



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

**CAROLINA COLLETI**

HABP4 e o câncer de cólon: caracterização do papel da HABP4 em células  
tumorais e em modelo animal

*HABP4 and colon cancer: characterization of the HABP4 role in tumor  
cells and animal model*

CAMPINAS

2020

**CAROLINA COLLETI**

**HABP4 e o câncer de cólon: caracterização do papel da HABP4 em células tumorais e em modelo animal**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências, na área de Ciências Farmacêuticas – Insumos Farmacêuticos Naturais, Biotecnológicos e Sintéticos

**Orientador: Prof. Dr. Jorg Kobarg**

Este trabalho corresponde à versão final da dissertação defendida pela aluna **Carolina Colleti**, e orientada pelo **Prof. Dr. Jorg Kobarg**.

CAMPINAS

2020

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

C688h Colleti, Carolina, 1993-  
HABP4 e o câncer de cólon : caracterização do papel da HABP4 em células tumorais e em modelo animal / Carolina Colleti. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Jorg Kobarg.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

1. HABP4. 2. Neoplasias colorretais. 3. Proliferação celular. 4. Dano ao DNA. I. Kobarg, Jorg, 1965-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** HABP4 and colon cancer : characterization of the HABP4 role in tumor cells and animal model

**Palavras-chave em inglês:**

HABP4

Colorectal neoplasms

Cell proliferation

DNA damage

**Área de concentração:** Ciências Farmacêuticas: insumos farmacêuticos naturais, biotecnológicos e sintéticos

**Titulação:** Mestra em Ciências

**Banca examinadora:**

Jörg Kobarg

Carmen Veríssima Ferreira Halder

Juliana Helena Costa Smetana

**Data de defesa:** 20-02-2020

**Programa de Pós-Graduação:** Ciências Farmacêuticas

**Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)**

- ORCID do autor: <http://orcid.org/0000-0001-7626-560>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/9076772104549063>

## **BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Jorg kobarg (Orientador)

Profa. Dra. Carmen Veríssima Ferreira Halder (Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNICAMP)

Profa. Dra. Juliana Helena Costa Smetana (Laboratório Nacional de Biociências - LNBio)

A Ata da defesa assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida pela aluna **Carolina Colleti**, aprovada pela Comissão Julgadora em **20 de Fevereiro de 2020**.



Dedico este trabalho ao meu pai, João Emilio Colleti, que sempre me apoiou em todas as minhas decisões, sempre se orgulhou das minhas conquistas e sofreu comigo por todos os percalços ao longo do meu caminho. Nada me faria mais feliz do que poder comemorar com você a finalização deste trabalho.

Sinto sua falta todos os dias.

Te amo incondicionalmente e para sempre!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Jörg Kobarg pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, por todas as oportunidades que tive por ser sua orientanda e por tudo o que eu aprendi nesses dois anos. Sou grata por todas as conversas que tivemos e por me mostrar que o trabalho estava seguindo pelo caminho certo. Obrigada.

Também agradeço a todo grupo LMS: Luidy, Isadora, Camila, Fernando, Pedro, Flávia, Andressa, Mariana, Fernanda, Erika e Talita, por todas as conversas, ajuda nos experimentos, por me acalmarem quando batia o desespero e também por todos os almoços (nada saudáveis) que fizemos! Vocês tornaram meus dias mais divertidos. Em especial, gostaria de agradecer a Dra. Talita por ter me ensinado tanto desde que entrei no lab, por toda a paciência que teve em discutir comigo sempre que precisei, e, juntamente com a Erika, por terem se tornado amigas que levarei para vida toda.

Sou grata a todos meus amigos, de antes e os que tive o prazer de conhecer ao longo do mestrado, que de alguma maneira me ajudaram nesse processo, direta ou indiretamente. A amizade de cada um fez com que esses dois anos fossem mais leves.

Agradeço à minha família, minha mãe Márcia e aos meus irmãos Pedro e Júlia, por absolutamente tudo. Por me apoiarem na minha decisão de mudar para Campinas, por sempre me ajudar em tudo o que precisei, por cada palavra de motivação e carinho e por acreditarem em mim mais do que eu mesma. Vocês são a minha base, meu porto seguro, e devo tudo a vocês! Amo vocês.

Ao meu namorado, Thiago, que é meu melhor amigo, meu parceiro e incentivador, que mesmo distante se faz presente na minha vida, que sempre se mostra disponível para escutar minhas histórias, tirar minhas dúvidas e me acalmar. Sem você esse trabalho não seria a mesma coisa.

À UNICAMP, em especial a Faculdade de Ciências Farmacêuticas e o Instituto de Biologia, por toda infraestrutura disponibilizada, e agradeço aos professores que contribuíram para minha formação acadêmica.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo financiamento do meu projeto de mestrado (processo 2017/20266-6).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), a qual eu agradeço.

## RESUMO

A proteína HABP4 foi inicialmente identificada por meio da reação cruzada com o anticorpo Ki-1, o qual reconhece células malignas de linfoma de Hodgkin. Desde sua descoberta, muito esforço foi aplicado para sua caracterização estrutural e funcional. Hoje é sabido que ela sofre diversos tipos de modificações pós-traducionais, como fosforilação, metilação e SUMOilação, e que faz parte da classe de proteínas intrinsecamente desenoveladas. Essas e outras características identificadas, como translocação entre núcleo e citoplasma, e atividade de regulação da transcrição, sugerem que a HABP4 possa ter relação com processos cancerosos. A HABP4 tem uma proteína paróloga, a SERBP1, que compartilha 40,7% de identidade e 67,4% de similaridade, além de apresentar localização citoplasmática e nuclear, o que indica que possam ter funções similares ou até mesmo redundantes nas células. Experimentos de duplo-híbrido e de análise de expressão genica global por microarranjos de DNA realizados pelo grupo de pesquisa identificaram 413 genes que tiveram sua expressão alterada pela superexpressão da HABP4 (88% regulados negativamente). A maior parte dos genes estão relacionados a proliferação, ciclo celular e apoptose, o que aponta seu envolvimento em mecanismos de resposta celular ao estresse. No presente trabalho é apresentado o efeito da ausência da HABP4 em camundongos e em linhagem celular de carcinoma colorretal humano. No modelo animal foi observado que a falta da HABP4 leva a uma maior taxa de proliferação das células intestinais, e que a expressão das proteínas PCNA e Ciclina D1 estão elevadas nos animais nocaute, mesmo sem a indução de tumor pelo tratamento com AOM/DSS, mostrando que o nocaute confere uma pré-disposição genética ao desenvolvimento de câncer colorretal. O nocaute de HABP4 em células humanas HCT116 foi obtido com sucesso e a caracterização da ausência desta proteína mostrou que, assim como nos animais, ocorre um aumento na proliferação celular. Ademais, é apresentado a resposta ao dano de DNA causado por etoposídeo, em que as células nocautes apresentam menor expressão de  $\gamma$ H2AX. Em resposta a falta da  $\gamma$ H2AX, durante o ciclo celular não há parada no ponto de checagem em G2/M, permitindo que as células nocaute acumulem erros no DNA.

