorescência das células NOK-SI superexpressando hnRNP K | 22 |
| Figura 4. Imunofluorescência das células NOK-SI superexpressando hnRNP K | 23 |
| Figura 5. Imunofluorescência das células NOK-SI superexpressando hnRNP K | 24 |
| Figura 6. Ensaio de mobilidade eletroforética (EMSA) de extratos protéicos de células NOK-SI superexpressando hnRNP K tratadas com metotrexato e inibidor de fosforilação U0126..... | 25 |
| Figura 7. Ensaio de mobilidade eletroforética (EMSA) de extratos protéicos de células NOK-SI com supressão de hnRNP K tratadas com metotrexato e inibidor de fosforilação U0126..... | 26 |
| Figura 8. Ensaio de Cometa em células NOK-SI superexpressando hnRNP K.. | 28 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Lista de anticorpos utilizados no trabalho e suas respectivas diluições | 14 |
|--|----|

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------|---|
| BER | Reparo por excisão de bases (<i>base excision repair</i>) |
| cDNA | Ácido desozirribonucleico complementar |
| °C | Graus Celcius |
| CT | Citosina/timina |
| ERO | Espécies reativas de oxigênio |
| DMEM | Meio de Eagle modificado por Dubelcco |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DTT | Ditiotreitol |
| ERK | Quinase regulada por sinais extracelulares |
| hnRNP | Ribonucleoproteína heterogênea nuclear |
| HR | Recombinação homóloga (<i>homologous recombination</i>) |
| JNK | Quinase amino-terminal c-Jun |
| kDa | Quilodalton |
| KH | Domínio homólogo K |
| KI | Domínio de interação proteica |
| lncRNA | RNA longo não codificante |
| M | Molar |
| mA | Miliampere |
| MAPK | Proteína quinase ativada por mitogênio |
| mg | Miligrama |
| miRNA | microRNA |
| mL | Mililitro |
| mm | Milímetro |
| MMR | Reparo de erro de pareamento de bases (<i>mismatch repair</i>) |
| mRNA | RNA mensageiro |
| mtDNA | DNA mitocondrial |
| NHEJ | União de extremidade não homóloga (<i>non-homologous end joining</i>) |
| NLS | Sinal de localização nuclear |
| NOK-SI | Queratinócito oral não-tumoral espontaneamente imortalizado |
| NSK | Domínio de transporte nuclear K |
| PBS | Tampão fosfato-salino |

| | |
|----------|---|
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| Pmol | Picomol |
| POLy | Polimerase γ |
| PRMT | Proteínas metil transferases |
| PVDF | Fluoreto de polivinilideno |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| RNP | Ribonucleoproteína |
| SDS | Dodecil sulfato de sódio |
| SDS-PAGE | Gel de poliacrilamida com SDS |
| SFB | Soro fetal bovino |
| shRNA | <i>Short-hairpin</i> RNA |
| SUMO | Modificador pequeno semelhante à ubiquitina |
| TBP | Proteína ligante de TATA box |
| TBS | Solução salina tamponada de Tris |
| TRAIL | Ligante indutor de apoptose associado ao fator de necrose tumoral |
| V | Volts |
| YB1 | Fator de transcrição Y-box 1 |
| μ g | Micrograma |
| μ L | Microlitro |

SUMÁRIO

| | |
|---|---------------|
| Resumo..... | i |
| Abstract..... | ii |
| Lista de figuras..... | iii |
| Lista de tabelas..... | iv |
| Lista de abreviaturas e siglas..... | v |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1 Câncer de Cabeça e Pescoço..... | 1 |
| 1.2 Ribonucleoproteína heterogênea nuclear K (hnRNP K)..... | 2 |
| 1.3 HnRNP K e Câncer..... | 5 |
| 1.4 Mitocôndria e o Reparo de DNA..... | 7 |
| 2. OBJETIVOS..... | 12 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 13 |
| 3.1 Cultura celular..... | 13 |
| 3.2 Regulação da expressão gênica de hnRNP K..... | 13 |
| 3.3 Western blot..... | 13 |
| 3.4 Extração protéica..... | 15 |
| 3.5 Análise de interação proteína-DNA por EMSA..... | 15 |
| 3.5.1 Oligômeros de DNA de interesse..... | 16 |
| 3.6 Inibição da fosforilação de hnRNP K..... | 16 |
| 3.7 Indução de dano no DNA por meio de metotrexato..... | 16 |
| 3.8 Imunofluorescência..... | 17 |
| 3.9 Ensaio de Cometa..... | 17 |
| 3.10 Análise de dados..... | 18 |
| 4. RESULTADOS..... | 19 |
| 4.1 Alteração nos níveis da proteína hnRNP K em células NOK-SI..... | 19 |
| 4.2 Ensaio de mobilidade eletroforética (EMSA assay)..... | 23 |
| 4.3 Ensaio de Cometa..... | 27 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 29 |
| 6. CONCLUSÕES..... | 33 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 34 |

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de cabeça e pescoço

O câncer de cabeça e pescoço se refere a um grupo de neoplasias que afetam o trato aerodigestivo superior, tais como a cavidade oral, orofaringe, nasofaringe e laringe. A prevalência deste tipo de câncer varia entre países e regiões no mundo, sendo o sexto tipo de câncer mais comum, com cerca de 890 mil novos casos e 450 mil mortes em 2018 (AL-ZALABANI, 2020; FERLAY et al., 2019; JOHNSON et al., 2020). No Brasil o câncer de cabeça e pescoço também é um dos mais prevalentes, estimando-se cerca de 11.180 casos em homens e 4.010 casos em mulheres, sendo o quinto câncer mais prevalente em homens (Ministério da Saúde, 2019).

O câncer de cabeça e pescoço quando diagnosticado precocemente, o paciente apresenta um bom prognóstico. Por outro lado, em geral, os pacientes tem diagnóstico tardio levando ao pior prognóstico e alta taxa de mortalidade. O tratamento de escolha é, predominantemente, a ressecção cirúrgica, aplicando-se uma combinação desta com a radioterapia e a quimioterapia (CRAMER et al., 2019). Cabe ressaltar que em casos mais avançados e com tumores que acometem diversos sítios anatômicos a cirurgia não é indicada ou o paciente escolhe por não tratar.

Os fatores de risco para o câncer de cabeça e pescoço estão associados com o consumo de tabaco e álcool (COHEN; FEDEWA; CHEN, 2018; DAL MASO et al., 2016; SUNG et al., 2021), assim como infecções pelo papiloma vírus humano (HPV) (MEHANNA et al., 2013; MICHAUD et al., 2014).

O câncer pode ser considerado como um desvio da sinalização celular normal, levando a um estado celular desregulado, que resulta na exacerbação da proliferação celular de forma crônica. Em condições de normalidade celular, há um fino controle da produção e liberação de sinais de promoção do crescimento celular, levando à progressão do ciclo celular como o conhecemos e divisão. Por meio desse controle do crescimento celular, há a manutenção da homeostase celular, num balanço constante entre as células em proliferação e as células levadas à senescência e morte celular (HANAHAN, 2022).

Células malignas, por sua vez, acabam por desregular esses sinais, multiplicando-se irrestritamente e desenvolvendo-se em tal capacidade que são capazes de evadir a senescência e morte celular. Essas células efetuam uma série de mudanças no microambiente celular, alterando não só a si mesmas como também

o ambiente ao seu redor. Células cancerosas adquirem não só evasão à apoptose e senescência celulares, como são também capazes de manter a sinalização de proliferação celular de forma crônica enquanto evadem supressores de crescimento celular. Concomitantemente, são capazes de evadir a destruição dessas células pelo sistema imune ao mesmo tempo que promovem inflamação da área tumoral, além de induzir o crescimento de uma rede vascular capaz de suprir essas células em crescimento com oxigênio e nutrientes. Não só isso, mas há um aumento da plasticidade celular, o desenvolvimento de microbiomas polimórficos, desregulação no metabolismo celular e capacidade de migrar de seu sítio original, invadindo tecidos circundantes e promovendo metástase em locais anatomicamente distantes. Todas essas mudanças são resultado do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas que as células sofrem em um conjunto de genes, oncogenes e genes supressores tumorais, que quando alterados promovem o crescimento tumoral (HANAHAHAN, 2022).

O desenvolvimento de cânceres de cabeça e pescoço associam-se assim não só a um aumento da quantidade e/ou atividade de determinadas moléculas, como também a uma desregulação de diferentes genes associados a esse tipo particular de câncer. Análises de sequências de DNA e RNA em larga escala a partir de amostras de câncer de cabeça e pescoço revelaram diferentes alterações, incluindo *TP53*, *CASP8*, *FAT1*, *NOTCH1* e *PI3K* (LUI et al., 2013; PICKERING et al., 2013; THE CANCER GENOME ATLAS NETWORK, 2015). Dentre as diversas alterações de proteínas e com base em resultados prévios do nosso grupo de pesquisa, selecionamos a hnRNP K para estudos funcionais utilizando modelos in vitro com linhagens celulares de CEO.

1.2 Ribonucleoproteína heterogênea nuclear K (hnRNP K)

As ribonucleoproteínas heterogêneas nucleares fazem parte de uma família de ribonucleoproteínas capazes de se ligar ao RNA, atuando de maneira importante no metabolismo de ácidos nucleicos, incluindo no *splicing alternativo*, estabilização de RNAs mensageiros (mRNAs), assim como na regulação da tradução e transcrição de RNAs (CHOI et al., 1986; DREYFUSS et al., 1993). Essa família possui pelo menos vinte proteínas, localizando-se no citoplasma, núcleo e mitocôndria, e a desregulação dessas proteínas está associada à muitas doenças, incluindo glioblastoma, câncer de pulmão, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer de próstata, câncer

gastrointestinal e câncer de cabeça e pescoço (BARBORO et al., 2009; CHEN et al., 2017, 2022; FEI et al., 2017; PARK et al., 2012; RYU et al., 2021; WANG et al., 2018; YANG et al., 2016; YU et al., 2015).

Dentre as hnRNPs mais estudadas está a ribonucleoproteína heterogênea nuclear K (hnRNP K). Ela é uma proteína de cerca de 65 quilodaltons (kDa), localizada em múltiplos compartimentos subcelulares como núcleo, citoplasma e mitocôndria, e possui papel central em diversos processos celulares como regulação da expressão gênica e transdução da sinalização celular (BOMSZTYK; DENISENKO; OSTROWSKI, 2004).

A hnRNP K possui três isoformas produzidas por meio de *splicing* alternativo (LEOPOLDINO et al., 2007), conservando-se em sua estrutura três domínios homólogos K (KH) (DEJGAARD; LEFFERS, 1996; SIOMI et al., 1993), responsáveis pela ligação de hnRNP K com RNA e DNA, além de uma estrutura única encontrada na hnRNP K, conhecida como domínio de interação proteica (KI) (MAKEYEV; LIEBHABER, 2002), que atua como um sítio de interação entre a hnRNP K e outras proteínas (HOBERT et al., 1994; OSTARECK-LEDERER et al., 2002). Como as outras proteínas de sua família, a hnRNP K também possui um sinal de localização nuclear (NLS) além do domínio de transporte nuclear K (KNS), permitindo o movimento bidirecional da hnRNP K pela membrana nuclear; o NLS também garante a estabilidade proteica de hnRNP K (HUTCHINS; BELROSE; SZARO, 2016; MICHAEL; EDER; DREYFUSS, 1997).

Com essa estrutura, a hnRNP K é capaz de se ligar a transcritos de RNA ou promotores de DNA para influenciar sua estabilidade e até mesmo sua transcrição e/ou tradução. A hnRNP K tem como alvo genes como *c-Src*, *c-Myc*, *p21*, *eIF4E* e *UCP2*, por exemplo, com estes genes sendo responsáveis pela proliferação celular, apoptose e diferenciação celular (NAARMANN-DE VRIES et al., 2013; SUK et al., 2015; XIAO et al., 2013). Além de se ligar a genes específicos, a hnRNP K também é capaz de regular as funções de microRNAs (miRNAs) e RNAs longos não codificantes (lncRNAs) (FAN et al., 2015; QIN et al., 2020; SHIN et al., 2017; XIA et al., 2022). Essas interações só são alcançadas, porém, pelas modificações pós-traducionais que a hnRNP K sofre, como fosforilação, metilação, ubiquitinação e sumoilação.

A metilação de arginina em proteínas é uma das modificações pós-traducionais mais frequentes, regulando processos como *splicing* de RNA, interações proteicas, transporte nuclear/citoplasmático, transcrição e tradução (BEDFORD; CLARKE,

2009). Proteínas metil transferases (PRMTs) são responsáveis pela metilação desses resíduos de arginina, e a PRMT1 tem como um de seus alvos a hnRNP K (TANG et al., 2000). A metilação da hnRNP K por PRMT1 altera a função dela, alterando suas interações com p53 e c-Src, por exemplo (CHEN et al., 2008a; OSTARECK-LEDERER et al., 2006). No primeiro caso, a metilação de hnRNP K aumenta a afinidade dela pela p53, levando ao aumento da atividade desta em resposta à danos de luz ultravioleta (UV), e a resposta ao dano (CHEN et al., 2008a). Essa metilação também é responsável pela supressão da interação de domínios ricos em prolina presentes na estrutura da hnRNP K com os domínios SH3 de c-Src, levando à sua ativação que é capaz de catalisar a fosforilação de resíduos de tirosina de hnRNP K, culminando no fim da inibição de tradução de mRNAs por hnRNP K (OSTARECK-LEDERER et al., 2006).

A ubiquitinação de hnRNP K leva à inibição de respostas transcricionais ao dano de material genético, sendo essa ubiquitinação realizada por HDM2/MDM2 (ENGE et al., 2009; MOUMEN et al., 2005). Diante de dano no DNA, a desubiquitinação de p53 e hnRNP K ocorre com ATM regulando a estabilidade de hnRNP K para que ela possa atuar como um co-fator de p53, e com ATM/ATR promovendo a fosforilação de p53 para que ela possa realizar a ativação transcricional de genes associados ao ciclo celular e genes pró-apoptóticos por p53 (MOUMEN et al., 2005(YANG et al., 2004). A sumoilação de hnRNP K se dá não pela conjugação de uma ubiquitina, mas de um modificador pequeno semelhante à ubiquitina (*small ubiquitin-like modifier*, SUMO), tendo um papel importante na regulação do metabolismo de RNA em níveis transcricionais e pós-transcricionais, com a sumoilação de hnRNP K atuando positivamente na regulação da expressão de c-Myc a nível traducional, auxiliando na proliferação celular (SUK et al., 2015). Dano no DNA também ativa a sumoilação de hnRNP K, aumentando sua interação com p53 e promovendo aumento do reparo de DNA (QIN et al., 2020).

Dentre todas as modificações pós-traducionais que ocorrem na hnRNP K, a fosforilação é a mais estudada. A hnRNP K possui em sua estrutura cerca de 31 resíduos de serina, 24 resíduos de treonina e 17 resíduos de tirosina, dando a essa proteína uma grande capacidade de atuação em diferentes processos biológicos. A hnRNP K é alvo das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK), como a quinase regulada por sinais extracelulares (ERK), a quinase amino-terminal c-Jun (JNK) e p38. As proteínas ERK e JNK são capazes de fosforilar a hnRNP K em seus

resíduos de serina 116, 189, 216, 284 e 353 (HABELHAH et al., 2001a, 2001b; KIMURA et al., 2010; KWIEK et al., 2006), sendo a ERK alvo de fosforilação de proteínas MEK, que ativam sua cascata de sinalização (LAVOIE; GAGNON; THERRIEN, 2020).