**Palavras-chave:** HABP4, câncer colorretal, proliferação celular, dano ao DNA.

## ABSTRACT

HABP4 protein was first identified by cross-reacting with the Ki-1 antibody, which recognizes malignant Hodgkin's lymphoma cells. Since its discovery, effort has been made to characterize its structure and function. It has been shown that HABP4 undergoes several types of post-translational modifications, such as phosphorylation, methylation and SUMOylation, and it is part of the intrinsically unstructured class of proteins. These and other identified features, such as shuttling between nucleus and cytoplasm and transcriptional regulation activity, suggest that HABP4 may be involved in cancerous processes. HABP4 has a paralogue protein, SERBP1, that shares 40.7% identity and 67.4% similarity with HABP4 and possesses nuclear and cytoplasmic localization, indicating likely similar or redundant functions in cells. Yeast two-hybrid experiments and global gene expression analysis by DNA microarray performed by our group identified 413 genes with altered expression profile by HABP4 overexpression (88% down-regulated). Most genes were related to proliferation, cell cycle and apoptosis, which indicates their involvement in cellular stress response mechanisms. In this work the effects of HABP4 deletion in mouse and in human colorectal carcinoma cell line are presented. In mouse model, HABP4 deletion leads to a higher rate of intestinal cell proliferation. PCNA and Cyclin D1 expression were found to be elevated in knockout animals, even in the absence of tumor induction by AOM/DSS treatment, showing that the HABP4 knockout confers a genetic susceptibility to colorectal cancer development. HABP4 knockout in human HCT116 cells was successfully obtained and revealed increase in cell proliferation, as observed in mice. Moreover, DNA damage response caused by etoposide is presented. It was observed that knockout cells have lower  $\gamma$ H2AX expression. Therefore, during the cell cycle there is no G2 / M checkpoint stop, allowing knockout cells to accumulate DNA errors.

**Keywords:** HABP4, colorectal cancer, cell proliferation, DNA damage.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Modelo <i>ab initio</i> do C-terminal da HABP4 obtido por SAXS.....	16
Figura 2: Análise de bioinformática comparativa entre HABP4 e SERBP1.....	17
Figura 3: Interactoma da HABP4.....	20
Figura 4: Mutações na HABP4 em diferentes tipos de câncer.....	21
Figura 5: Taxas de incidência bruta de câncer colorretal estimadas em 2018.....	22
Figura 6: Progressão do CRC.....	22
Figura 7: Protocolo de indução de câncer colorretal induzido por colite.....	27
Figura 8: Plasmídeos do sistema CRISPR/Cas9 Santa Cruz Biotechnology.....	29
Figura 9: Identificação de anticorpos específicos anti-HABP4 endógena.....	34
Figura 10: Confirmação do nocaute do gene <i>Habp4</i> nos animais.....	36
Figura 11: Aumento da proliferação no cólon dos animais nocaute.....	37
Figura 12: Alteração da expressão proteica de Ciclina D1 e PCNA no cólon de animais nocaute.....	39
Figura 13: Quantificação do resultado de <i>western blot</i> da Figura 12.....	39
Figura 14: <i>Cell sorting</i> CRISPR/Cas9 da HABP4.....	40
Figura 15: Confirmação do nocaute de HABP4 em células HCT116.....	41
Figura 16: Sequenciamento do clone 8G.....	41
Figura 17: Análise da sequência proteica do clone 8G.....	43
Figura 18: Ensaio clonogênico mostrando maior proliferação celular do nocaute de HABP4.....	44
Figura 19: Ensaio de proliferação CCK8 com células nocaute e controle.....	45
Figura 20: Expressão de PCNA em células controle e nocaute.....	45
Figura 21: Diminuição de $\gamma$ H2AX em células nocautes.....	46
Figura 22: Ausência de focos de $\gamma$ H2AX em células nocautes.....	47
Figura 23: Células nocaute apresentam falha no <i>checkpoint</i> G2/M.....	48

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Anticorpos utilizados nos ensaios de <i>Western Blot</i> .....	26
Tabela 2: <i>Primers</i> para validação do nocaute de HABP4.....	31

## LISTA DE ABREVIACÇÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C: Graus Celsius

AOM: Azoximetano

BrdU: Bromodesoxiuridina

cDNA: *Complementary deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico complementar)

CRISPR/Cas9: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas)

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Meio Eagle modificado por Dulbecco)

DNA: *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

DSS: Dextran Sulfato de Sódio

g: Grama

h: Hora

HABP4: *Hyaluronic acid binding protein 4* (Proteína de ligação ao ácido hialurônico 4)

HDR: *Homology-Directed Repair* (Reparo por Homologia)

kDa: Quilo Dalton

min: Minuto

MM: Massa Molecular

mRNA: *Messenger ribonucleic acid* (ácido ribonucleico mensageiro)

p53: Proteína tumoral de 53 kDa

PCNA: *Proliferating cell nuclear antigen* (antígeno nuclear de proliferação celular)

PEI: *Polyethylenimine* (Polietilenimina)

pH: Potencial hidrogeniônico

SDS-PAGE: *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio)

SERBP1: *Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein* (Proteína de ligação ao RNA do inibidor do ativador de plasminogênio 1)

SFB: Soro fetal bovino

sgRNA: *single guide ribonucleic acid* (guia único de ácido ribonucleico)

CCK8: *Cell counting kit 8* (kit de contagem de células 8)

CRC: Câncer colorretal

cm: Centímetro ( $10^{-2}$  metro)

mg: Miligrama ( $10^{-3}$  grama)

mL: Mililitro ( $10^{-3}$  litro)

mmol: Milimol ( $10^{-3}$  mol)

$\mu\text{g}$ : Micrograma ( $10^{-6}$  grama)

$\mu\text{L}$ : Microlitro ( $10^{-6}$  litro)

nm: Nanômetro ( $10^{-9}$  metro)



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1 A proteína HABP4.....	15
1.2 Estrutura da HABP4.....	16
1.3 A proteína paróloga SERBP1.....	17
1.4 Contexto funcional.....	17
1.5 HABP4 e sua relação com câncer.....	20
1.6 Câncer de colorretal.....	21
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	24
2.1 Objetivos gerais.....	24
2.2 Objetivos específicos.....	24
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	25
3.1 Cultura celular.....	25
3.2 Lise celular e quantificação de proteína total.....	25
3.3 <i>Western Blot</i> .....	25
3.4 Indução de tumor em modelo animal.....	26
3.5 Imunohistoquímica.....	27
3.6 Incorporação de BrdU.....	28
3.7 CRISPR/Cas9.....	28
3.8 Seleção dos nocautes.....	30
3.9 Validação dos nocautes.....	30
3.10 Ensaio de Colônia ou Clonogênico.....	31
3.11 <i>Cell Counting Kit 8</i> – CCK8.....	31
3.12 Ciclo celular.....	32
3.13 Dano de DNA.....	32
3.14 Imunofluorescência.....	32
<b>4. RESULTADOS</b> .....	34
4.1 Busca por anticorpo específico anti-HABP4.....	34
4.2 Nocaute de HABP4 em camundongo.....	35
4.2.1 Comprovação do nocaute .....	35
4.2.2 Incorporação de BrdU.....	36
4.2.3 Perfil de expressão proteico dos animais controle e	

nocaute.....	38
4.3 Nocaute de HABP4 em células HCT116.....	40
4.3.1 CRISPR/Cas9 da <i>Habp4</i> em células HCT116.....	40
4.3.2 Proliferação celular.....	44
4.3.3 Reparo de dano de DNA.....	46
4.3.4 Ciclo celular.....	47
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
5.1 Busca por anticorpo anti-HABP4.....	49
5.2 Caracterização da HABP4 em modelo animal.....	49
5.2.1 Validação do nocaute.....	49
5.2.2 HABP4 e o Câncer de Cólon.....	50
5.3 Caracterização da HABP4 em modelo celular.....	52
5.3.1 Nocaute da HABP4 em células HCT116.....	52
5.3.2 HABP4 e proliferação celular.....	53
5.3.3 HABP4 e resposta ao dano de DNA.....	55
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>59</b>
<b>7. APROVAÇÕES NOS COMITÊS DE ÉTICA .....</b>	<b>61</b>
<b>8. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>67</b>
<b>9. ANEXOS .....</b>	<b>72</b>
9.1 Artigo científico.....	73
9.2 Certificado Turnitin.....	94