A ERK é responsável pela fosforilação dos resíduos S284 e S353 da hnRNP K, levando à sua translocação do núcleo para o citoplasma, o que influencia o envolvimento da hnRNP K na tradução (HABELHAH et al., 2001a). A fosforilação do resíduo S353 também é responsável pela transativação de hnRNP K, aumentando a estabilidade desta com transcritos (CHAN et al., 2008; CHEN et al., 2009). Esse acúmulo de hnRNP K por meio da fosforilação desses resíduos por ERK é observado em diferentes tipos de câncer, elevando a resistência à apoptose seja por meio da antagonização da apoptose mediada pelo ligante indutor de apoptose associado ao fator de necrose tumoral (TRAIL) em câncer de pulmão e regulando a tradução e consequente aumento da proliferação e potencial oncogênico (CHEN et al., 2009; EDER et al., 2015; GAO et al., 2016; NOTARI et al., 2006; SI et al., 2017). Essa ativação de ERK leva à subsequente regulação do processo de tradução pelos mRNAs de *r15-LOX*, *c-Src*, *UCP2* e *c-Myc* (BARBORO; FERRARI; BALBI, 2014; LIEPELT et al., 2014; NAARMANN et al., 2008; NOTARI et al., 2006). Com a translocação de hnRNP K para o citoplasma, seus níveis no núcleo se reduzem, de forma que suas atividades na regulação da transcrição de genes também se alteram, com a hnRNP K sendo recrutada pela resposta à mitógenos ao gene *EGR-1*, por exemplo, auxiliando no *splicing* de seu transcrito, assim como sua estabilidade e transporte para o citoplasma (MIKULA; BOMSZTYK, 2011).

A hnRNP K não só é fosforilada por ERKs, que são ativadas por mitógenos, ela também é fosforilada por JNK por meio de outros estressores celulares. Enquanto as ERKs focam sua fosforilação nos resíduos S284 e S353, as JNK fosforilam os resíduos S189, S216 e S353, não afetando sua translocação núcleo-citoplasma ou a inibição da tradução de RNA. A fosforilação mediada por JNK é responsável pelo aumento da atividade transcricional de hnRNP K, pela mediação da interação dessa proteína com RNAs alvo, e aumentando sua afinidade com outras proteínas e DNA (HABELHAH et al., 2001b; HUTCHINS; SZARO, 2013; TOMONAGA; LEVENS, 1996).

1.3 HnRNP K e Câncer

Diversos trabalhos têm demonstrado o papel da hnRNP K em diferentes tipos de câncer, como os cânceres de próstata, pulmão, fígado, colorretal, linfomas de células B, melanomas e câncer de cabeça e pescoço (BARBORO et al., 2009; CARPENTER et al., 2006; GALLARDO et al., 2019; GUO et al., 2012; LI et al., 2019; WEN et al., 2010). A atividade tumorigênica observada está associada à capacidade da hnRNP K ser capaz de aumentar a proliferação celular, capacidade de metástase, efeitos apoptóticos e potencial clonogênico (JI et al., 2020; NOTARI et al., 2006; XIA et al., 2022; YANG et al., 2022).

Como dito anteriormente, a hnRNP K é capaz de auxiliar a transcrição de alguns genes, como *c-myc* e *c-src*, por exemplo, importantes para a tumorigênese. A hnRNP K é capaz de se ligar à região promotora destes genes, aumentando a atividade transcricional destes, com altos níveis de hnRNP K regulando positivamente a transcrição desses genes tumorigênicos (MANDAL et al., 2001; MICHELOTTI et al., 1996; NAGANO et al., 2004; RITCHIE, 2003; TAKIMOTO et al., 1993).

A hnRNP K também está envolvida no bloqueio da produção da proteína pró-apoptótica Bcl-x(S), ligando-se à determinadas regiões protéicas de Bcl-x no processo de *splicing* proteico (REVIL et al., 2009). Esse dado é reforçado pela atuação da hnRNP K no *splicing* de Mcl-1, pertencente à família Bcl-2, regulando negativamente a produção de sua isoforma pró-apoptótica no câncer de mama (TYSON-CAPPER; GAUTREY, 2018).

A hnRNP K também tem importante papel atuando como co-fator de p53. A metilação de hnRNP K inibe sua interação c-Src e aumentando a interação da proteína com p53, aumentando sua atividade transcricional (CHEN et al., 2008b; OSTARECK-LEDERER et al., 2006). Diante de dano ao DNA, como um dano causado por radiação ionizante, ocorre um aumento da fosforilação de hnRNP K de maneira dependente de ATM, aumentando a estabilidade de hnRNP K e levando à sua atuação como co-fator de p53 (MOUMEN et al., 2013). A hnRNP K é também alvo da ubiquitina ligase E3 MDM2, sendo des-ubiquitilada diante de dano celular e ligando-se à p53, por meio da sinalização de ATMs ou ATRs, e levando à transcrição de genes como *14-3-3 σ* , *GADD45* e *CDKN1A* (que gera p21) (MOUMEN et al., 2005). De maneira mais recente, tem-se visto a interação de hnRNP K com RNAs longos não codificantes (lncRNAs), com a regulação de hnRNP K por meio de sumoilação como necessários para a ativação dos genes alvos de p53 por meio do aumento da interação das duas proteínas e suprimindo o câncer (PELISCH et al., 2012; QIN et al., 2020).

Dessa maneira, observa-se uma grande amplitude de funções e vias pelas quais a hnRNP K atua. É bem descrito o envolvimento da hnRNP K na tumorigênese, mas muito mais pode ser explorado a respeito dessa proteína. Muitos trabalhos têm demonstrado a interação da hnRNP K com proteínas mitocondriais, como proteínas das membranas internas e externas, assim como as proteínas chaperonas mtHSP70 e mtHSP60, capazes de levarem a hnRNP K do citoplasma para dentro da mitocôndria (MIKULA et al., 2006). A hnRNP K também é capaz de se ligar à diversos transcritos do genoma mitocondrial, estando associada à diversos processos associados a esses transcritos de RNA, auxiliando na regulação da expressão gênica mitocondrial (OSTROWSKI et al., 2002). Demonstrou-se também a função de hnRNP K como regulador de *splicing* para o gene *MRLP33*, responsável por codificar uma subunidade do ribossomo mitocondrial (LIU et al., 2018), e sabe-se que a hnRNP K interage *in vivo* com diversos RNAs nucleares e mitocondriais codificantes e não-codificantes (KLIMEK-TOMCZAK et al., 2004), integrando sinais de diversas cascatas de sinalização no núcleo, citoplasma e mitocôndria. Com base em todas essas evidências, necessita-se de um aprofundamento do conhecimento do papel da hnRNP K na mitocôndria, em especial em suas funções reguladoras.

1.4 Mitocôndria e o Reparo de DNA

As mitocôndrias são organelas presentes em células eucarióticas superiores, desempenhando amplo papel na produção de energia celular e auxiliando na manutenção da vida celular, como o crescimento celular e apoptose. Sua estrutura contendo membrana externa, um espaço intermembranoso e uma membrana interna contendo a matriz, semelhantes com alguns procariotos, além de um material genético circular de fita dupla próprio, denominado como DNA mitocondrial (mtDNA), levou à criação da teoria endossimbiótica por Lynn Margulis, onde essa organela teria sido um organismo procarioto adquirido simbioticamente por outro, dando origem às células procarióticas como as conhecemos (SAGAN, 1967). A partir dessa teoria, Martin e Müller propuseram a “teoria do hidrogênio para o primeiro eucarioto” (MARTIN; MÜLLER, 1998), sugerindo a simbiose mutualística entre uma célula Archaeon e uma alphaproteobacteria, com a célula hospedeira necessitando de hidrogênio, que seria um produto metabólico da proteobacteria.

A estrutura básica da mitocôndria é composta por duas membranas compostas de bicamadas fosfolipídicas, separadas pelo espaço intermembranar. Dentro da camada interna há a matriz mitocondrial, onde se encontram o mtDNA e ribossomos próprios da mitocôndria. A principal reação bioquímica que ocorre nesta organela é a fosforilação oxidativa, um processo biológico essencial que permite a fosforilação de ADP em ATP por meio da ATP sintase, com a liberação de energia por meio da oxidação de doadores de elétrons, catalisada pela cadeia respiratória (MITCHELL, 1961). Além da fosforilação oxidativa, a mitocôndria também é responsável por outras vias energéticas metabólicas como o ciclo do ácido tricarboxílico (ciclo de Krebs), e β -oxidação de ácidos graxos, por exemplo (PFANNER; WARSCHEID; WIEDEMANN, 2019).

Alterações nos componentes mitocondriais podem acarretar em disfunções dessas organelas, resultando em uma grande variedade de doenças, entre elas o câncer. Pensadas no início do século XX como organelas secundárias para o desenvolvimento do câncer, as mitocôndrias mostraram-se como organelas intimamente envolvidas com o processo tumorigênico, auxiliando-a por uma série de mudanças, como por exemplo o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), capazes de danificar o material genético e levam à um acúmulo de mutações oncogênicas, e defeitos na permeabilização da membrana externa mitocondrial induzida pelo processo de apoptose (SABHARWAL; SCHUMACKER, 2014), evadindo a morte celular programada por meio de sinalizações de morte (CZABOTAR et al., 2014; IZZO et al., 2016).

A mitocôndria, com seu mtDNA circular, é capaz de codificar 13 polipetídeos da cadeia respiratória e complexos da ATP sintase, RNAs transportadores e RNAs ribossomais (ATTARDI; SCHATZ, 1988). Lesões no material genético mitocondrial são frequentes, uma vez que o mtDNA é particularmente suscetível a danos por meio de espécies reativas de oxigênio (ERO), uma vez que o material genético existe em proximidade com sítios de produção de ERO na membrana mitocondrial interna (LAMBERT; BRAND, 2009). As EROs são formadas por uma série de reações metabólicas, entre elas a fosforilação oxidativa, responsável pela respiração celular, e são moléculas responsáveis pela sinalização de diferentes processos, como a apoptose (SIES; JONES, 2020).

Além disso, a replicação do mtDNA ocorre de maneira assimétrica, com uma das fitas de DNA existindo como fitas únicas por longos períodos de tempo,

proporcionando desaminação espontânea de nucleotídeos (REYES et al., 1998; TANAKA; OZAWA, 1994); e uma distribuição assimétrica de dNTPs na mitocôndria, favorecendo um acúmulo de dGTPs, leva a uma diminuição da fidelidade de replicação do DNA, aumentando a mutagênese de mtDNA (SONG et al., 2005). Estima-se que mutações no material genético mitocondrial ocorram entre 10 a 20 vezes mais que mutações no material genético nuclear (BROWN; GEORGE; WILSON, 1979; SIA, 2017).

Mutações no mtDNA foram observadas em diversos tipos de câncer, como câncer de cólon, mama, pulmão, próstata, fígado, pâncreas, rim, tireóide, cérebro e cabeça e pescoço (CHATTERJEE; MAMBO; SIDRANSKY, 2006; LIÈVRE et al., 2006). Como células cancerosas passam por profundas mudanças metabólicas, há uma redução da energia gerada pelas vias presentes na mitocôndria (LIBERTI; LOCASALE, 2016). Uma vez que o mtDNA é responsável pela formação de proteínas da cadeia respiratória, imagina-se que mutações nesse material genético têm profundo impacto no metabolismo celular, contribuindo para a progressão do câncer, ou até mesmo para o seu início (SHARMA; SAMPATH, 2019).

Assim como no núcleo há um sistema de reparo de DNA, capaz de lidar com mutações em suas sequências quando danos ocorrem por diferentes fatores, também a mitocôndria possui sistemas de reparo de DNA diante de diferentes estressores que levam a danos em seu material genético. Diversas proteínas codificadas pelo DNA nuclear transportam-se para a mitocôndria para proteger a integridade do mtDNA, como por exemplo a polimerase γ (POL γ). Mutações nos genes responsáveis pelas subunidades de POL γ acarretam em uma perda da capacidade de corrigir erros da polimerase, aumentando o número de incorporação de bases incorretas e mutagênese (TRIFUNOVIC et al., 2004). Proteínas envolvidas no sistema de reparo por excisão de bases (*base excision repair*, BER) também estão presentes nas mitocôndrias, incluindo diferentes glicosilases (como OGG1 e MUTYH) e endonucleases.

Atualmente, o sistema de reparo por excisão de bases é um sistema amplamente conhecido na mitocôndria. Por muito tempo imaginou-se a mitocôndria como incapaz de realizar reparos em seu DNA, mas diferentes trabalhos têm mostrado como a mitocôndria é capaz de realizar alguns tipos de reparo, incluindo reparo por excisão de bases (DIANOV et al., 2001; PINZ; BOGENHAGEN, 1998). Esse sistema de reparo necessita de reconhecimento direto da lesão por glicosilases

presentes na mitocôndria (TAKAO et al., 1998), excisão da base danificada da hélice de DNA e reposição por uma base correta por POL γ (LONGLEY et al., 1998; PRAKASH; DOUBLIÉ, 2015; SIMSEK et al., 2011).

Outros tipos de reparo observados em mitocôndrias foram a recombinação homóloga (*homologous recombination*, HR) e a união de extremidade não homóloga (*non-homologous end joining*, NHEJ). A HR é um sistema de reparo quase livre de erros, buscando uma fita molde homóloga para restaurar o DNA. O NHEJ trabalha pelo religamento de extremidades de DNA que sofreram degradações, justapondo essas extremidades para recombinação. Apesar de poucas evidências a respeito desses sistemas de reparo na mitocôndria, trabalhos mostram que a mitocôndria possui a maquinaria necessária para esse tipo de reparo, incluindo proteínas Mre11, RAD51, Ku80 e XRCC4 (COFFEY; LAKSHMIPATHY; CAMPBELL, 1999; DAHAL; DUBEY; RAGHAVAN, 2018; DMITRIEVA; MALIDE; BURG, 2011; SAGE; GILDEMEISTER; KNIGHT, 2011; THYAGARAJAN; PADUA; CAMPBELL, 1996; WISNOVSKY; JEAN; KELLEY, 2018).

O sistema de reparo de erro de pareamento de bases (*mismatch repair*, MMR) corrige erros que não foram identificados por polimerases, incluindo erros por inserções ou deleções produzidas durante a replicação de sequências repetitivas, assim como erro de pareamento de nucleotídeos. Existem evidências da atividade de MMR na mitocôndria, como experimentos analisando o reparo de erros de pareamento em pares GT e GG em mtDNA em lisados de fígado de ratos (MASON, 2003).

Para que o MMR ocorra no núcleo, é necessário o recrutamento dos complexos heterodiméricos MutS α e MutS β , responsáveis pela formação das proteínas homólogas MutS 2 e 6 (MSH2/6) e MutS 2 e 3 (MSH2/3), respectivamente, que agem como sentinelas para a via de MMR (KAZAK; REYES; HOLT, 2012). Essas proteínas são responsáveis por reconhecer erros de pareamento entre bases, assim como pequenas inserções de nucleotídeos (conhecidos como IDLs).

Souza-Pinto e colaboradores (2009) mostraram que a proteína ligante de Y-box 1 (*Y-box binding protein 1*, YB1) reconhece erros de pareamento de IDLs em mitocôndrias, estando essa proteína presente tanto no núcleo quanto na mitocôndria. A YB1 atua como um fator de transcrição no núcleo (JÜRCHOTT et al., 2010), mas imagina-se que ela seja responsável pelo recrutamento do complexo de MMR na mitocôndria para o início do reparo, semelhante ao papel que MutS α e MutS β têm no

núcleo, uma vez que a redução na sua expressão diminui a atividade de MMR (SOUZA-PINTO et al., 2009).

Hipótese

Com base em resultados prévios do nosso grupo de pesquisa, que identificou a proteína YB1 como potencial ligante da ribonucleoproteína hnRNP K por meio de co-imunoprecipitação e espectrometria de massas (GARCIA, 2014). Considerando-se as informações descritas na literatura sobre as funções da proteína hnRNP K e vias de atuação, assim como os diferentes mecanismos de reparo de DNA no núcleo e nas mitocôndrias, ao hipótese é que existe um possível envolvimento da hnRNP K com o reparo de DNA pelo sistema de reparo de erro de pareamento de bases e excisão de bases, possivelmente por meio de sua interação com a proteína YB1. Se confirmada, a nossa hipótese contribuirá para o melhor entendimento sobre o papel da hnRNP K no desenvolvimento e progressão do câncer oral, visto que essa proteína tem sido relacionada ao pior prognóstico.

2. Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Estudar a potencial função da proteína hnRNP K no reparo de erro de pareamento de bases (mismatch repair) de DNA tanto no núcleo quanto na mitocôndria, buscando entender a sua relação com a proteína YB-1 e seu papel no desenvolvimento e progressão do câncer, incluindo o câncer oral.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar a potencial interação proteína-oligonucleotídeos de DNA dupla-fita contendo erros de pareamento e inserção de bases de DNA por ensaios de mudança de mobilidade eletroforética (EMSA) utilizando extratos protéicos das linhagens selecionadas com níveis diferentes de hnRNP K (superexpressão e/ou knockdown por short hairpin RNA/shRNA);

- Determinar como células superexpressando hnRNP K reagem à danos oxidativos de seu material genético, por meio do uso do composto metotrexato, e como estes danos influenciam a relação de hnRNP K com o sistema de reparo de pareamento de bases mitocondrial;

- Determinar se a inibição da fosforilação da hnRNP K pela via MEK1,2/ERK é importante para a função no reparo do DNA estudada, utilizando inibidor químico altamente seletivo para MEK1,2 (U0126);

- Avaliar a localização de hnRNP K na célula diante de danos oxidativos do DNA e com a inibição da via MEK1,2/ERK, e como sua localização impacta no sistema de reparo de pareamento de bases.

3. Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura celular

Queratinócitos orais não-tumorais espontaneamente imortalizados (*normal oral keratinocytes spontaneously immortalized*, NOK-SI) (CASTILHO et al., 2010) foram cultivados em meio de Eagle modificado por Dubelcco (DMEM, D5648; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, 12657-029; Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e solução antibacteriana e antimicótica (penicilina 100 µg/mL, estreptomicina 100 µg/mL e anfotericina B 250 µg/mL, A5955; Sigma-Aldrich). As células foram cultivadas em placas de 100 mm de diâmetro em 10 mL de DMEM (confluência de 70%) e mantidas em incubadora umidificada a 37°C na presença de 5% de CO₂.

3.2 Regulação da expressão gênica de hnRNP K

As células NOK-SI foram transfectadas com vetores lentivirais comerciais contendo cDNA de hnRNP K (NM_031262.4) para superexpressão da proteína hnRNP K em pLV[Exp]-EGFP/Neo-EF1A>hHNRNPK [NM_031262.4] (VB211215-1273ekn, Vector Builder, Chicago, IL, USA), e o vetor vazio controle lentiviral EGFP pLV[Exp]-EGFP/Neo-EF1A>ORF_stuffer para células controle. Para os ensaios com redução ou knockdown da proteína alvo foi utilizada sequência *short-hairpin* RNA (shRNA) para *HNRNPK*, clonada em vetor plasmidial *MISSION shRNA Plasmid DNA HNRNPK* (TRCN 295994, NM_002140.3 1635s21c1 – clone shK2) (Sigma Aldrich); o controle negativo para shRNA foi *MISSION TRC2 pLKO.5-puro Non-Mammalian shRNA Control Plasmid DNA* (SHC202, Sigma-Aldrich). As células foram selecionadas utilizando antibióticos, sendo geneticina para superexpressão e puromicina para *knockdown* da proteína, por 7-10 dias. A concentração de seleção com antibióticos foi definida com base na curva de viabilidade utilizando as células selvagens. O protocolo utilizado foi aquele descrito pelo fabricante dos vetores. As modificações dos níveis proteicos foram confirmadas por Western blot e/ou imunofluorescência e do RNA mensageiro por RT-qPCR.

3.3 Western blot

Amostras proteicas foram separadas por SDS-PAGE em gel 10%, utilizando-se o sistema vertical de eletroforese Mini-PROTEAN® (Bio-Rad Laboratories) conforme instruções do fabricante. Foi utilizado padrão de massa molecular para proteínas *Page Ruler Plus Prestained Protein ladder* (26619, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). A eletroforese foi realizada com amperagem constante de 12 mA/gel e voltagem limite de 110 V durante 90 a 120 minutos. A corrida foi feita em tampão de eletroforese Tris-glicina (Tris 25 mM, glicina 250 mM, SDS 0,1%, pH 8,3). Em seguida, as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF (GE Healthcare, EUA), com tampão de transferência (bicarbonato de sódio 10 mM e

Tabela 1. Lista de anticorpos utilizados no trabalho e suas respectivas diluições.

| Anticorpo | Código | Origem | Diluição | Fabricante |
|----------------------------|---------------|---------------|-----------------|-------------------|
| Anti-hnRNP K | R8903 | Camundongo | 1:2.000.000 | SIGMA |
| Anti- β -actina | #sc47778 | Camundongo | 1:2.500 | Santa Cruz |
| Anti-GAPDH | CS#2118 | Coelho | 1:2.000 | Cell Signaling |
| Anti-calnexina | CS#2433 | Coelho | 1: | Cell Signaling |
| Anti-histona 3 | CS#9715 | Coelho | 1:1.000 | Cell Signaling |
| Anti-Bcl-xL | CS#2764 | Coelho | 1:1.000 | Cell Signaling |
| Anti-STAT3 | CS#9139 | Camundongo | 1:5.000 | Cell Signaling |
| Anti-pSTAT3 | CS#9145 | Coelho | 1:2.000 | Cell Signaling |
| Anti-p53 | CS#2527 | Coelho | 1:1.000 | Cell Signaling |
| Anti-MLH1 | CS#3515 | Camundongo | 1:1.000 | Cell Signaling |
| Anti-YB1 | CS#8475 | Coelho | 1:1.000 | Cell Signaling |
| Anti-COX IV | CS#4850 | Coelho | 1:2.500 | Cell Signaling |
| Anti-Phospho-Histona H2A.X | #05-636 | Camundongo | 1:200 | Millipore |
| Anti-OxPhos | 458199 | Camundongo | 1:250 | ThermoFisher |
| Anti-camundongo | 04-18-06 | Cabra | 1:10.000 | KPL |
| Anti-coelho | 65-6120 | Cabra | 1:5.000 | Invitrogen |

carbonato de sódio 3,0 mM, pH 9,9) por 1,5 hora a 350 mA/gel. Após a transferência, a membrana foi incubada em solução de bloqueio (solução de leite 5% (BioRad 170-6404) em solução salina tamponada de Tris (TBS/T) – Tris.Cl 25 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1%) por uma hora a temperatura ambiente. Após bloqueio, a membrana foi lavada com TBS/T e incubada com o anticorpo primário, na diluição específica para cada anticorpo (Tabela 1) *overnight* a 4°C. Em seguida, a membrana foi novamente lavada com TBS/T durante 5 minutos por três vezes, e incubada por uma hora com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase diluído em solução de bloqueio, seguido de lavagem com TBS/T e visualização de quimioluminescência utilizando solução de luminol (Tris 0,1 M pH 8,5, ácido p-coumárico 400 µM, luminol 2,5 mM) acrescido de 0,009% de peróxido de hidrogênio. A membrana de PVDF foi analisada em equipamento *ChemiDoc™ MP imager* (Bio-Rad Laboratories) para a verificação da imunomarcação. A quantificação das bandas foi realizada por densitometria usando o software Image J (Rasband, 1997).

3.4 Extração proteica

Para extração de proteínas totais foi utilizado tampão comercial CellLytic™ M, (C2978, Sigma Aldrich) suplementado com inibidores de proteases e fosfatases (P8340 e P0044, respectivamente, Sigma Aldrich). Os lisados foram submetidos a sonicação por três pulsos de dez segundos na potência 50% do aparelho Sonic Dismembrator (Modelo 100, Fisher Scientific).

O subfracionamento celular foi realizado por meio do kit Cell Fractionation Kit Standard ab109719 (Abcam) para extração da fração citosólica, nuclear e mitocondrial, seguindo as instruções dos fabricantes. A concentração de proteínas foi determinada por reação de Bradford utilizando-se o reagente Bio-Rad protein assay (500-0006, Bio-Rad Laboratories, EUA), segundo instruções do fabricante, e armazenados em freezer -80°C até a execução dos ensaios.

3.5 Análise de interação proteína-DNA por EMSA

Utilizando-se o protocolo descrito no trabalho de Souza-Pinto e colaboradores (2009), com 90 ng dos oligômeros de interesse misturados com 10 µg dos extratos protéicos celulares misturados com 20 mM de NaCl, 25 mM de KCl, 0.5 mM de EDTA, 5% de glicerol, 0.5 mM de DTT (colocado no momento do uso), 10 ng/µL de BSA e 2 ng/µL de poly[dI-dC]. A corrida foi feita em gel não-desnaturante de poliacrilamida 5%

com as amostras em loading buffer de 0,1 M de Tris (pH 7.4), 0,1% Triton X (pH 7.4), 50% glicerol, 0,1% de xileno cianol e 0,1% de azul bromofenol. O gel foi transferido para membrana de nylon (GE Healthcare) equilibrada em TBE 0.5X a 4°C, com filtros adequados para deixar o sistema com espessura de 6 mm, a 10V com corrente constante de 150 mA, por 15 minutos. Em seguida foi feito o *crosslink* por 10 minutos em transiluminador UV, seguido por bloqueio em 0,01 µg/mL de BSA. A membrana foi então encubada com 0,01 µg/mL de peroxidase por 15 minutos em agitação e revelada em *ChemiDoc™ MP imager*.

3.5.1 Oligômeros de DNA de interesse

Os oligômeros utilizados foram sintetizados a partir do trabalho de Souza-Pinto e colaboradores (2009). Os oligômeros foram diluídos para uma concentração final de 90 ng/µL, juntando-se fitas forward e reverse para as sequências: mismatch (sequência contendo uma troca de base), +1IDL (contendo um par de base a mais), +2 IDL (contendo dois pares de base a mais) e +5 IDL (contendo 5 pares de base a mais) (baseado nos oligômeros desenvolvidos por Souza-Pinto e colaboradores (2009) em tampão de anelamento composto por 10 mM Tris (pH 7.5), 1 mM EDTA e 50 mM NaCl. Após misturar os oligos, estes foram incubados a 95°C por 2 minutos e submetidos a queda gradativa da temperatura até atingir 25°C num termociclador automático de PCR.

3.6 Inibição da fosforilação de hnRNP K

Foi utilizado o inibidor da via MEK/ERK (U0126, Sigma-Aldrich), que regula a fosforilação de hnRNP K nos resíduos Ser284 e Ser353 (HABELHAH et al., 2001). Seguindo-se protocolo estabelecido em laboratório, o inibidor foi utilizado a 5 µM por 4 horas em cultura celular. Em seguida, realizou-se extração de proteínas e ensaios de imunofluorescência.

3.7 Indução de dano no DNA por meio de metotrexato

Foi utilizado o reagente químico metotrexato (Sigma-Aldrich) para início dos ensaios com indução de danos no DNA. O metotrexato induz danos oxidativos no material genético, levando à formação de 8-hydroxydeoxyguanosine (8OHdG), um aduto de DNA, reparado por meio de *mismatch repair* (MARTIN et al., 2009). Utilizou-se concentração de 0,5 µg/mL de metotrexato, por 12 horas em cultura celular. Em

seguida, as células foram submetidas à extração de proteínas para análises por WB e EMSA, ou utilizadas para ensaio de imunofluorescência.

3.8 Imunofluorescência

As células foram plaqueadas em lamínulas de vidro em placas de 24 poços e tratadas com metotrexato ou U0126 nos tempos de 12 e 4 horas, respectivamente. Após o tratamento, foram fixadas com metanol gelado por 10 minutos. Em seguida, utilizou-se solução de tampão-fosfato contendo 0,5% Triton X-100 e 3% (w/v) de albumina de soro bovino (BSA) para bloquear as lamínulas por uma hora. Os anticorpos primários foram incubados *overnight* a 4°C e estão listados na Tabela 1. A incubação com anticorpos secundários conjugados com AlexaFluor 488 (diluição 1:1000, #1028736, Invitrogen) ou DyLight R 650 (diluição 1:1000, #SA-510089, Thermo Scientific, MA, EUA) foi realizada por 1 hora. Os núcleos foram corados com DAPI (D9542, Sigma-Aldrich). O microscópio confocal Leica TCS SP8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) disponível na Central multiusuários da FCFRP, foi utilizado para aquisição de imagens com lentes objetivas de 63X e zoom digital de 3X. Imagens de cinco campos aleatórios foram obtidas e o software ImageJ foi utilizado para quantificação da intensidade de fluorescência. Um *threshold* padrão foi estabelecido para todas as imagens e a média da intensidade integrada bruta (*raw integrated intensity*, soma dos valores de pixel) foi considerada para comparação da fluorescência.

3.9 Ensaio de Cometa

As células foram tratadas nas condições citadas acima, com metotrexato ou U0126, por um período de 24 horas. Em seguida, as células foram removidas das placas de cultura, lavadas com PBS 1x, centrifugadas a 1.200 rpm por 5 minutos, ressuspendidas em agarose *low-melting* 1% aquecida a 37°C e transferidas para lâminas pré-preparadas com agarose 1%, sendo colocadas a 4°C por 30 minutos. A célula NOK CT-GFP foi incubada com peróxido de hidrogênio 0,1 M por 10 minutos, como controle positivo de danos por oxidação. As lâminas foram lavadas com tampão de lise com Triton X-100 1:100, resfriado a 4°C (2,5 M NaCl; 0,1 M EDTA; 10 mM Tris-HCl, pH = 10.0) por uma hora. Lavou-se as lâminas em tampão de reação (40 mM HEPES, 0,1 M KCl, 0,5 mM EDTA, 0,2 mg/ml BSA, pH = 8.0) da enzima endonuclease de reparo Fgp (M0240S, New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA); em seguida foi

adicionada a enzima (concentração de 1:1000), e as lâminas incubadas a 37°C por 30 minutos. Após, foi realizado o tratamento alcalino com tampão de eletroforese a 4 °C (0,3 M NaOH, 1 mM EDTA) por 1 hora, e a eletroforese em sequência. A eletroforese foi realizada a 1 V/cm de cuba, cobrindo as lâminas com uma fina camada de tampão de eletroforese, em corrida de 30 minutos. As lâminas foram neutralizadas com tampão de neutralização (0,4 M Tris, pH = 7.5) por 10 minutos, sendo em seguida fixadas com etanol 70% por 10 minutos. Adicionou-se DAPI 5 µg/ml para visualização do DNA. As imagens foram adquiridas na câmera digital (AxioCam, MRC, Carl ZEISS, Alemanha) acoplada ao microscópio AxioVERT 40 (Carl ZEISS) com aumento de 20x do tamanho original. As imagens foram analisadas utilizando-se o *macro Comet_Assay* desenvolvido Bagnell (2011) para o software ImageJ (Rasband, 1997), capaz de calcular o tamanho da cauda, seu *tail moment* e porcentagem de DNA na cauda a partir dos parâmetros do ensaio de cometa.

3.10 Análise de dados

As análises estatísticas e gráficos foram realizadas com o programa GraphPad Prism 9. Imagens de Western blot e microscopia de fluorescência foram analisadas por meio da ferramenta aberta ImageJ (Rasband, 1997). Os testes estatísticos utilizados foram o teste t não pareado e One-Way ANOVA.

4. Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Alteração nos níveis de RNAm e da proteína hnRNP K em células NOK-SI

Inicialmente, as células NOK-SI contendo short-haipin (shRNA) para RNA de interferência e redução da proteína hnRNP K (NOK/shnK), e células NOK-SI (ou NOK) com superexpressão da proteína hnRNP K (NOK/hnRNP K), e respectivos controles (NOK/shø e NOK/CT), foram selecionadas e a alteração do RNAm de interesse foi analisado por RT-qPCR. Essa análise confirmou que as células NOK/hnRNP K estavam superexpressando hnRNP K (Figura 1).

Em seguida, as células selecionadas foram incubadas com o agente oxidante metotrexato e com o inibidor de fosforilação da proteína hnRNP K (U0126) (Figura 2).