## 1. INTRODUÇÃO

---

### 1.1 A proteína HABP4

O anticorpo monoclonal Ki-1 foi o primeiro capaz de detectar células malignas de linfoma de Hodgkin, através de sua ligação com uma glicoproteína de 120 kDa localizada na superfície de células de Hodgkin, a CD30 (Schwab et al. 1982). O anticorpo Ki-1 apresentou ligação cruzada com uma proteína de 57 kDa de estrutura e função desconhecida, nomeada Ki-1/57 (Hansen et al. 1989). Anos mais tarde, a Ki-1/57 também foi nomeada como IHABP4 (*intracelular hyaluronic acid binding protein 4*), por se ligar *in vitro* ao ácido hialurônico e à moléculas carregadas negativamente, incluindo RNA (Huang et al. 2000), mas ainda não é completamente entendido seu papel nessas interações. O nome recomendado para essa proteína é HABP4 e será assim mencionada ao longo desta dissertação.

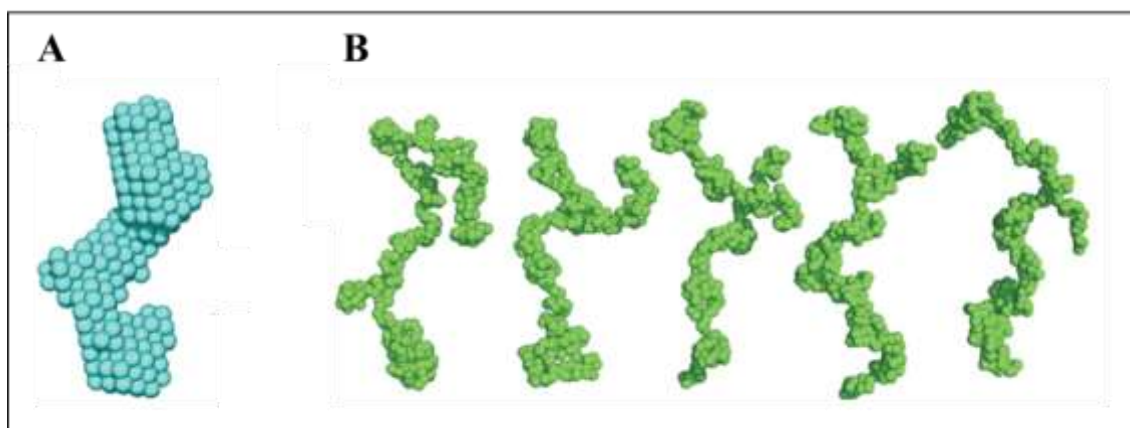
Os primeiros estudos acerca da HABP4 a fim de caracterizá-la identificaram que ela é fosforilada em resíduos de serina e treonina e, por meio de microscopia eletrônica, foi observada sua localização no citoplasma, em poros nucleares e, no núcleo, associada ao nucléolo (Hansen et al. 1990, Rohde et al. 1992). Ensaio com marcação *in vivo* mostraram que a fosforilação só é requerida para a proteína citoplasmática; quando sua localização é nuclear, a HABP4 não se apresenta na forma fosforilada (Hansen et al. 1990). Além de fosforilação, a HABP4 também é metilada pela PRMT1 (Passos et al. 2006) e, mais recentemente, foi identificado que a HABP4 também é SUMOilada (Saito et al. 2017). Proteínas alvo de SUMOilação geralmente são nucleares e estão envolvidas em expressão gênica, estrutura da cromatina, transdução de sinal e manutenção do genoma (Gill 2004).

Em adição, experimentos de imunoprecipitação realizados com o anticorpo Ki-1 mostraram que a proteína HABP4 estava associada a atividade quinase, indicando que ela poderia ser uma proteína-quinase. Entretanto, essa hipótese foi refutada quando experimentos apresentados por Nery e colaboradores mostraram que a HABP4 não apresenta atividade quinase, tanto em outras proteínas quanto nela mesma (Nery et al. 2004), o que vai ao encontro com a análise de sua sequência que não identificou domínio catalítico de quinase ou qualquer homologia com proteínas de função conhecida (Kobarg et al. 1997). A explicação para a associação da HABP4 com atividade quinase se dá por

sua interação com a RACK1 (*Receptor of Activated Kinase 1*), um adaptador da proteína quinase C (PKC), e por ser substrato direto da PKC (Nery et al. 2004, Nery et al. 2006a).

## 1.2 Estrutura da HABP4

Estruturalmente, a HABP4 foi classificada como uma proteína intrinsecamente desestruturada (Bressan et al. 2008). Em ensaios de dicroísmo circular, foi observada baixa complexidade estrutural nas regiões N- e C-terminais da proteína (Nery et al. 2006a). Análises de SAXS (*Small Angle X-Ray Scattering*) indicaram que o C-terminal é alongado em solução e apresenta uma conformação parcialmente desestruturada (Figura 1) (Bressan et al. 2008). Sabendo-se que proteínas intrinsecamente desestruturadas são mais susceptíveis a proteólise, experimentos de degradação com a proteinase K foram realizados com a HABP4 e indicaram que ela é uma proteína flexível, que parece não apresentar um núcleo hidrofóbico ou compacto. Esses resultados experimentais vão ao encontro com a análise da sequência da HABP4, que possui uma grande quantidade (64%) de resíduos propensos a formarem regiões desordenadas (Ala, Arg, Gly, Gln, Ser, Pro, Glu e Lys), além de possuir um alto conteúdo de resíduos carregados e poucos resíduos hidrofóbicos. Estas características dificultam a formação de um núcleo hidrofóbico estável e desfavorecem a formação de estruturas secundárias, características estas comuns a classe de proteínas não estruturadas (Bressan et al. 2008). As proteínas dessa classe estão envolvidas em diversos mecanismos celulares, tais como sinalização, regulação da transcrição e tradução, reparo de DNA, e necessitam dessa alta flexibilidade estrutural para se ligarem/interagirem com diversos parceiros (Dyson and Wright 2005).

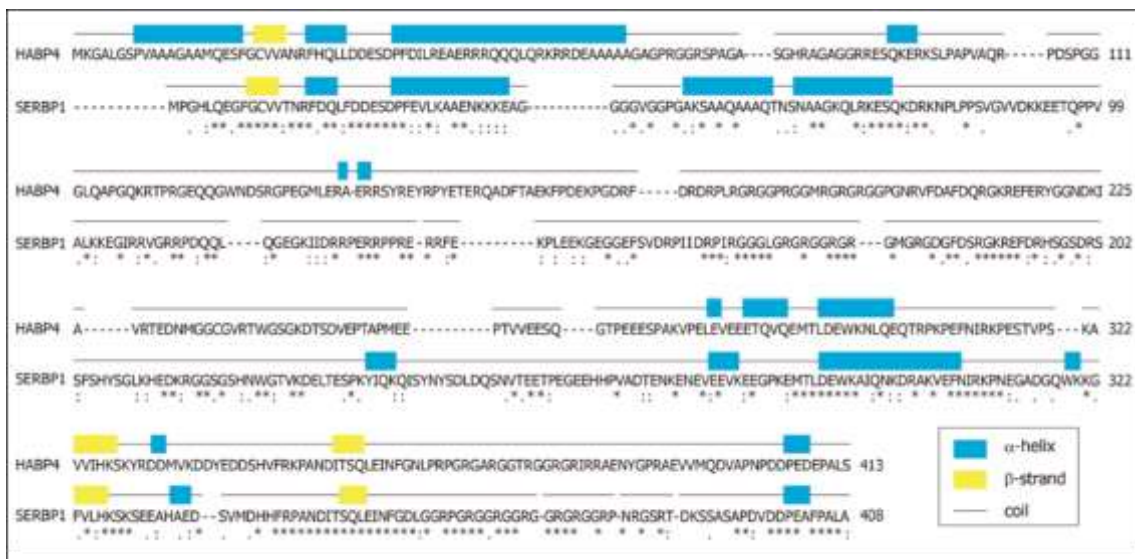


**Figura 1: Modelo *ab initio* do C-terminal da HABP4 obtido por SAXS. (A)** modelo de baixa resolução DAMMIN e **(B)** modelos GASBOR gerados a partir de curvas de SAXS (*Small Angle X-ray Scattering*) do C-terminal da HABP4 fusionada a 6xHis. Figura retirada de (Bressan et al. 2008).

### 1.3 A proteína paróloga SERBP1

A HABP4 compartilha 40,7% de identidade e 67,4% de similaridade com a proteína SERBP1 (*Serpin mRNA binding protein 1*), sugerindo que elas sejam proteínas parálogas. A SERBP1 foi identificada em um ensaio que busca genes ortólogos, o *Comparative Gene Identification (CGI)*, sendo ela o número 55 dos 150 potenciais genes ortólogos entre humanos e *C. elegans*, e assim foi chamada de CGI-55 (Lai et al. 2000). Independentemente, ela foi identificada como interatora do RNA mensageiro (mRNA) do inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1 (PAI, *plasminogen activator inhibitor*), sendo também nomeada PAI-RBP1 (*PAI RNA binding protein 1*) (Heaton et al. 2001).

Apesar de não haver dados sobre sua estrutura na literatura, análises de bioinformática mostram que a SERBP1, assim como a HABP4, faz parte da classe de proteínas intrinsecamente desenhovadas. A predição de estrutura secundária apresenta um perfil muito similar ao obtido para a HABP4 (Figura 2), corroborando com a ideia de serem proteínas parálogas.



**Figura 2: Análise de bioinformática comparativa entre HABP4 e SERBP1.** Alinhamento entre as seqüências de HABP4 e SERBP1, e a predição de estrutura secundária obtida pelo PSIPRED 4.0. Asterisco: aminoácidos idênticos; dois pontos: propriedades fortemente similares; ponto: propriedades fracamente similares. Figura retirada de (Colleti et al. 2019).

### 1.4 Contexto funcional

Como forma de conhecer o papel funcional da HABP4 e SERBP1, foram realizados ensaios de busca de seus parceiros de interação. Foi observado que elas interagem com proteínas envolvidas em processos de regulação da transcrição à tradução.

Ensaios de duplo-híbrido em levedura identificaram a proteína RACK1, um componente dos ribossomos de células eucarióticas, como sendo uma interatora da HABP4. Esta interação ocorre por meio do seu C-terminal e observou-se que a interação é abolida quando a HABP4 é fosforilada pela PKC. A proteína-quinase PKC é capaz de fosforilar apenas o C-terminal da HABP4, que conta com 15 resíduos de serina/treonina. Quando a fosforilação ocorre, e conseqüentemente não acontece a interação com a RACK1, ela é translocada do núcleo para o citoplasma (Nery et al. 2004, Nery et al. 2006a). Além da RACK1, os ensaios de duplo híbrido mostraram que a HABP4, bem como a SERBP1, interage com a CHD3 (envolvida em regulação da transcrição e remodelagem da cromatina), o que corrobora para a hipótese destas proteínas serem parálogas (Nery et al. 2004).

A análise da sequência de aminoácidos da HABP4 e da SERBP1 identificou em ambas motivos ricos em arginina e glicina (RGG/RXR-box) altamente conservados entre si (Passos et al. 2006) e que são importantes para a interação de muitas proteínas de ligação ao RNA e com o RNA (Heaton et al. 2001), bem como podem ser alvos de metilação (Passos et al. 2006). No C-terminal da HABP4, há dois domínios RGG-box e foi observado que ela é capaz de se ligar com uma sonda de RNA poli-U, sugerindo que a interação com o RNA ocorra via regiões ricas em uracila (Bressan et al. 2009b). Ademais, dados de microscopia confocal mostraram a localização da HABP4-GFP principalmente em corpúsculos nucleares envolvidos em processamento de RNA ou em agregados de ribonucleoproteína, dependendo do estado de metilação do seu N-terminal (Nilsson et al., 2004), sugerindo um papel funcional da HABP4 no metabolismo de RNAs.

Ainda no contexto de metabolismo de RNA, a HABP4 interage com proteínas envolvidas no processo de *splicing* (SF2p32, YB-1 e SFRS9) por meio do seu N-terminal (Bressan et al. 2009a). Interessantemente, tanto a HABP4, quanto a SERBP1, são metiladas pela PRMT1 (Passos et al. 2006). A HABP4 e a PRMT1 interagem com a hnRNPQ1 (ou NSAP1), que tem sido descrita como associada a polissomos, participando de processos de degradação de RNAs específicos, tradução e colocalização com grânulos de estresse (Bressan et al. 2009a).

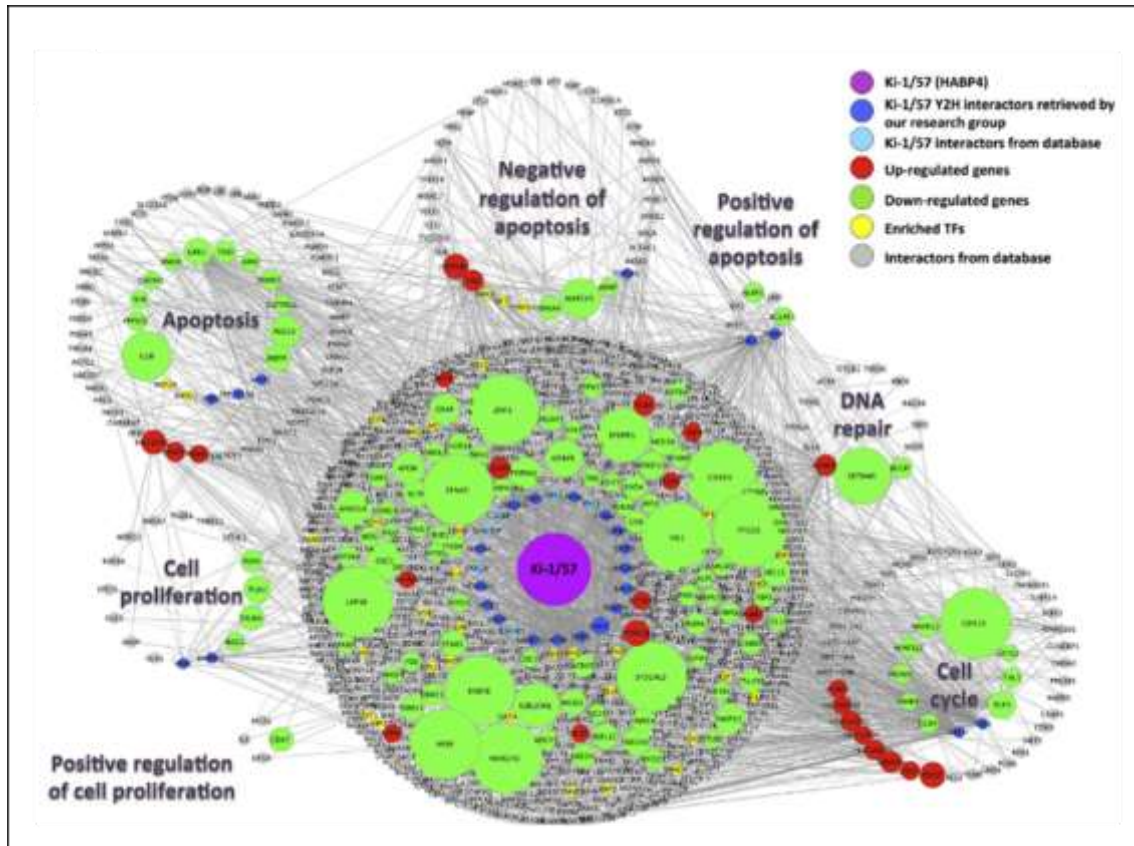
Além do envolvimento no metabolismo de RNA, a HABP4 também está relacionada a regulação da transcrição. Foram identificadas algumas proteínas parceiras de interação que atuam nesta regulação, tais como p53, PIAS, Daxx, YB-1, PRMT1, dentre outras (Nery et al. 2006b). Com relação à p53 (fator de transcrição supressor