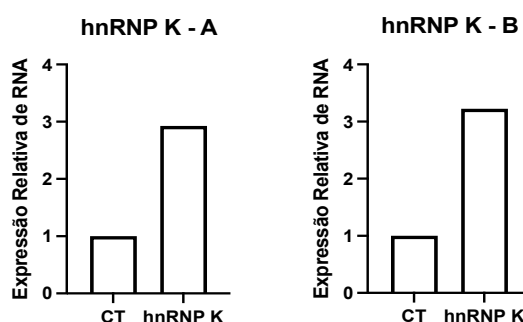


Figura 1. Seleção de células NOK-SI superexpressando hnRNP K. Ensaio de RT-qPCR para análise de expressão relativa de RNA ($2^{\Delta\Delta CT}$) de hnRNP K em células NOK-SI transfectadas com os vetores lentivirais controle CT-EGFP e hnRNP K-EGFP, para as duas isoformas de hnRNP K. Vê-se o aumento da expressão de hnRNP K nas células transfectadas com o vetor de superexpressão.

A análise de hnRNP K no lisado total mostrou um aumento dela nas células NOK/CT diante dos tratamentos de metotrexato e U0126, porém, houve uma redução nos níveis da proteína na célula NOK/hnRNP K com tratamento de metotrexato (Figura 2A). Observou-se também um aumento de p53 nas células NOK/CT diante dos dois tratamentos, com níveis mais altos de p53 nas células NOK/hnRNP K, mas sem grande variação diante dos tratamentos.

A proteína de biogênese mitocondrial PGC-1 α mostrou um aumento nas células NOK/CT tratadas com metotrexato e U0126, e uma redução nas células NOK/hnRNP K quando tratadas com metotrexato (Figura 2A). Observa-se também um aumento de Bcl-x(L) nas células NOK/CT com ambos os tratamentos, e uma leve redução nas células NOK/hnRNP K incubadas com metotrexato.

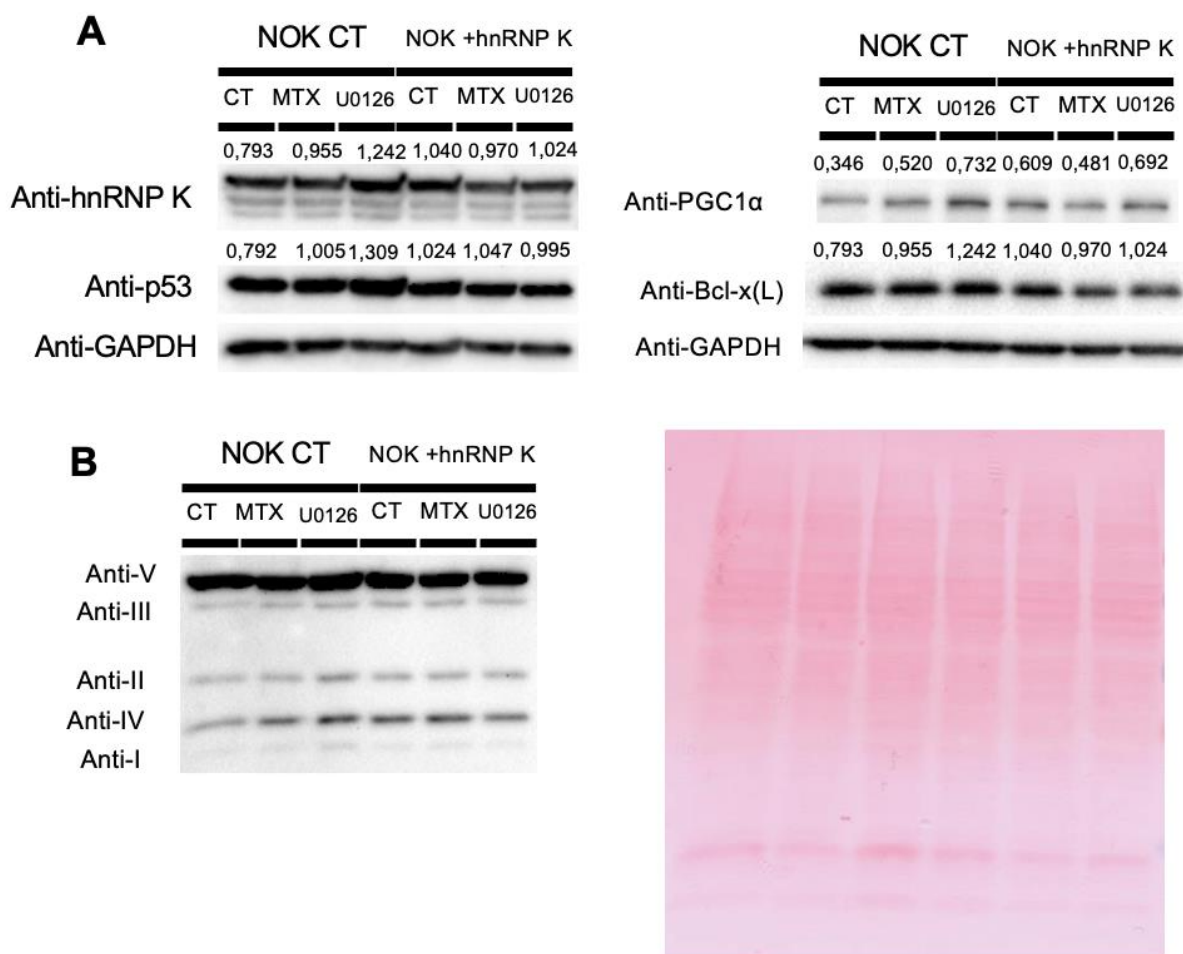


Figura 2. Superexpressão da proteína hnRNP K em células NOK-SI. (A) *Western blot* das células NOK/CT e NOK/hnRNP K tratadas com 0,5 μ g/ml de metotrexato (MTX) e 5 μ M de U0126 por 12h e 4h respectivamente. Foram utilizados anticorpos para as proteínas hnRNP K, p53, PGC-1 α , Bcl-x(L) e GAPDH. (B) *Western blot* das células NOK/CT e NOK/hnRNP K tratadas com MTX e U0126, analisando-se as proteínas da cadeia de fosforilação oxidativa (OXPHOS). Ao lado a figura da membrana de PVDF corada com *ponceau* indicando a presença de proteínas em toda a membrana analisada. As concentrações dos anticorpos utilizados são descritos na *Tabela 1*.

Analisou-se ainda as proteínas da cadeia de fosforilação oxidativa (OXPHOS) (Figura 2B). Vê-se uma leve redução das proteínas da cadeia respiratória V nas células NOK/CT tratadas com metotrexato e U0126, com uma redução ainda mais acentuada nas células NOK/hnRNP K.

Em células NOK/shk2, observa-se uma redução de hnRNP K tanto na fração mitocondrial quanto nuclear (Figura 3A). Entretanto, houve aumento de hnRNP K nas células NOK/shø tratadas com U0126 na fração nuclear e mitocondrial (Figura 3B), com as células NOK/shk2 não apresentando hnRNP K em sua fração mitocondrial quando tratadas com o inibidor de fosforilação. Vê-se também nessas células NOK/shk2 tratadas com U0126 uma redução de Bcl-x(L).

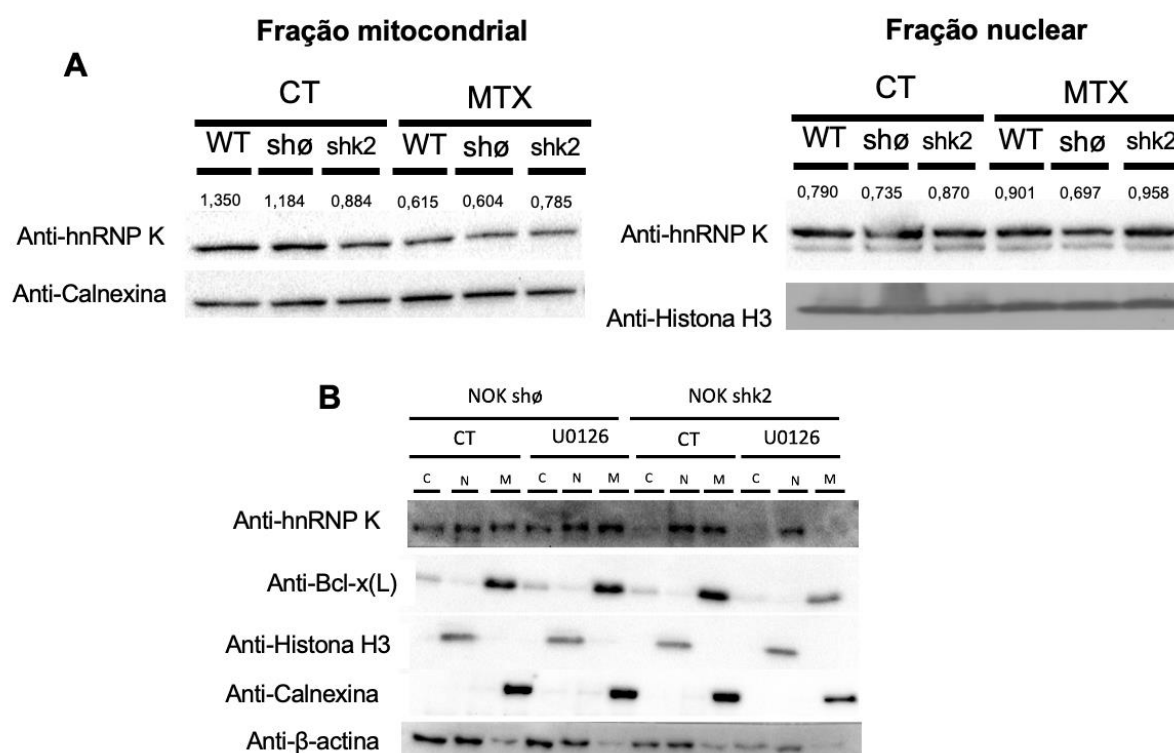


Figura 3. Supressão da proteína hnRNP K em células NOK-SI. (A) *Western blot* da fração mitocondrial e nuclear das células NOK/WT, NOK/shø e NOK/shk2 tratadas com 0,5 µg/ml de metotrexato (MTX) por 12h. Foram utilizados os anticorpos para as proteínas hnRNP K, histona H3 e calnexina. (B) *Western blot* das células NOK/shø e NOK/shk2 tratadas com 5 µM de U0126 por 4h. Foram utilizados anticorpos para as proteínas hnRNP K, Bcl-x(L), histona H3, calnexina e B-actina. As concentrações dos anticorpos utilizados são descritas na *Tabela 1*.

Os ensaios de imunofluorescência utilizados para análise das proteínas hnRNP K, p53, MLH1, TOM20 e YB1 nas células mostrou aumento da fluorescência de hnRNP K nas células NOK/CT tratadas com metotrexato, assim como um aumento da proteína no núcleo na condição com U0126 (Figura 4). HnRNP K também aumentou nas células NOK/hnRNP K sem tratamento em relação às células NOK/CT, mas houve uma redução na sua fluorescência com o tratamento de metotrexato, e um acúmulo ainda mais intensificado no núcleo das células tratadas com U0126. Vimos também o aumento da fluorescência de p53 nas células NOK/CT tratadas com metotrexato e U0126, havendo uma redução na sua fluorescência nas células NOK/hnRNP K.

MLH1 mostrou um aumento na intensidade de fluorescência em ambas as células NOK/CT e NOK/hnRNP K com o tratamento com o inibidor de fosforilação U0126 (Figura 5).

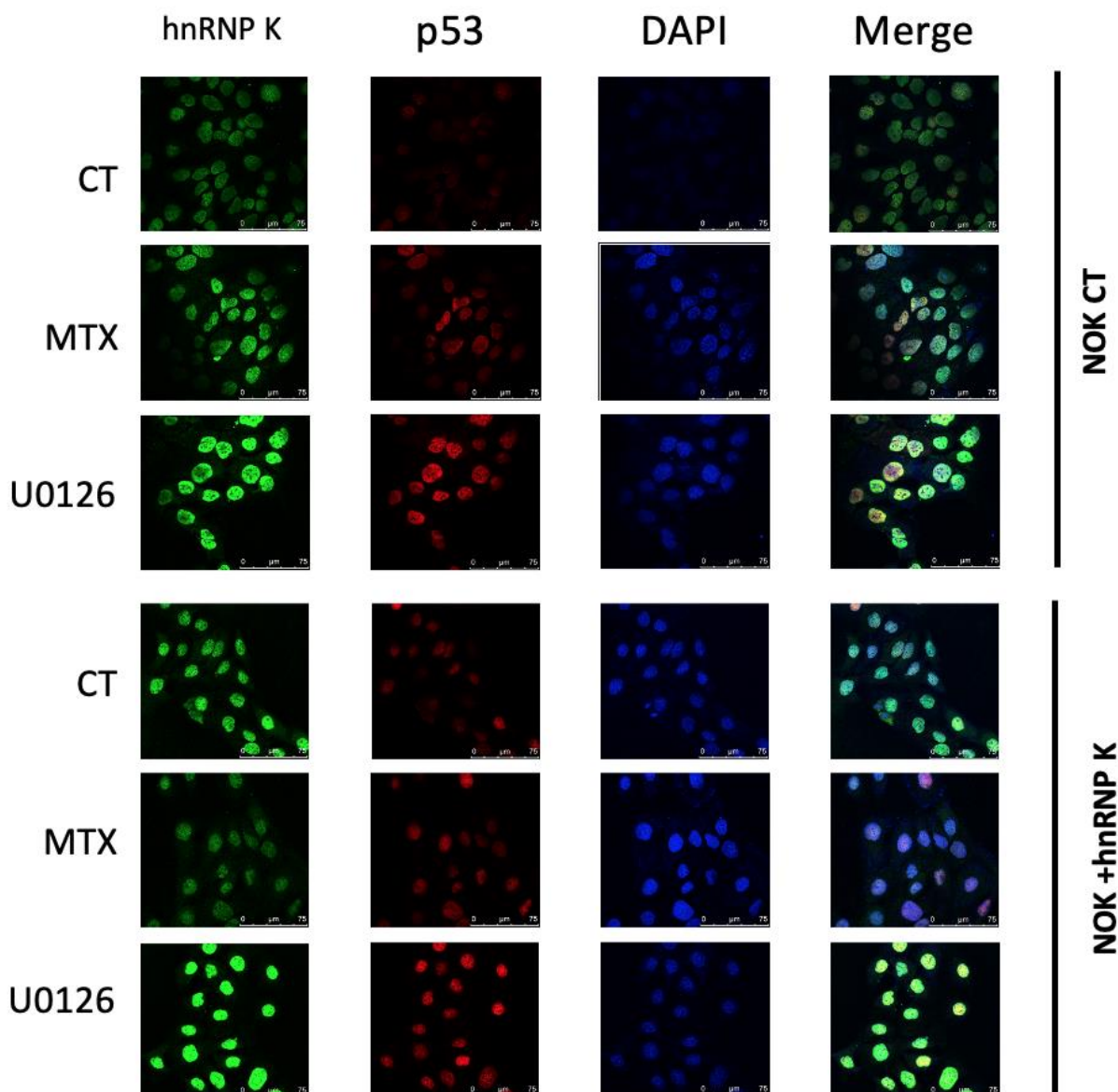


Figura 4. Imunofluorescência das células NOK-SI superexpressando hnRNP K. Imunofluorescência de células NOK/CT e NOK/hnRNP K tratadas com 0,5 μg/ml de metotrexato (MTX) e 5 μM de U0126 por 12h e 4h, respectivamente. Foram utilizados anticorpos primários para hnRNP K e p53 (concentrações dos anticorpos utilizados são descritos na *Tabela 1*), utilizando-se anticorpos secundários AlexaFluor 488 e DyLight R 650 (ambos em concentrações 1:1000). Os núcleos foram corados com DAPI.