tumoral relacionado a ativação de genes envolvidos em reparo de DNA, parada no ciclo celular e apoptose), foi observado que várias proteínas que interagem com a HABP4 apresentam alguma relação com esta proteína ou membros de sua família, como é o caso da RACK1 que regula negativamente a p73, além das CHD-3, Topors, DAXX, PIAS-3, HMGprotein2 like-1, Tip-60, UBC9, GADD34, NSEP-1, SF2p32 (Nery et al. 2006b). Ademais, foi identificado que a interação entre HABP4 e p53 necessita da HABP4 com sua sequência completa. A fosforilação da HABP4 não interfere em sua interação com a p53, entretanto, quando a p53 está fosforilada a interação com HABP4 não ocorre (Nery et al. 2006b). Em ensaios de mono-híbrido, foi constatado que a HABP4 é capaz de modular negativamente a atividade transcricional da p53, o que indica que ela está envolvida diretamente na via da p53, mas ainda não há informação a respeito dos mecanismos (Nery et al. 2006b).

Em relação a tradução, a HABP4 foi encontrada no complexo de alto peso molecular de pré-iniciação da tradução (43-48S) e, sob condições de estresse oxidativo, apresentou localização em grânulos de estresse citoplasmáticos (juntamente com FXRP), grânulos estes conhecidos como locais de armazenamento de RNA e fatores da maquinaria de tradução (Gonçalves et al. 2011).

Como forma de complementar e compreender a gama de dados obtidos pelos ensaios de duplo-híbrido, foi realizado pelo grupo análises da expressão gênica global (DNA *microarrays*, Affymetrix). Nestas análises, foram observados que 413 genes tiveram sua expressão alterada em resposta a superexpressão da HABP4, sendo 88% regulados negativamente, e que 217 genes foram alterados pela superexpressão da SERBP1, sendo 90% regulados negativamente. Interessantemente, ambas as proteínas alteram pelo menos 20 genes em comum (Costa et al. 2014). A maior parte dos genes alterados pela superexpressão dessas proteínas estão relacionados ao ciclo celular, proliferação e apoptose, e muitos destes genes estão alterados em diversos tipos de tumores ou já foram associados a mecanismos oncogênicos. Na Figura 3 é apresentado o

interactoma da HABP4, construído com base nos dados de duplo híbrido, de DNA *microarray* e de bancos de dados.



**Figura 3: Interactoma da HABP4.** Interactoma da HABP4 compilando os dados de duplo-híbrido (azul escuro), *microarray* (regulado positivamente em vermelho e regulado negativamente em verde), banco de dados (azul claro e cinza) e os fatores de transcrição enriquecidos (amarelo). Os processos biológicos mais relevantes estão apresentados nos círculos individualmente. Figura retirada de (Costa et al., 2014).

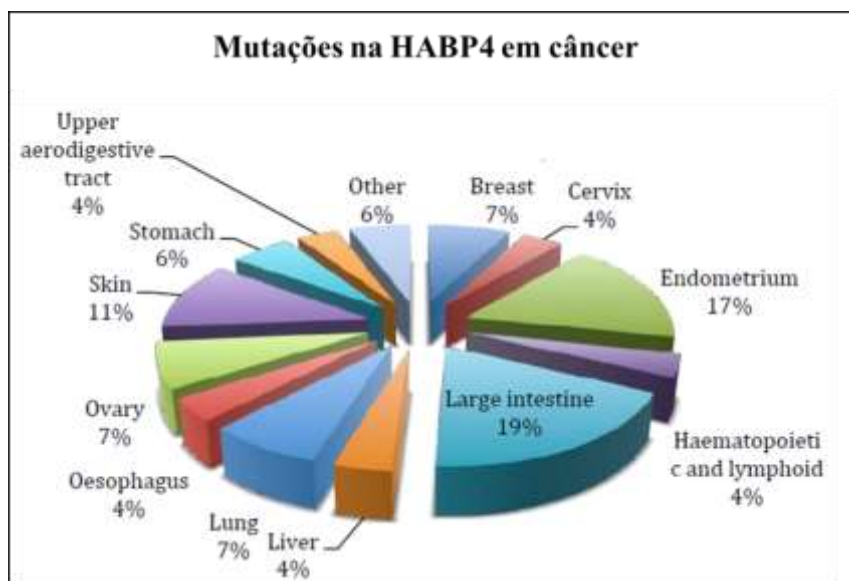
### 1.5 HABP4 e sua relação com câncer

Tanto a HABP4 quanto a paróloga SERBP1 apresentam características que as correlacionam com processos cancerosos, como *shuttling* entre núcleo e citoplasma, extensas modificações pós-traducionais e atuação na regulação da transcrição (Lemos et al. 2003, Gonçalves et al. 2011, Kobarg et al. 1997, Kobarg et al. 2005, Bressan et al. 2009b, Bressan and Kobarg 2010). A estrutura dessas proteínas também mostra seu envolvimento com o câncer. Proteínas intrinsecamente desenhadas são funcionalmente associadas com processos cancerosos e com desenvolvimento de outras doenças (Tompa and Fuxreiter 2008, Iakoucheva et al. 2002). A falta de organização estrutural fornece uma plasticidade funcional e alta habilidade para interagir com uma grande quantidade de proteínas, o que permite que elas estejam envolvidas com diversos mecanismos celulares, tais como sinalização, regulação da transcrição e tradução, reparo de DNA



(Dyson and Wright 2005), os quais tanto HABP4 quanto a SERBP1 estão envolvidas, como explicitado na sessão 1.4.