TOM20, uma proteína de membrana mitocondrial, teve uma tendência de aumento de sua fluorescência nas células NOK/CT com os tratamentos de metotrexato e U0126 (Figura 6). Nas células com hnRNP K superexpressa, porém, há um aumento significativo da expressão de TOM20 nas células, com a mesma tendência gradativa apresentada nas células controle com os tratamentos. YB1 apresentou níveis muito baixos, sendo observado um aumento significativo nas células NOK/hnRNP K quando tratadas com U0126.

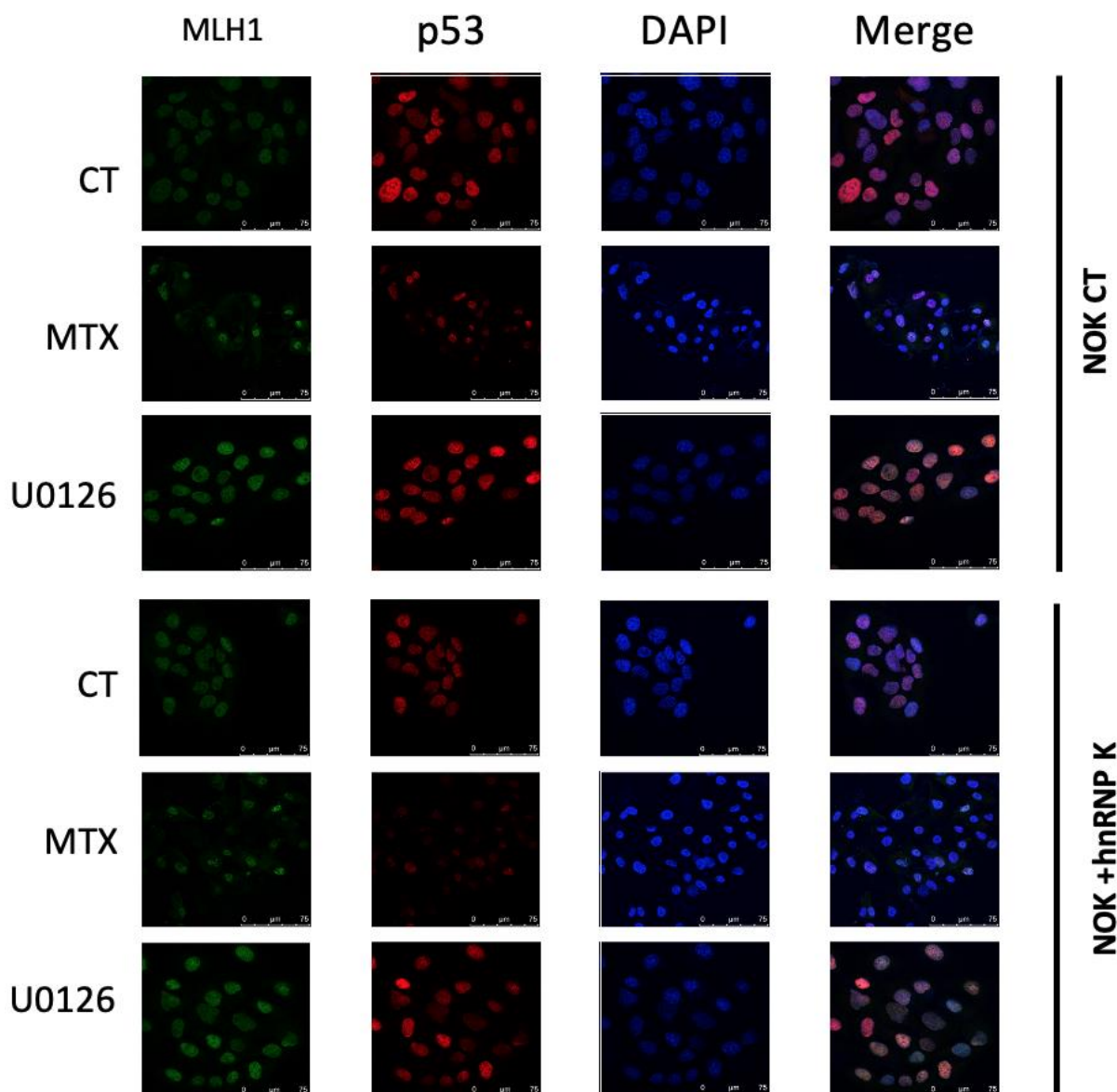


Figura 5. Imunofluorescência das células NOK-SI superexpressando hnRNP K. Imunofluorescência de células NOK/CT e NOK/hnRNP K tratadas com 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de metotrexato (MTX) e 5 μM de U0126 por 12h e 4h, respectivamente. Foram utilizados os anticorpos primários para MLH1 e p53, utilizando-se os anticorpos secundários AlexaFluor 488 e DyLight R 650 (ambos em concentrações 1:1000). Os núcleos foram corados com DAPI.

4.2 Ensaios de mobilidade eletroforética (EMSA assay)

Utilizando os oligômeros *mismatch*, +1IDL, +2IDL e +5 IDL (SOUZA-PINTO et al., 2009), as células NOK/CT foram tratadas com metotrexato ou U0126 e as frações protéicas mitocondriais foram incubadas com o oligômero contendo a sequência *mismatch*. Observou-se um aumento da formação do complexo oligômero DNA-proteína, mas as células NOK/hnRNP K demonstraram uma leve redução da interação oligômero-proteínas com o tratamento de metotrexato, e aumento quando tratadas com U0126 (Figura 7A).

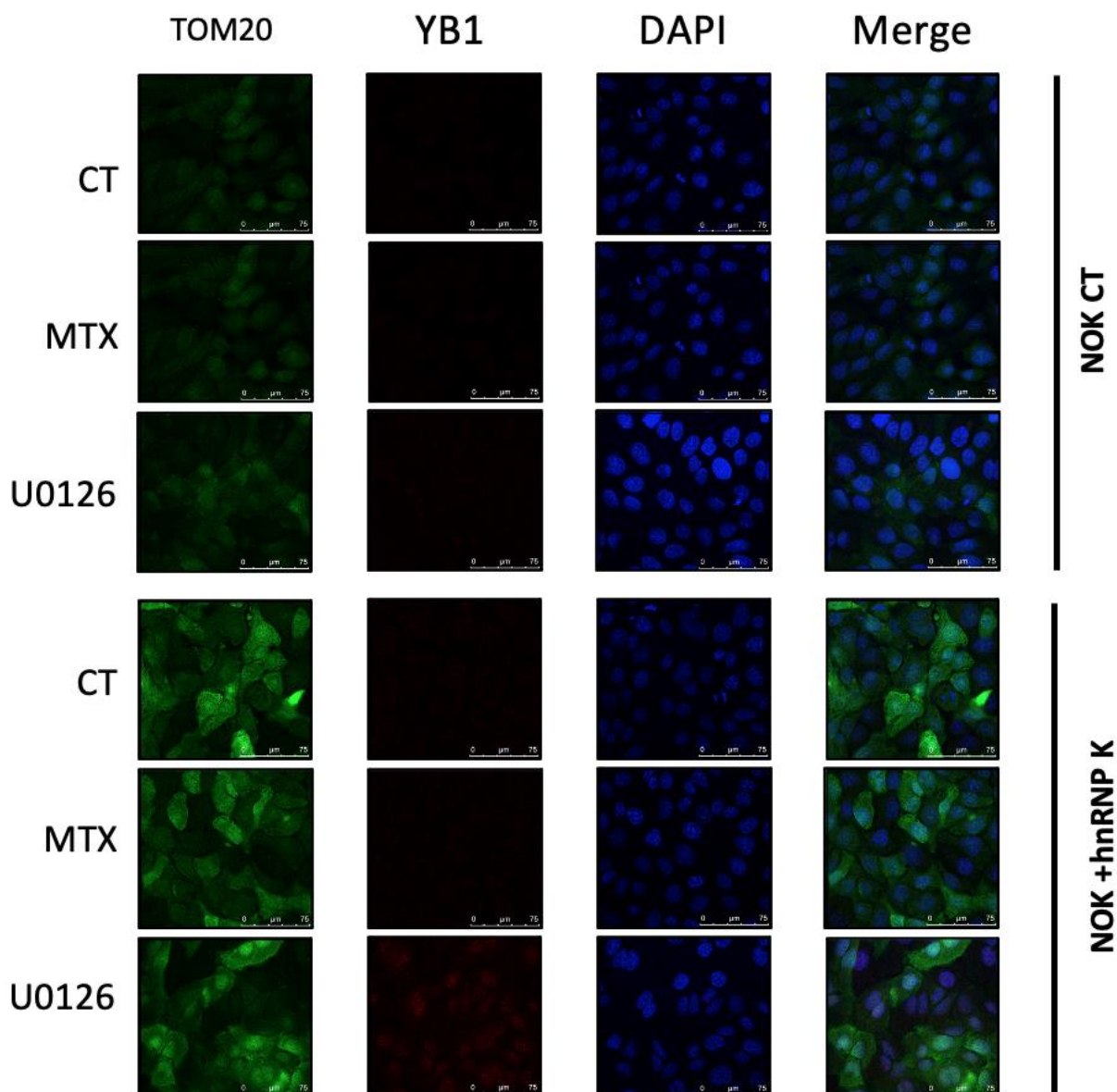


Figura 6. Imunofluorescência das células NOK-SI superexpressando hnRNP K. Imunofluorescência de células NOK/CT e NOK/hnRNP K tratadas com 0,5 µg/ml de metotrexato (MTX) e 5 µM de U0126 por 12h e 4h, respectivamente. Foram utilizados os anticorpos primários para TOM20 e YB1, utilizando-se os anticorpos secundários AlexaFluor 488 e DyLight R 650 (ambos em concentrações 1:1000). Os núcleos foram corados com DAPI.

Notou-se também uma interação reduzida entre a fração proteica mitocondrial das células NOK/CT com a sequência +1IDL quando as células eram tratadas com metotrexato e U0126, assim como uma redução da formação de complexos oligômero DNA-proteína nas células NOK/hnRNP K incubadas com U0126 (Figura 7B).

Um perfil semelhante ocorreu com as células NOK/CT tratadas com metotrexato quando suas frações proteicas mitocondriais foram incubadas com o oligômero +2IDL (Figura 7C), mostrando um aumento da formação do complexo oligômero DNA-proteína, enquanto as células NOK/hnRNP K mostraram uma

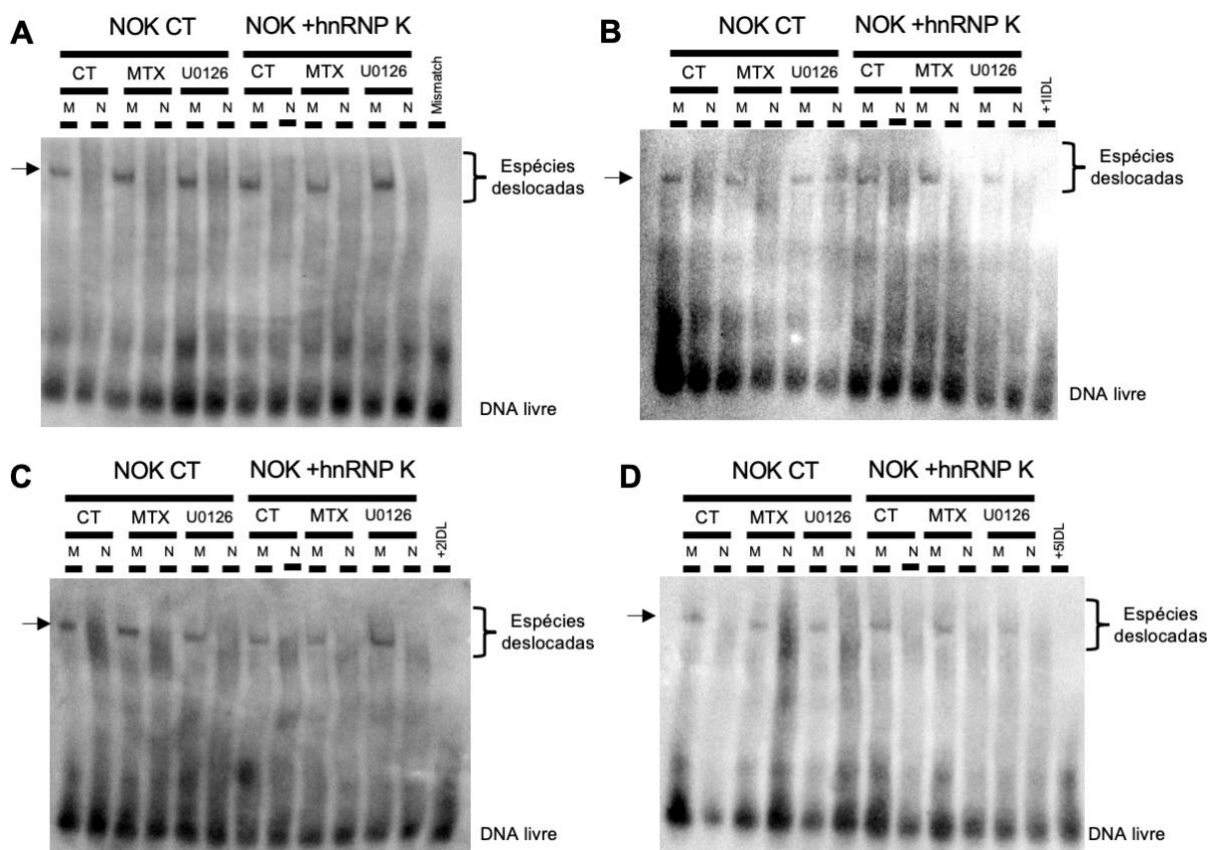


Figura 7. Ensaio de mobilidade eletroforética (EMSA) de extratos protéicos de células NOK-SI superexpressando hnRNP K tratadas com metotrexato e inibidor de fosforilação U0126. (A) Extratos protéicos mitocondriais e nucleares de células NOK/CT e NOK/hnRNP K tratadas com 0,5 µg/ml de metotrexato (MTX) e 5 µM de U0126. Estes extratos foram incubados com oligômeros dupla fita com uma sequência contendo uma base trocada (*mismatch*) por 30 minutos, seguido de eletroforese e transferência para membrana de nylon. Indicado por seta, o complexo oligômero-proteína, com o DNA livre apresentando-se no fim da membrana. (B) Extratos protéicos mitocondriais e nucleares tratados com MTX e U0126 incubados com oligômeros contendo uma sequência contendo uma inserção de base (+1IDL). (C) Extratos protéicos mitocondriais e nucleares tratados com MTX e U0126 incubados com oligômeros contendo uma sequência contendo duas inserções de base (+2IDL). (D) Extratos protéicos mitocondriais e nucleares tratados com MTX e U0126 incubados com oligômeros contendo uma sequência contendo cinco inserções de base (+5IDL).

interação menor do que as NOK/CT, mas apresentaram um aumento na interação oligômero-proteína quando tratadas com U0126. Não foi possível observar nenhuma interação significativa das frações protéicas mitocondriais com o oligômero +5IDL (Figura 7D).

Os mesmos experimentos foram realizados nas células NOK/shnK (Figura 8). Quando as frações protéicas foram colocadas junto do oligômero contendo a sequência *mismatch*, observou-se a presença da interação oligômero-proteína na fração mitocondrial das células NOK/shø (controle negativo) quando tratadas com metotrexato, mas uma redução dessa interação nas células NOK/shk2 tratadas com metotrexato em sua

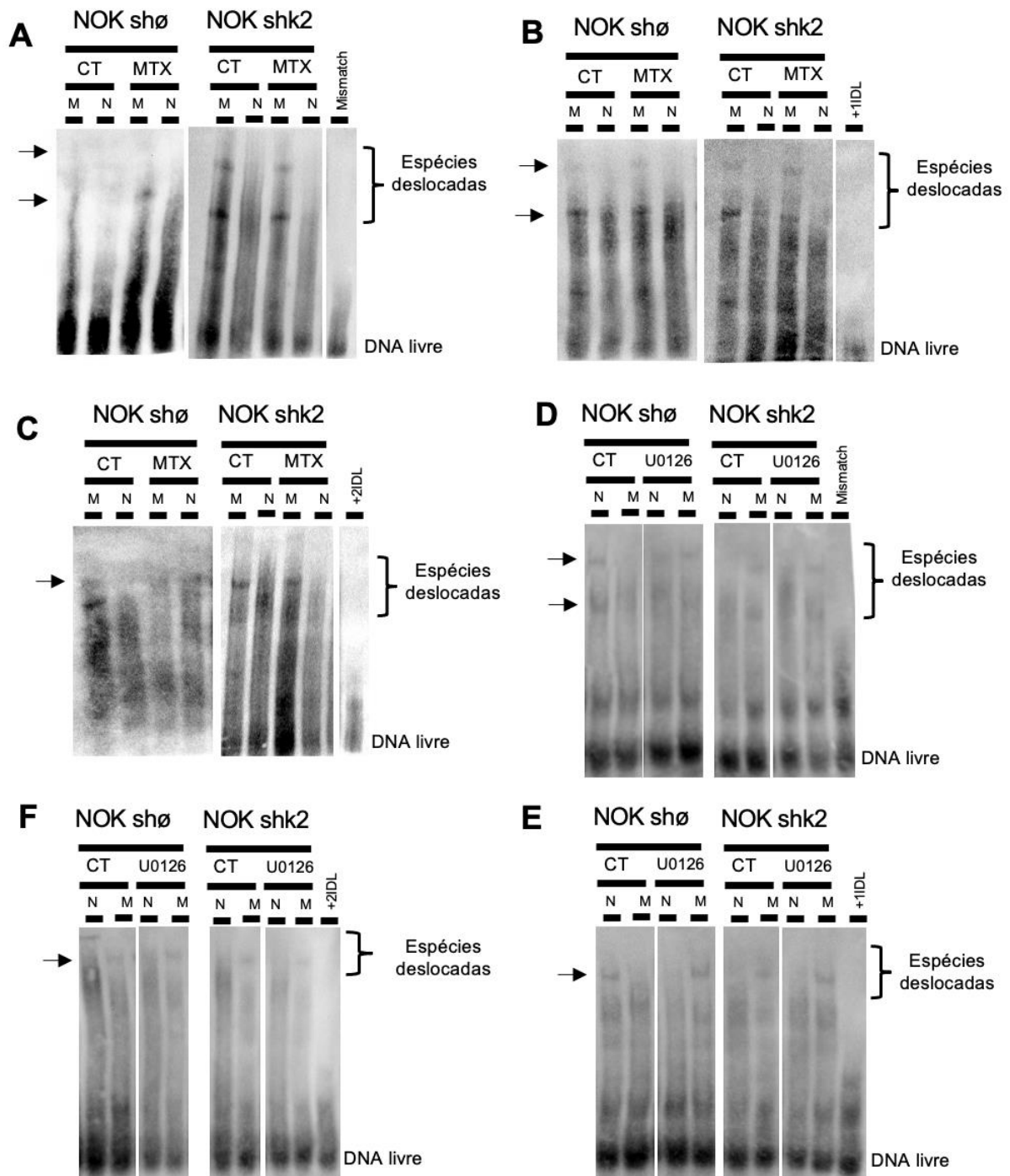


Figura 8. Ensaio de mobilidade eletroforética (EMSA) de extratos protéicos de células NOK-SI com supressão de hnRNP K tratadas com metotrexato e inibidor de fosforilação U0126.

(A) Extratos protéicos mitocondriais e nucleares de células NOK/shø e NOK/shk2 tratadas com 0,5 µg/ml de metotrexato (MTX). Estes extratos foram incubados com oligômeros dupla fita com uma sequência contendo uma base trocada (*mismatch*) por 30 minutos, seguido de eletroforese e transferência para membrana de nylon. Indicado por seta, o complexo oligômero-proteína, com o DNA livre apresentando-se no fim da membrana. (B) Extratos protéicos mitocondriais e nucleares tratados com MTX incubados com oligômeros contendo uma sequência contendo uma inserção de base (+1IDL). (C) Extratos protéicos mitocondriais e nucleares tratados com MTX incubados com oligômeros contendo uma sequência contendo duas inserções de base (+2IDL). (D) Extratos protéicos mitocondriais e nucleares de células NOK/shø e NOK/shk2 tratadas com 5 µM de U0126. Estes extratos foram incubados com oligômeros dupla fita com uma sequência contendo uma base trocada (*mismatch*). (E) Extratos protéicos mitocondriais e nucleares tratados com U0126 incubados com oligômeros contendo uma sequência contendo uma inserção de base (+1IDL). (F) Extratos protéicos mitocondriais e nucleares tratados com U0126 incubados com oligômeros contendo uma sequência contendo duas inserções de base (+2IDL).

fração mitocondrial, como esperado visto que houve redução da proteína alvo (Figura 8A).

As células NOK/shø não apresentaram diferença da interação oligômero-proteína com o oligômero +1IDL nas condições testadas, mas houve redução da interação com a fração mitocondrial das células NOK/shk2 quando tratadas com metotrexato (Figura 8B).

Notou-se redução da formação do duplexo com o oligômero +2IDL na fração mitocondrial das células NOK/shø tratadas com metotrexato, enquanto células NOK/shk2 não apresentaram mudança na sua interação (Figura 8C).

No tratamento das células com o inibidor de fosforilação U0126, observou-se uma redução da formação do complexo oligômero DNA-proteína com o oligômero contendo *mismatch* nas células NOK/shø, mas nas células NOK/shk2 a interação se mantém (Figura 8D). Viu-se também um aumento da interação do oligômero +1IDL com a fração protéica mitocondrial de ambas as células NOK/shø e NOK/shk2 (Figura 8E).

Notou-se um aumento da formação do complexo oligômero-proteína na fração mitocondrial com o oligômero +2IDL nas células NOK/shø tratadas com U0126, enquanto que nas células NOK/shk2 há uma redução da formação desse complexo (Figura 8F). Estes dados da supressão de hnRNP K (NOK/shnK) demonstram que a redução nos níveis da proteína parece não ter um impacto tão significativo no mecanismo de reparo estudado, diferente dos ensaios com a superexpressão da hnRNP K. Além disso, nossos dados mostram que na condição de inibição de fosforilação (U0126), a proteína hnK é deslocada na sua maioria para núcleo e mitocôndrias, provavelmente compensando a redução dos níveis da proteína para manter as suas funções.

4.3 Ensaios de Cometa

Realizou-se ensaios de cometa com as células NOK/hnRNP K na presença da endonuclease Fpg, capaz de reconhecer danos por oxidação (Figura 9). O que se observou foi um aumento das caudas dos cometas nas células NOK/CT tratadas com metotrexato e U0126, sendo mais significativo na condição de U0126. Nas células NOK/hnRNP K, observa-se uma redução das caudas de cometa, com as células tratadas com metotrexato com redução ainda maior do tamanho de sua cauda (Figura 9).

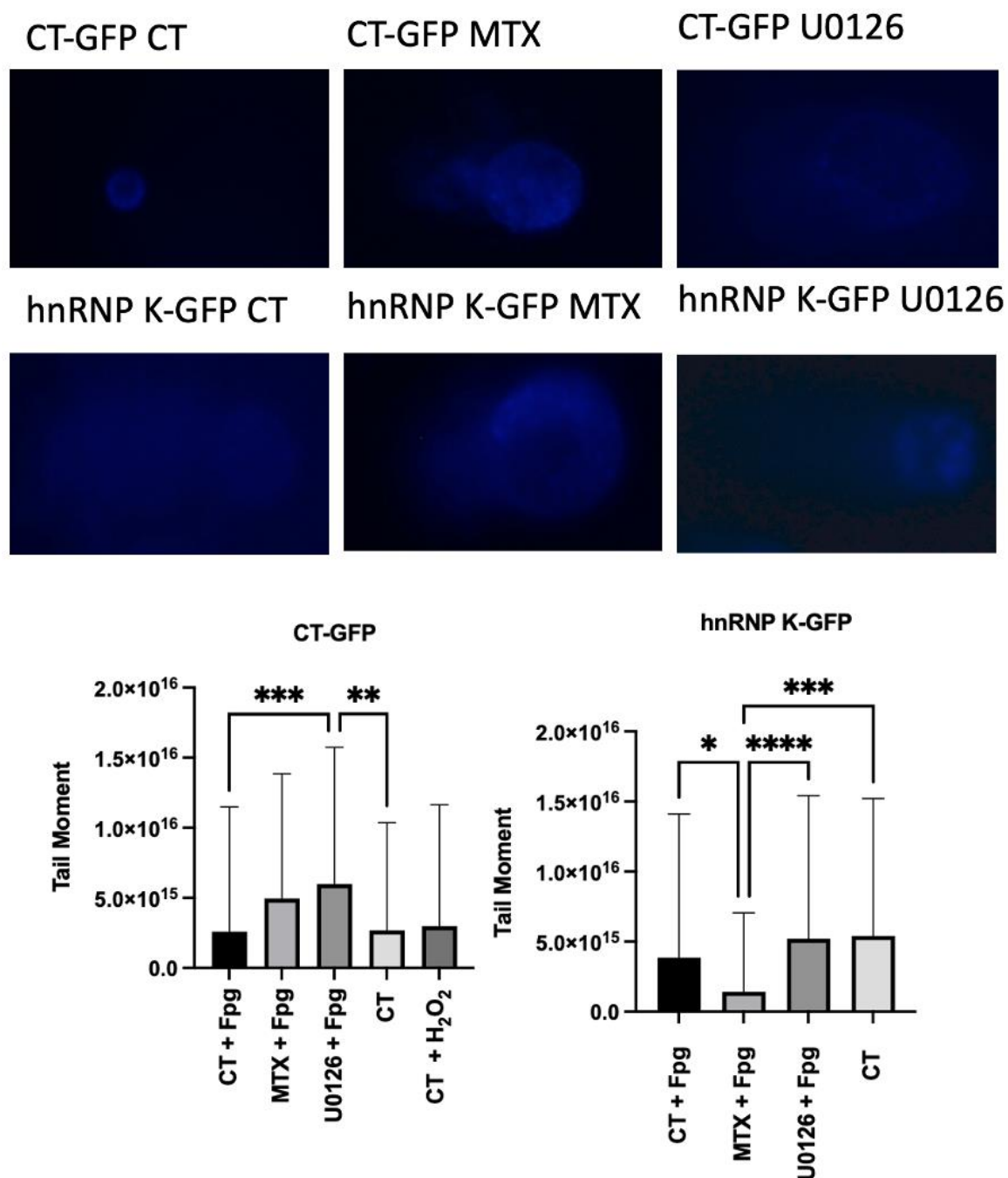


Figura 9. Ensaio de Cometa em células NOK-SI superexpressando hnRNP K. Ensaio de Cometa realizado em células NOK/CT e NOK/hnRNP K tratadas com 0,5 μ g/ml de metotrexato (MTX) ou 5 μ M de inibidor de fosforilação U0126 por 24h. Este ensaio de Cometa foi realizado com a adição da enzima Fpg (1:1000), utilizada para observação de danos oxidativos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, comparado com controle (NOK/CT-GFP), one-way ANOVA. Os resultados são mostrados como média de dois experimentos independentes.

5. Discussão

5. DISCUSSÃO

Conforme descrito previamente, a proteína YB1 é essencial para o reparo de pareamentos errados (*mismatch repair*, MMR) em DNA mitocondrial (SOUZA-PINTO et al., 2009), e em trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa, identificamos que a proteína hnRNP K se liga a YB1, o que permitiu-nos propor a hipótese de que a proteína hnRNP K participa do processo de MMR, dando ênfase no reparo de DNA mitocondrial, uma vez que os ensaios de EMSA foram realizados com extratos protéicos mitocondriais.

Inicialmente, observamos o aumento de hnRNP K e p53 nas células NOK/CT tratadas com o pró-oxidante metotrexato (MTX), responsável por causar lesões oxidativas no DNA (8OHdG) e formação de adutos de DNA (MARTIN et al., 2009). A proteína p53 é uma conhecida ativadora de vias de reparo de DNA e vias pró-apoptóticas, e a hnRNP K é um conhecido co-fator de p53, sendo que diferentes modificações pós-traducionais em hnRNP K levam à ativação de p53, e consequentemente, ativa a sinalização para prevenir proliferação celular exacerbada (CHEN et al., 2008a; MOUMEN et al., 2005; QIN et al., 2020). Quando a hnRNP K foi superexpressa na NOK-SI, observa-se uma redução dos níveis da proteína diante do tratamento de MTX, apesar de ainda ocorrer o aumento de p53 nestas mesmas células. A resposta das células NOK/shnK (com silenciamento de RNA para hnRNP K) tratadas com MTX, foi evidenciado pela redução da hnRNP K na fração mitocondrial e seu aumento na fração nuclear. Podemos propor que diante do dano ao material genético, a célula de maneira quase compensatória busca aumentar os níveis de hnRNP K no núcleo para responder aos potenciais danos de DNA induzidos na célula. O aumento de hnRNP K, junto dos resultados citados acima, confirmaram que o papel da hnRNP K na sinalização celular via p53 depende, ao menos em parte, do seu nível e da localização na célula, o que tem implicações importantes para a carcinogênese, por afetar a atividade funcional de p53 e potencialmente levar a instabilidade genômica acompanhada pela perda de sinalização de apoptose (BIEGING; MELLO; ATTARDI, 2014).

Realizamos também o tratamento dessas células com o inibidor da via de MEK/ERK U0126. Essa via é responsável pela fosforilação dos resíduos de serina 284 e 353, que regulam a translocação da hnRNP K do núcleo para o citoplasma (HABELHAH et al., 2001a). Observou-se um aumento de hnRNP K e p53 nas células NOK/CT com o inibidor, algo que não ocorreu com a superexpressão de hnRNP K. O

tratamento de células NOK/shø mostrou um aumento da concentração de hnRNP K no núcleo, assim como na mitocôndria. Já com a redução de hnRNP K na célula, há uma redução geral de hnRNP K na mitocôndria das células tratadas, concentrando-se totalmente no núcleo. Os resultados sugerem uma relação direta dos níveis de hnRNP K com os níveis de p53, aparentemente direcionando p53 para o núcleo e para a mitocôndria, o que pode ter implicações no reparo de DNA e apoptose (MOUMEN et al., 2005). Este resultado reforça a cooperação de p53 e hnRNP K numa nova função, como foi proposto que hnRNP K seria um co-fator ou ativador de p53 no controle de transcrição (MOUMEN et al., 2005).

O aumento de Bcl-x(L) nas células NOK/CT com o tratamento de MTX e U0126 pode ser relacionado à resposta de sobrevivência com ativação de mecanismos anti-apoptóticos, assim como o aumento da hnRNP K aumentam os níveis de Bcl-X(L). A redução da hnRNP K e sua retenção no núcleo das células NOK/shk2 sugerem que os níveis de Bcl-x(L) dependem mais dos níveis de hnRNP K do que da sua mobilidade do núcleo para o citoplasma. Sabemos que hnRNP K é responsável pelo *splicing* alternativo de *Bcl-X*, com Revil e colaboradores (2009) demonstrando que uma redução dos níveis de hnRNP K leva a aumento da Bcl-x(S) (pró-apoptótica), e que a hnRNP K é responsável pelo *splicing* alternativo da isoforma anti-apoptótica Bcl-x(L).

Diante da mudança de localização da hnRNP K nas células NOK/shø incubadas com MTX e U0126, com aumento no núcleo e mitocôndria, buscamos avaliar proteínas relacionadas com a dinâmica e atividade mitocondrial. A análise da proteína PGC-1 α (biogênese mitocondrial) mostrou um aumento nas células NOK/CT na presença de MTX e U0126, sugerindo uma resposta celular que envolve alterações na biogênese mitocondrial com potencial impacto na apoptose e no metabolismo, uma vez que houve aumento nos níveis das proteínas envolvidas na fosforilação oxidativa (OXPHOS). Observou-se também um aumento da proteína TOM20, um transportador protéico presente na membrana mitocondrial, nas células NOK/hnRNP K por meio do ensaio de imunofluorescência. Alterações nos níveis das proteínas OXPHOS estão associadas com diferentes tipos de câncer (BOGUNOVIC et al., 2009; VAZQUEZ et al., 2013), e alterações nos níveis dessas proteínas metabólicas além de alterações nos níveis de PGC-1 α com a superexpressão de hnRNP K sugerem que essas células têm menor estresse oxidativo na mitocôndria, contribuindo, em parte, para menos danos no DNA.