Através de análises de imunohistoquímica utilizando anticorpos contra a HABP4, foi observado que ela é expressa em células derivadas de vários tipos de tumores, tais como linfoma de células T, adenocarcinoma, carcinoma de próstata e carcinoma de bexiga (Kobarg et al. 1997). Esse conjunto de dados sugerem que a HABP4 tem potencial como marcador de câncer. Ademais, experimentos de FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) mapearam o gene que codifica a HABP4, identificando-o nas bandas 9q22.3-q31 no braço longo do cromossomo 9 humano (Kobarg et al. 1997). Gray-McGuire e colaboradores demonstraram que o *locus* cromossômico 9q22.2-31.2, que engloba o gene da HABP4, apresenta *linkage* relacionado a neoplasia de cólon familiar, estando o gene da HABP4 em desequilíbrio de ligação no câncer de cólon (Gray-McGuire et al. 2010). Além disso, no banco de dados COSMIC (*Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*) há diversas mutações no gene da HABP4, sendo o intestino o tecido tumoral com maior incidência (19%), seguido do endométrio (17%) e pele (11%) (Figura 4).

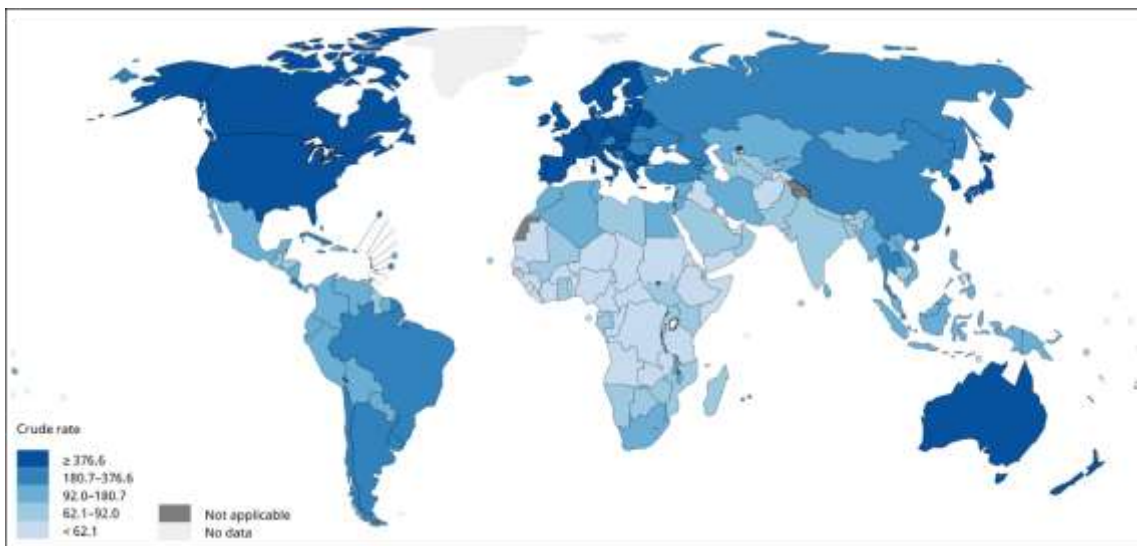


**Figura 4: Mutações na HABP4 em diferentes tipos de câncer.** O banco de dados COSMIC (*Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*) mostra a porcentagem de mutações no gene que codifica a proteína HABP4 em diversos tipos de câncer, com especial destaque ao câncer de intestino, endométrio e pele.

### 1.6 Câncer colorretal

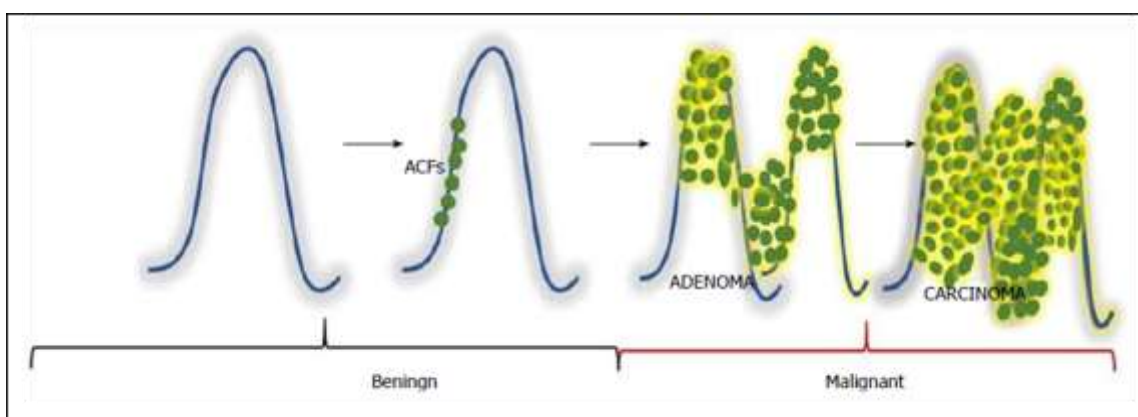
O câncer colorretal (CRC) é o terceiro tipo de câncer mais incidente e o segundo com maior mortalidade (Rawla, Sunkara and Barsouk 2019). Esse tipo de câncer é mais incidente em países desenvolvidos e em desenvolvimento devido ao estilo de vida (Figura

5). No Brasil, estima-se 40.490 novos casos (20.520 casos em homens e 20.470 casos em mulheres) para o ano de 2020 (INCA, 2020). Devido a fatores ambientais, sedentarismo e tipo de alimentação, o risco de CRC tem aumentado nos últimos anos (Pandurangan et al. 2018).



**Figura 5: Taxas de incidência bruta de câncer colorretal estimadas em 2018.** (Retirada de <http://globocan.iarc.fr/>).

O CRC compreende um grande e variado grupo de doenças causadas por uma vasta gama de mutações no intestino (Rawla et al. 2019). As células do cólon alteram morfologicamente e começam a proliferar descontroladamente, com isso começa a surgir pólipos, que tem seu local, tamanho e característica histológica associada a malignidade do tumor (Pandurangan et al. 2018)(Figura 6). (Moolenbeek and Ruitenberg 1981)



**Figura 6: Progressão do CRC.** Relação do estágio da carcinogênese de colorretal com o surgimento e aumentos dos pólipos. Figura retirada e adaptada de (Pandurangan et al. 2018).

Cerca de 75% dos pacientes com CRC têm doença esporádica. Os cerca de 30% restantes dos pacientes apresentam um histórico familiar que sugere uma contribuição

hereditária, exposições comuns ou fatores de risco compartilhados entre os membros da família, ou uma combinação de ambos (Kanth et al. 2017). Este risco genético pode estar associado a mutações em genes como APC, PTEN, MLH1, dentre outros e, possivelmente, no gene da HBP4. O melhor entendimento sobre o desenvolvimento do CRC, incluindo fatores ambientais e genéticos, bem como a evolução molecular da doença, auxiliará na redução dos números de novos casos e no tratamento dos pacientes. Dessa forma, entender o papel da HBP4 no desenvolvimento do câncer de cólon é imprescindível.

## 2. OBJETIVOS

---

### 2.1 Objetivos gerais

O objetivo desta dissertação foi caracterizar funcionalmente a proteína HABP4 no contexto do câncer de cólon.