A YB1 é uma proteína com uma grande quantidade de funções celulares, participando de uma grande variedade de ações envolvendo o DNA e o RNA, tais como reparo de DNA, transcrição e *splicing* e regulação mRNA (DECKERT et al., 2006; DUTERTRE et al., 2010; GAUDREAULT, 2004; IZUMI, 2001; LASHAM et al., 2003). YB1 é responsável pelo *splicing* da proteína MDM2, uma ubiquitina ligase responsável pela ubiquitinação de p53 (DUTERTRE et al., 2010). Danos no DNA aumentam os níveis de p53, diminuindo os níveis de MDM2, existindo uma correlação da ligação de YB1 com p53 que impede que a primeira seja capaz de realizar o *splicing* de MDM2. Nos dados apresentados, o aumento da hnRNP K e sua localização no núcleo estão associados com aumento de YB1. Esse aumento de YB1 também encontra correspondência no aumento de p53 na mesma célula, como descrito anteriormente, reforçando uma relação positiva entre as três proteínas. YB1 também é conhecida por atuar no MMR mitocondrial, onde a depleção desta molécula leva à incapacidade da mitocôndria de reparar seu material genético por meio de MMR, aumentando a mutagênese do DNA mitocondrial (SOUZA-PINTO et al., 2009).

Análises de MLH1, uma proteína envolvida no processo de reparo de MMR nuclear (DUPRIE et al., 2022), mostraram o aumento da proteína quando as células são tratadas com U0126, mas seria importante avaliar a fosforilação da proteína MLH1 nas condições estudadas, para definir qual o efeito da modulação da hnRNP K na sua ativação. Esses resultados reforça a nossa hipótese de que a hnRNP K tem impacto na resposta aos danos no DNA.

Com todos esses resultados em mãos, olhamos então para a interação das diferentes proteínas presentes na célula com sequências de DNA dupla fita contendo erros de pareamento e inserções por meio do ensaio de EMSA. Esse ensaio em particular busca mostrar de maneira qualitativa a formação dos chamados complexos oligômero-proteína, que formam bandas no topo do gel, enquanto os oligômeros livres ficam no fim do gel.

Os resultados mostram que o aumento de hnRNP K nas células associado ao tratamento de MTX leva a redução da formação dos complexos oligômero-proteína com as sequências *mismatch* e +2IDL nas frações mitocondriais, sendo observado o oposto com U0126. Sabendo que há redução de hnRNP K disponível no citoplasma e mitocôndria, aliado do aumento da expressão de YB1 e p53, vê-se aqui um efeito negativo de hnRNP K no sistema de MMR mitocondrial, com hnRNP K possuindo um

efeito regulatório indireto sobre esses sistemas, uma vez que seu direcionamento para o núcleo favorece o MMR mitocondrial auxiliado por YB1 (SOUZA-PINTO et al., 2009).

Por fim, os ensaios de cometa, também conhecido como eletroforese de célula única, é uma técnica de análise de dano no material genético em uma única célula, por meio do arraste deixado pelo material genético após a eletroforese. A redução das caudas de cometa nas células superexpressando hnRNP K diante do tratamento de MTX mostra um efeito protetor de hnRNP K diante de danos no DNA genômico. Porém, conforme citado acima, a sua superexpressão leva ao aumento da atividade de MMR mitocondrial, levando-nos a inferir que o aumento de hnRNP K leva a um direcionamento de proteínas de reparo para o núcleo e favorece o MMR mitocondrial indiretamente. Uma vez que a hnRNP K age para proteção do material genético nuclear e identificamos sua relação positiva com proteínas de reparo de DNA tanto mitocondrial como nuclear, além dos resultados de interação oligômero-proteína mitocondrial, pode-se propor que o reparo do DNA mitocondrial nas condições estudadas deva ocorrer por outros mecanismos, como o reparo por excisão de bases. Futuros estudos serão necessários para caracterizar melhor os mecanismos envolvidos com essa nova e potencial função da hnRNP K no reparo de DNA.

6. Conclusão

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos podemos propor que a superexpressão de hnRNP K favorece uma maior resistência à morte celular, devido a sua ação no controle de proteínas envolvidas no reparo de DNA do tipo MMR e BER tanto no núcleo quanto na mitocôndria. Com este papel protetor, embora pareça não ter interação direta com YB1, propomos que a hnRNP K regula indiretamente o sistema MMR mitocondrial e os danos de DNA nuclear, protegendo a célula por meio de outros mecanismos, tal como a reprogramação metabólica, redução de estresse oxidativo, inibição de apoptose e controle da atividade de p53, visto que o acúmulo da hnRNP K no núcleo leva ao aumento da YB1 no núcleo e alteração de p53, que podem ser moléculas chave em vários mecanismos celulares associados à carcinogênese.

Em relação aos objetivos específicos deste trabalho, vimos que:

- A hnRNP K possui um efeito negativo no MMR mitocondrial, com sua depleção da mitocôndria levando a um aumento de YB1 na organela e ativação deste sistema de reparo;
- O tratamento das células NOK/hnRNP K com o metotrexato confirmaram o papel de hnRNP K na sinalização celular da via de p53, mostrando que seus níveis e localização são importantes para a função que a hnRNP K exercerá na célula com impacto na resposta à carcinogênese por meio de sua influência em p53;
- A inibição da via de MEK1,2/ERK por U0126, com consequente acúmulo de hnRNP K no núcleo, leva a um aumento dos níveis de p53, favorecendo não só uma via protetora de carcinogênese nuclear como também o MMR mitocondrial, uma vez que a redução dos níveis de hnRNP K na mitocôndria levam a um aumento de YB1 na organela, favorecendo o reparo do DNA mitocondrial.

7. Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-ZALABANI, A. Cancer incidence attributable to tobacco smoking in GCC countries in 2018. **Tobacco Induced Diseases**, v. 18, n. March, 19 mar. 2020.

ATTARDI, G.; SCHATZ, G. Biogenesis of Mitochondria. **Annual Review of Cell Biology**, v. 4, n. 1, p. 289–331, nov. 1988.

BARBORO, P. et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K: altered pattern of expression associated with diagnosis and prognosis of prostate cancer. **British Journal of Cancer**, v. 100, n. 10, p. 1608–1616, maio 2009.

BARBORO, P.; FERRARI, N.; BALBI, C. Emerging roles of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) in cancer progression. **Cancer Letters**, v. 352, n. 2, p. 152–159, out. 2014.

BEDFORD, M. T.; CLARKE, S. G. Protein Arginine Methylation in Mammals: Who, What, and Why. **Molecular Cell**, v. 33, n. 1, p. 1–13, jan. 2009.

BIEGING, K. T.; MELLO, S. S.; ATTARDI, L. D. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 5, p. 359–370, maio 2014.

BOGUNOVIC, D. et al. Immune profile and mitotic index of metastatic melanoma lesions enhance clinical staging in predicting patient survival. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 48, p. 20429–20434, dez. 2009.

BOMSZTYK, K.; DENISENKO, O.; OSTROWSKI, J. hnRNP K: One protein multiple processes. **BioEssays**, v. 26, n. 6, p. 629–638, jun. 2004.

BROWN, W. M.; GEORGE, M.; WILSON, A. C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 4, p. 1967–1971, abr. 1979.

CARPENTER, B. et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is over expressed, aberrantly localised and is associated with poor prognosis in colorectal cancer. **British Journal of Cancer**, v. 95, n. 7, p. 921–927, out. 2006.

CASTILHO, R. M. et al. Rac1 Is Required for Epithelial Stem Cell Function during Dermal and Oral Mucosal Wound Healing but Not for Tissue Homeostasis in Mice. **PLoS ONE**, v. 5, n. 5, p. e10503, 6 maio 2010.

CHAN, J. Y.-H. et al. The transactivation domain of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K overlaps its nuclear shuttling domain. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 40, n. 10, p. 2078–2089, jan. 2008.

CHATTERJEE, A.; MAMBO, E.; SIDRANSKY, D. Mitochondrial DNA mutations in human cancer. **Oncogene**, v. 25, n. 34, p. 4663–4674, 7 ago. 2006.

CHEN, L.-C. et al. Thymidine phosphorylase mRNA stability and protein levels are increased through ERK-mediated cytoplasmic accumulation of hnRNP K in nasopharyngeal carcinoma cells. **Oncogene**, v. 28, n. 17, p. 1904–1915, 30 abr. 2009.

CHEN, X. et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is associated with poor prognosis and regulates proliferation and apoptosis in bladder cancer. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 21, n. 7, p. 1266–1279, jul. 2017.

CHEN, X. et al. Identification of HnRNP Family as Prognostic Biomarkers in Five Major Types of Gastrointestinal Cancer. **Current Gene Therapy**, v. 22, n. 5, p. 449–461, out. 2022.

CHEN, Y. et al. Arginine methylation of hnRNP K enhances p53 transcriptional activity. **FEBS Letters**, v. 582, n. 12, p. 1761–1765, 28 maio 2008a.

CHEN, Y. et al. Arginine methylation of hnRNP K enhances p53 transcriptional activity. **FEBS Letters**, v. 582, n. 12, p. 1761–1765, 28 maio 2008b.

CHOI, Y. D. et al. Heterogeneous Nuclear Ribonucleoproteins: Role in RNA Splicing. **Science**, v. 231, n. 4745, p. 1534–1539, 28 mar. 1986.

COFFEY, G.; LAKSHMIPATHY, U.; CAMPBELL, C. Mammalian mitochondrial extracts possess DNA end-binding activity. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 16, p. 3348–3354, 1 ago. 1999.

COHEN, N.; FEDEWA, S.; CHEN, A. Y. Epidemiology and Demographics of the Head and Neck Cancer Population. **Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America**, v. 30, n. 4, p. 381–395, nov. 2018.

CRAMER, J. D. et al. The changing therapeutic landscape of head and neck cancer. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 16, n. 11, p. 669–683, nov. 2019.

CZABOTAR, P. E. et al. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 1, p. 49–63, jan. 2014.

DAHAL, S.; DUBEY, S.; RAGHAVAN, S. C. Homologous recombination-mediated repair of DNA double-strand breaks operates in mammalian mitochondria. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 75, n. 9, p. 1641–1655, maio 2018.

DAL MASO, L. et al. Combined effect of tobacco smoking and alcohol drinking in the risk of head and neck cancers: a re-analysis of case-control studies using bi-

dimensional spline models. **European Journal of Epidemiology**, v. 31, n. 4, p. 385–393, abr. 2016.

DECKERT, J. et al. Protein Composition and Electron Microscopy Structure of Affinity-Purified Human Spliceosomal B Complexes Isolated under Physiological Conditions. **Molecular and Cellular Biology**, v. 26, n. 14, p. 5528–5543, 15 jul. 2006.

DEJGAARD, K.; LEFFERS, H. Characterisation of the Nucleic-Acid-Binding Activity of KH Domains Different Properties of Different Domains. **European Journal of Biochemistry**, v. 241, n. 2, p. 425–431, out. 1996.

DIANOV, G. L. et al. Base excision repair in nuclear and mitochondrial DNA. Em: **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**. [s.l.] Elsevier, 2001. v. 68p. 285–297.

DMITRIEVA, N. I.; MALIDE, D.; BURG, M. B. Mre11 is expressed in mammalian mitochondria where it binds to mitochondrial DNA. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 301, n. 3, p. R632–R640, set. 2011.

DREYFUSS, G. et al. hnRNP Proteins and the Biogenesis of mRNA. **Annual Review of Biochemistry**, n. 62, p. 289–321, 1993.

DUPRIE, M. L. et al. Mlh1 interacts with both Msh2 and Msh6 for recruitment during mismatch repair. **DNA Repair**, v. 119, p. 103405, nov. 2022.

DUTERTRE, M. et al. Cotranscriptional exon skipping in the genotoxic stress response. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 17, n. 11, p. 1358–1366, nov. 2010.

EDER, S. et al. Radiosensitization and downregulation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) upon inhibition of mitogen/extracellular signal-regulated kinase (MEK) in malignant melanoma cells. **Oncotarget**, v. 6, n. 19, p. 17178–17191, 10 jul. 2015.

ENGE, M. et al. MDM2-Dependent Downregulation of p21 and hnRNP K Provides a Switch between Apoptosis and Growth Arrest Induced by Pharmacologically Activated p53. **Cancer Cell**, v. 15, n. 3, p. 171–183, mar. 2009.

FAN, B. et al. Heterogeneous Ribonucleoprotein K (hnRNP K) Binds miR-122, a Mature Liver-Specific MicroRNA Required for Hepatitis C Virus Replication. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 14, n. 11, p. 2878–2886, nov. 2015.

FEI, T. et al. Genome-wide CRISPR screen identifies HNRNPL as a prostate cancer dependency regulating RNA splicing. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 26, 27 jun. 2017.

FERLAY, J. et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **International Journal of Cancer**, v. 144, n. 8, p. 1941–1953, 15 abr. 2019.

GALLARDO, M. et al. Uncovering the Role of RNA-Binding Protein hnRNP K in B-Cell Lymphomas. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, 11 maio 2019.

GAO, X. et al. hnRNPK inhibits GSK3 β Ser9 phosphorylation, thereby stabilizing c-FLIP and contributes to TRAIL resistance in H1299 lung adenocarcinoma cells. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 22999, mar. 2016.

GARCIA, C. B. Acúmulo da ribonucleoproteína heterogênea nuclear K em câncer de cabeça e pescoço: estudos mitocondriais. p. 96, 2014.

GAUDREAU, I. YB-1 promotes strand separation in vitro of duplex DNA containing either mispaired bases or cisplatin modifications, exhibits endonucleolytic activities and binds several DNA repair proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 1, p. 316–327, 2 jan. 2004.

GUO, Y. et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) is a tissue biomarker for detection of early Hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 5, n. 1, p. 37, dez. 2012.

HABELHAH, H. et al. ERK phosphorylation drives cytoplasmic accumulation of hnRNP-K and inhibition of mRNA translation. **Nature Cell Biology**, v. 3, n. 3, p. 325–330, mar. 2001a.

HABELHAH, H. et al. Identification of New JNK Substrate Using ATP Pocket Mutant JNK and a Corresponding ATP Analogue. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 21, p. 18090–18095, maio 2001b.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31–46, 1 jan. 2022.

HOBERT, O. et al. Novel Signaling Pathway Suggested by SH3 Domain-mediated p95vav/Heterogeneous Ribonucleoprotein K Interaction. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 32, p. 20225–20228, 12 ago. 1994.

HUTCHINS, E. J.; BELROSE, J. L.; SZARO, B. G. A novel role for the nuclear localization signal in regulating hnRNP K protein stability in vivo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 478, n. 2, p. 772–776, set. 2016.

HUTCHINS, E. J.; SZARO, B. G. c-Jun N-Terminal Kinase Phosphorylation of Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K Regulates Vertebrate Axon Outgrowth via a Posttranscriptional Mechanism. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 37, p. 14666–14680, 11 set. 2013.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÁ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil/Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro: INCA, 2019.

IZUMI, H. Y box-binding protein-1 binds preferentially to single-stranded nucleic acids and exhibits 3'→5' exonuclease activity. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 5, p. 1200–1207, 1 mar. 2001.

IZZO, V. et al. Mitochondrial Permeability Transition: New Findings and Persisting Uncertainties. **Trends in Cell Biology**, v. 26, n. 9, p. 655–667, set. 2016.

Jl, L. et al. LINC01413/hnRNP-K/ZEB1 Axis Accelerates Cell Proliferation and EMT in Colorectal Cancer via Inducing YAP1/TAZ1 Translocation. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, v. 19, p. 546–561, mar. 2020.

JOHNSON, D. E. et al. Head and neck squamous cell carcinoma. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 6, n. 1, p. 92, dez. 2020.

JÜRCHOTT, K. et al. Identification of Y-Box Binding Protein 1 As a Core Regulator of MEK/ERK Pathway-Dependent Gene Signatures in Colorectal Cancer Cells. **PLoS Genetics**, v. 6, n. 12, p. e1001231, 2 dez. 2010.

KAZAK, L.; REYES, A.; HOLT, I. J. Minimizing the damage: repair pathways keep mitochondrial DNA intact. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 10, p. 659–671, out. 2012.

KIMURA, Y. et al. Characterization of multiple alternative forms of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K by phosphate-affinity electrophoresis. **PROTEOMICS**, v. 10, n. 21, p. 3884–3895, nov. 2010.

KLIMEK-TOMCZAK, K. et al. Characterization of hnRNP K Protein–RNA Interactions. **Journal of Molecular Biology**, v. 342, n. 4, p. 1131–1141, set. 2004.

KWIEK, N. C. et al. PITK, a PP1 targeting subunit that modulates the phosphorylation of the transcriptional regulator hnRNP K. **Cellular Signalling**, v. 18, n. 10, p. 1769–1778, out. 2006.

LAMBERT, A. J.; BRAND, M. D. Reactive Oxygen Species Production by Mitochondria. Em: STUART, J. A. (Ed.). **Mitochondrial DNA**. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press, 2009. v. 554p. 165–181.

LASHAM, A. et al. The Y-box-binding Protein, YB1, Is a Potential Negative Regulator of the p53 Tumor Suppressor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 37, p. 35516–35523, set. 2003.

- LAVOIE, H.; GAGNON, J.; THERRIEN, M. ERK signalling: a master regulator of cell behaviour, life and fate. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, n. 10, p. 607–632, out. 2020.
- LEOPOLDINO, A. M. et al. Sequence and transcriptional study of *HNRPK* pseudogenes, and expression and molecular modeling analysis of hnRNP K isoforms. **Genome**, v. 50, n. 5, p. 451–462, maio 2007.
- LI, L. et al. Interaction of hnRNP K with MAP 1B-LC1 promotes TGF- β 1-mediated epithelial to mesenchymal transition in lung cancer cells. **BMC Cancer**, v. 19, n. 1, p. 894, dez. 2019.
- LIBERTI, M. V.; LOCASALE, J. W. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? **Trends in Biochemical Sciences**, v. 41, n. 3, p. 211–218, mar. 2016.
- LIEPELT, A. et al. Translation control of TAK1 mRNA by hnRNP K modulates LPS-induced macrophage activation. **RNA**, v. 20, n. 6, p. 899–911, jun. 2014.
- LIÈVRE, A. et al. Clinicopathological significance of mitochondrial D-Loop mutations in head and neck carcinoma. **British Journal of Cancer**, v. 94, n. 5, p. 692–697, mar. 2006.
- LIU, L. et al. MRPL33 and its splicing regulator hnRNPK are required for mitochondria function and implicated in tumor progression. **Oncogene**, v. 37, n. 1, p. 86–94, jan. 2018.
- LONGLEY, M. J. et al. Identification of 5'-deoxyribose phosphate lyase activity in human DNA polymerase γ and its role in mitochondrial base excision repair *in vitro*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 21, p. 12244–12248, 13 out. 1998.
- LUI, V. W. Y. et al. Frequent Mutation of the PI3K Pathway in Head and Neck Cancer Defines Predictive Biomarkers. **Cancer Discovery**, v. 3, n. 7, p. 761–769, 1 jul. 2013.
- MAKEYEV, A. V.; LIEBHABER, S. A. The poly(C)-binding proteins: A multiplicity of functions and a search for mechanisms. **RNA**, v. 8, n. 3, p. 265–278, mar. 2002.
- MANDAL, M. et al. Growth Factors Regulate Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K Expression and Function. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 13, p. 9699–9704, mar. 2001.
- MARTIN, S. A. et al. Methotrexate induces oxidative DNA damage and is selectively lethal to tumour cells with defects in the DNA mismatch repair gene *MSH2*. **EMBO Molecular Medicine**, v. 1, n. 6-7, p. 323–337, set. 2009.

MARTIN, W.; MÜLLER, M. The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. **Nature**, v. 392, n. 6671, p. 37–41, mar. 1998.

MASON, P. A. Mismatch repair activity in mammalian mitochondria. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 3, p. 1052–1058, 1 fev. 2003.

MEHANNA, H. et al. Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer—systematic review and meta-analysis of trends by time and region. p. 9, 2013.

MICHAEL, W. M.; EDER, P., S.; DREYFUSS, G. The K nuclear shuttling domain: a novel signal for nuclear import and nuclear export in the hnRNP K protein. **The EMBO Journal**, v. 16, n. 12, p. 3587–3598, 15 jun. 1997.

MICHAUD, D. S. et al. High-risk HPV types and head and neck cancer: HPV and HNSCC Among HPV16 Negatives. **International Journal of Cancer**, v. 135, n. 7, p. 1653–1661, 1 out. 2014.

MICHELOTTI, E. F. et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is a transcription factor. **Molecular and Cellular Biology**, v. 16, n. 5, p. 2350–2360, maio 1996.

MIKULA, M. et al. Landscape of the hnRNP K protein–protein interactome. **PROTEOMICS**, v. 6, n. 8, p. 2395–2406, abr. 2006.

MIKULA, M.; BOMSZTYK, K. Direct Recruitment of ERK Cascade Components to Inducible Genes Is Regulated by Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein (hnRNP) K. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 11, p. 9763–9775, mar. 2011.

MITCHELL, P. Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic type of Mechanism. **Nature**, v. 191, n. 4784, p. 144–148, jul. 1961.

MOUMEN, A. et al. ATM-dependent phosphorylation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K promotes p53 transcriptional activation in response to DNA damage. **Cell Cycle**, v. 12, n. 4, p. 698–704, 15 fev. 2013.

MOUMEN, A. et al. hnRNP K: An HDM2 Target and Transcriptional Coactivator of p53 in Response to DNA Damage. **Cell**, v. 123, n. 6, p. 1065–1078, dez. 2005.

NAARMANN-DE VRIES, I. S. et al. Caspase-3 cleaves hnRNP K in erythroid differentiation. **Cell Death & Disease**, v. 4, n. 3, p. e548–e548, mar. 2013.

NAARMANN, I. S. et al. mRNA Silencing in Human Erythroid Cell Maturation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 26, p. 18461–18472, jun. 2008.

NAGANO, K. et al. Differential protein synthesis and expression levels in normal and neoplastic human prostate cells and their regulation by type I and II interferons. **Oncogene**, v. 23, n. 9, p. 1693–1703, 4 mar. 2004.

NOTARI, M. et al. A MAPK/HNRPK pathway controls BCR/ABL oncogenic potential by regulating MYC mRNA translation. **Blood**, v. 107, n. 6, p. 2507–2516, 15 mar. 2006.

OSTARECK-LEDERER, A. et al. Asymmetric Arginine Dimethylation of Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K by Protein-arginine Methyltransferase 1 Inhibits Its Interaction with c-Src. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 16, p. 11115–11125, 21 abr. 2006.

OSTARECK-LEDERER, A. et al. c-Src-Mediated Phosphorylation of hnRNP K Drives Translational Activation of Specifically Silenced mRNAs. **Molecular and Cellular Biology**, v. 22, n. 13, p. 4535–4543, 1 jul. 2002.

OSTROWSKI, J. et al. Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K Protein Associates with Multiple Mitochondrial Transcripts within the Organelle. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 8, p. 6303–6310, fev. 2002.

PARK, Y. M. et al. Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein C1/C2 Controls the Metastatic Potential of Glioblastoma by Regulating PDCD4. **Molecular and Cellular Biology**, v. 32, n. 20, p. 4237–4244, 15 out. 2012.

PELISCH, F. et al. DNA Damage-induced Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K SUMOylation Regulates p53 Transcriptional Activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 36, p. 30789–30799, ago. 2012.

PFANNER, N.; WARSCHEID, B.; WIEDEMANN, N. Mitochondrial proteins: from biogenesis to functional networks. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, n. 5, p. 267–284, maio 2019.

PICKERING, C. R. et al. Integrative Genomic Characterization of Oral Squamous Cell Carcinoma Identifies Frequent Somatic Drivers. **Cancer Discovery**, v. 3, n. 7, p. 770–781, 1 jul. 2013.

PINZ, K. G.; BOGENHAGEN, D. F. Efficient Repair of Abasic Sites in DNA by Mitochondrial Enzymes. **Molecular and Cellular Biology**, v. 18, n. 3, p. 1257–1265, mar. 1998.

PRAKASH, A.; DOUBLIÉ, S. Base Excision Repair in the Mitochondria: MITOCHONDRIAL BASE EXCISION REPAIR. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 116, n. 8, p. 1490–1499, ago. 2015.

QIN, G. et al. Long Noncoding RNA p53-Stabilizing and Activating RNA Promotes p53 Signaling by Inhibiting Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K deSUMOylation

and Suppresses Hepatocellular Carcinoma. **Hepatology**, v. 71, n. 1, p. 112–129, jan. 2020.

REVIL, T. et al. Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K Represses the Production of Pro-apoptotic Bcl-xS Splice Isoform. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 32, p. 21458–21467, ago. 2009.

REYES, A. et al. Asymmetrical directional mutation pressure in the mitochondrial genome of mammals. **Molecular Biology and Evolution**, v. 15, n. 8, p. 957–966, 1 ago. 1998.

RITCHIE, S. A. Identification of the SRC pyrimidine-binding protein (SPy) as hnRNP K: implications in the regulation of SRC1A transcription. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 5, p. 1502–1513, 1 mar. 2003.

RYU, H. G. et al. HNRNP A1 Promotes Lung Cancer Cell Proliferation by Modulating VRK1 Translation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 11, p. 5506, 23 maio 2021.

SABHARWAL, S. S.; SCHUMACKER, P. T. Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 11, p. 709–721, nov. 2014.

SAGAN, L. On the origin of mitosing cells. **Journal of Theoretical Biology**, v. 14, n. 3, p. 225–IN6, mar. 1967.

SAGE, J. M.; GILDEMEISTER, O. S.; KNIGHT, K. L. Discovery of a novel function for human Rad51: Maintenance of the mitochondrial genome. **Mitochondrion**, v. 11, n. 4, p. 676, jul. 2011.

SHARMA, P.; SAMPATH, H. Mitochondrial DNA Integrity: Role in Health and Disease. **Cells**, v. 8, n. 2, p. 100, 29 jan. 2019.

SHIN, C. H. et al. Regulation of PLK1 through competition between hnRNPK, miR-149-3p and miR-193b-5p. **Cell Death & Differentiation**, v. 24, n. 11, p. 1861–1871, nov. 2017.

SI, H. W. et al. ERK1/2-mediated Cytoplasmic Accumulation of hnRNPK Antagonizes TRAIL-induced Apoptosis through Upregulation of XIAP in H1299 Cells. **Biomed Environ Sciences**, v. 30, n. 7, p. 473–481, 2017.

SIA, E. A. Mitochondrial DNA repair and damage tolerance. **Frontiers in Bioscience**, v. 22, n. 5, p. 920–943, 2017.

SIES, H.; JONES, D. P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, n. 7, p. 363–383, 15 jul. 2020.

SIMSEK, D. et al. Crucial role for DNA ligase III in mitochondria but not in Xrcc1-dependent repair. **Nature**, v. 471, n. 7337, p. 245–248, mar. 2011.

SIOMI, H. et al. The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif. **Nucleic Acids Research**, v. 21, n. 5, p. 1193–1198, 11 mar. 1993.

SONG, S. et al. DNA precursor asymmetries in mammalian tissue mitochondria and possible contribution to mutagenesis through reduced replication fidelity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 14, p. 4990–4995, 5 abr. 2005.

SOUZA-PINTO, N. C. et al. Novel DNA mismatch-repair activity involving YB-1 in human mitochondria. **DNA Repair**, v. 8, n. 6, p. 704–719, jun. 2009.

SUK, F.-M. et al. Bortezomib inhibits Burkitt's lymphoma cell proliferation by downregulating sumoylated hnRNP K and c-Myc expression. **Oncotarget**, v. 6, n. 28, p. 25988–26001, 22 set. 2015.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.

TAKAO, M. et al. Mitochondrial targeting of human DNA glycosylases for repair of oxidative DNA damage. **Nucleic Acids Research**, v. 26, n. 12, p. 2917–2922, 1 jun. 1998.

TAKIMOTO, M. et al. Specific binding of heterogeneous ribonucleoprotein particle protein K to the human c-myc promoter, in vitro. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 24, p. 18249–18258, ago. 1993.

TANAKA, M.; OZAWA, T. Strand Asymmetry in Human Mitochondrial DNA Mutations. **Genomics**, v. 22, n. 2, p. 327–335, jul. 1994.

TANG, J. et al. PRMT1 Is the Predominant Type I Protein Arginine Methyltransferase in Mammalian Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 11, p. 7723–7730, mar. 2000.

THE CANCER GENOME ATLAS NETWORK. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. **Nature**, v. 517, n. 7536, p. 576–582, 29 jan. 2015.

THYAGARAJAN, B.; PADUA, R. A.; CAMPBELL, C. Mammalian Mitochondria Possess Homologous DNA Recombination Activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 44, p. 27536–27543, nov. 1996.

TOMONAGA, T.; LEVENS, D. Activating transcription from single stranded DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 12, p. 5830–5835, 11 jun. 1996.

TRIFUNOVIC, A. et al. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. **Nature**, v. 429, n. 6990, p. 417–423, maio 2004.

TYSON-CAPPER, A.; GAUTREY, H. Regulation of Mcl-1 alternative splicing by hnRNP F, H1 and K in breast cancer cells. **RNA Biology**, v. 15, n. 12, p. 1448–1457, 2 dez. 2018.

VAZQUEZ, F. et al. PGC1 α Expression Defines a Subset of Human Melanoma Tumors with Increased Mitochondrial Capacity and Resistance to Oxidative Stress. **Cancer Cell**, v. 23, n. 3, p. 287–301, mar. 2013.

WANG, X. et al. PTBP1 promotes the growth of breast cancer cells through the PTEN/Akt pathway and autophagy. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 11, p. 8930–8939, nov. 2018.

WEN, F. et al. Higher Expression of the Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K in Melanoma. **Annals of Surgical Oncology**, v. 17, n. 10, p. 2619–2627, out. 2010.

WISNOVSKY, S.; JEAN, S. R.; KELLEY, S. O. Author Correction: Mitochondrial DNA repair and replication proteins revealed by targeted chemical probes. **Nature Chemical Biology**, v. 14, n. 9, p. 901–901, set. 2018.

XIA, A. et al. The cancer-testis lncRNA lnc-CTHCC promotes hepatocellular carcinogenesis by binding hnRNP K and activating YAP1 transcription. **Nature Cancer**, v. 3, n. 2, p. 203–218, fev. 2022.

XIAO, Z. et al. hnRNP K suppresses apoptosis independent of p53 status by maintaining high levels of endogenous caspase inhibitors. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 7, p. 1458–1467, jul. 2013.

YANG, J. et al. ATM and ATR: Sensing DNA damage. **World Journal of Gastroenterology**, v. 10, n. 2, p. 155, 2004.

YANG, R. et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is overexpressed and associated with poor prognosis in gastric cancer. **Oncology Reports**, v. 36, n. 2, p. 929–935, ago. 2016.

YANG, X. et al. *LCDR* regulates the integrity of lysosomal membrane by hnRNP K–stabilized *LAPTM5* transcript and promotes cell survival. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 119, n. 5, p. e2110428119, fev. 2022.

YU, C. et al. Oral squamous cancer cell exploits hnRNP A1 to regulate cell cycle and proliferation: hnRNP A1 REGULATES CELL CYCLE IN CANCER CELLS. **Journal of Cellular Physiology**, v. 230, n. 9, p. 2252–2261, set. 2015.