### 2.2 Objetivos específicos

- Validar o nocaute dos animais para o gene da HABP4 a nível proteico;
- Investigar o papel da HABP4 em vias de proliferação, apoptose e inflamação utilizando amostras dos animais nocaute (*Habp4* *-/-*) e controles (*Habp4* *+/+*);
- Realizar e validar o nocaute da HABP4 em linhagem estável de câncer de cólon humano (HCT116) por meio da técnica de CRISPR/Cas9;
- Caracterizar o envolvimento da HABP4 nos processos celulares de proliferação, ciclo celular e dano de DNA, em células HCT116 controles e HCT116 *Habp4* *-/-*.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

---

#### 3.1 Cultura celular

As linhagens celulares HCT116 e HCT116 *Habp4* *-/-* foram cultivadas em meio DMEM (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco), em estufa à 37 °C, em uma atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 3.2 Lise celular e quantificação de proteína total

Para a lise das células, foi adicionado ao *pellet* celular tampão RIPA (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1mM, SDS 1%, Triton X-100 0,1%, inibidor de protease 1x e DNase), seguido por incubação em gelo por 30 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 17000 g por 30 minutos. O sobrenadante foi recolhido e o *pellet* descartado.

Para quantificação das proteínas totais foi utilizado o método de Bradford (Bradford 1976), em que a ligação do *Comassie Brilliant Blue* às proteínas causa uma mudança no seu pico máximo de absorção, passando de 465 para 595 nm, e então o aumento na absorção em 595 nm é monitorado. Como referência foi feito uma curva padrão com albumina do soro bovino (BSA), nas concentrações de 1, 0.75, 0.5, 0.25, 0.125, 0.025 e 0 mg/ mL. As amostras quantificadas foram armazenadas a -20 °C.

#### 3.3 Western Blot

As amostras foram resolvidas usando SDS-PAGE, com apropriada concentração de poliacrilamida para cada amostra, e transferidas para membrana de nitrocelulose de 0.45 µm usando o sistema molhado da Bio-Rad. Após a transferência, a membrana foi bloqueada com 5% de leite em TBS-T (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20) por 1 hora sob agitação constante em temperatura ambiente. Para a imunodeteção das proteínas de interesse, as membranas foram incubadas com o respectivo anticorpo primário, na titulação apropriada (Tabela 1), *overnight* sob agitação constante a 4°C, e depois lavadas com TBS-T por três vezes por 5 minutos. Posteriormente, incubou-se com o anticorpo secundário, na titulação de 1:10000, por 1 hora sob agitação constante em temperatura ambiente. Três lavagens de 5 minutos com TBS-T foram então realizadas e as membranas foram reveladas com ECL (GE *Healthcare*) usando o fotodocumentador Alliance 6.7, UVITECH ou o ChemiDoc da Bio-

Rad. Quando necessário, a densitometria das bandas obtidas foi realizada no software ImageJ.

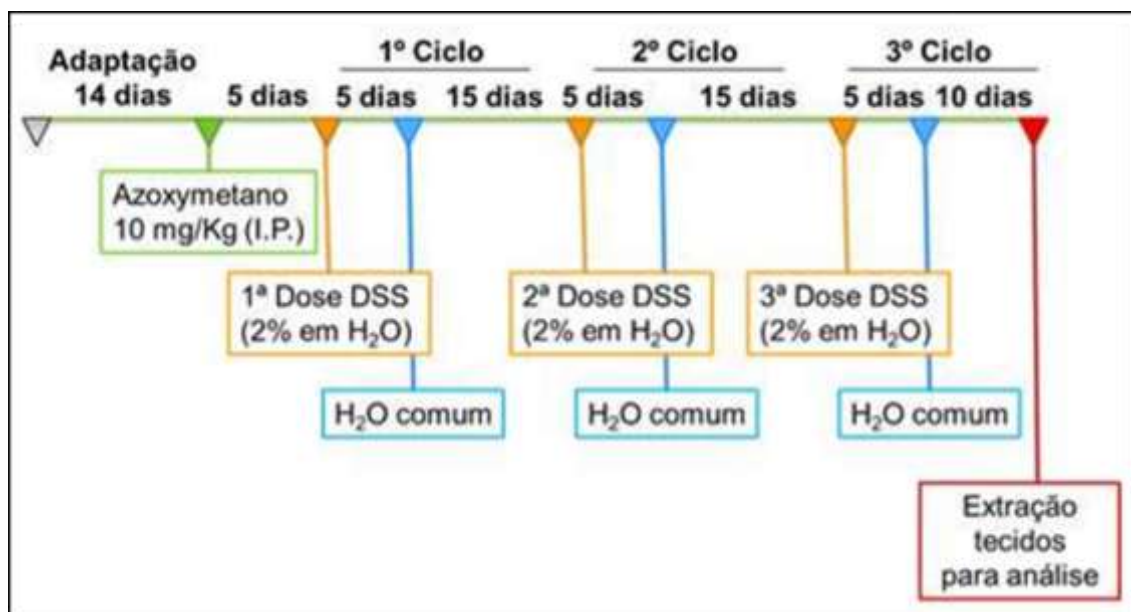
Anti-	Empresa fabricante	Nome/ Número de catálogo	Titulação para <i>Western Blot</i>
Ciclina D1	Santa Cruz	sc2004	1:1000
HABP4	Abcam	ab178593	1:1000
HABP4	Santa Cruz	sc138020	1:500
HABP4	Sigma-Aldrich	HPA055969	1:1000
HABP4	Rhea Biotch	A2B3	1:1000
HABP4	Rhea Biotch	C2A6	1:1000
HABP4	<i>Home made</i>	Ki caseiro	1:500
HABP4	<i>Home made</i>	Hibridoma A26	1:1
CD30/HABP4	<i>Home made</i>	Ki-1	1:1000
PCNA	Cell Signaling	2586	1:1000
$\beta$ -Tubulina	Abcam	ab15568	1:1000
Vinculina	Abcam	ab18058	1:1000
$\gamma$ H2AX	Cell Signaling	9718	1:1000

**Tabela 1: Anticorpos utilizados nos ensaios de *Western Blot*.** Marca, número de catálogo e titulação dos anticorpos primários utilizados nos ensaios de *Western Blot*.

### 3.4 Indução de tumor em modelo animal

A Dra. Talita D. M. Hanchuk estabeleceu o protocolo de indução de câncer de cólon por colite nos animais nocaute e controle (Figura 7). Neste procedimento, é administrado uma combinação de azoximetano (AOM) e dextran sulfato de sódio (DSS). O AOM é um carcinógeno específico para indução de câncer colorretal em camundongos (Druckrey et al. 1967), e o DSS é um agente irritante restrito a mucosa do cólon e do reto que induz a inflamação. Essa combinação AOM/DSS diminui a latência para indução de câncer colorretal nos animais (De Robertis et al. 2011) e os adenomas e adenocarcinomas que surgem no cólon estão relacionados com o *background* e genótipo dos camundongos

(Druckrey et al. 1967), sendo assim um excelente modelo para entender o papel da HABP4 no desenvolvimento desse tipo de câncer.



**Figura 7: Protocolo de indução de câncer colorretal induzido por colite.** Os animais nocaute (*Habp4*<sup>-/-</sup>) e controle (*Habp4*<sup>+/+</sup>) foram tratados com 10 mg/Kg de Azoximetano e após 1 semana tratados com 2.5% Dextran Sulfato Sódio (DSS) em três ciclo de DSS em água a vontade por 5 dias consecutivos, seguido de 15 dias sem tratamento. Após 10 dias da última dose os animais foram sacrificados e as amostras foram coletadas e armazenadas a -80 °C.

### 3.5 Imunohistoquímica

Os cólons retirados dos animais incluídos em parafina foram cortados em micrótomo em cortes de 5 micrometros de espessura. Os cortes foram estendidos em lâmina de vidro silanizadas para o processamento imunohistoquímico. No protocolo estabelecido, os cortes foram desparafinizados em 3 baterias de xilol 100% e reidratação em uma série decrescente de etanol (etanol 100 % por 3 vezes, 70% e 60%) seguida por lavagem em água corrente por 5 minutos. A peroxidase endógena foi bloqueada pela incubação com peróxido de hidrogênio 3%, seguida pela recuperação dos epítomos em solução de citrato de sódio 10 mM, pH 6 na panela por 30 minutos, e em seguida deixado esfriar por mais 30 minutos. O bloqueio foi realizado com leite 3% em TBS-T (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20) por 30 minutos a temperatura ambiente, seguindo a incubação a 37°C por 1 hora dos anticorpos primários, na diluição 1:100, e então lavados com TBS-T por 3 vezes.

O sistema de revelação *Advance* (K4066 – DAKO) foi utilizado seguido pelo cromógeno DAB (3,3'-diaminobenzidina tetrahydrocloridrato). Como contra marcação foi utilizada hematoxilina de Mayer, seguida por lavagem em água corrente por 5

minutos. Posteriormente, as lâminas foram passadas em água amoniacal 1% seguido de mais uma lavagem de 5 minutos em água corrente, e então foram desidratadas com álcool 100% por 3 vezes e passadas em 3 soluções de Xilol. Por fim, a montagem foi realizada com entelã e a análise das lâminas foi realizada no microscópio Leica DM5500B.

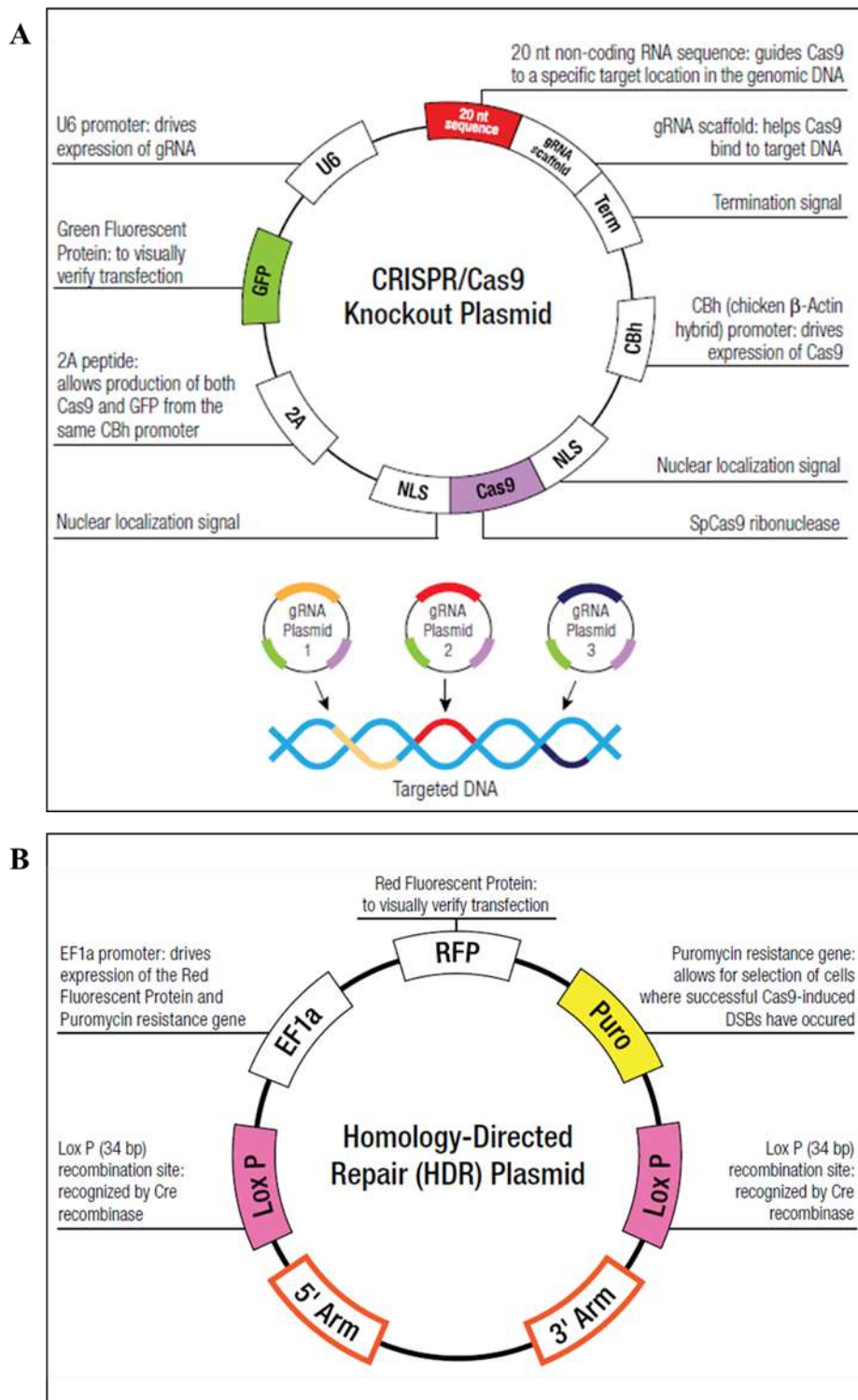
### 3.6 Incorporação de BrdU

Foi injetado intraperitonealmente bromodesoxiuridina (BrdU) (60 mg/kg de peso corporal; Sigma, B5002) nos camundongos controles e nocaute para o gene da HABP4, com doze semanas de idade. Os camundongos foram sacrificados após 2 horas ou 5 dias da injeção. Posteriormente, os cólons destes animais foram retirados e parafinizados utilizando o método de *Swiss-Roll* (Moolenbeek and Ruitenberg 1981). As células proliferativas foram detectadas por imunohistoquímica (conforme item acima) com anticorpo anti-BrdU, e as células positivas para BrdU foram quantificadas a partir de pelo menos três animais por condição em no mínimo 20 criptas do cólon, e estas foram organizadas de acordo com a região da cripta (topo, meio e baixo).

### 3.7 CRISPR/Cas9

Para realizar o nocaute da HABP4 em células HCT116 (carcinoma colorretal) foi adquirido o sistema CRISPR/Cas9 da empresa *Santa Cruz Biotechnology*. O sistema contém um *pool* de três plasmídeos onde em cada um há a sequência da Cas9 e uma sequência diferente de sgRNA (Figura 8A). Adicionalmente, há um sistema de Reparo por Homologia (*Homology-Directed Repair – HDR*), em que os plasmídeos contêm a sequência do gene que confere resistência a puromicina (*Pac*) e a sequência da RFP (*Red Fluorescent Protein*) entre os braços de homologia 5' e 3' desenhados nas adjacências de cada sgRNA (Figura 8B).





**Figura 8: Plasmídeos do sistema CRISPR/Cas9 Santa Cruz Biotechnology.** (A) Esquema dos plasmídeos que contém as sequências da Cas9 e dos sgRNA desenhados para nocautear a HAP4; (B) Esquema dos plasmídeos responsáveis pelo reparo por homologia, em que há a sequência da RFP e do gene de resistência a puomicina entre os braços de homologia desenhados ao redor do sgRNA. (Imagens retiradas dos *datasheets* sc-408202 e sc-408202-HDR disponíveis em <https://www.scbt.com>).

Cada sgRNA foi feito especificamente para um dos três primeiros éxons da HAP4, e os braços de homologia foram desenhados de modo que o sgRNA estivesse entre eles. Assim, a Cas9 cliva o DNA na região que o sgRNA a guiou, e os braços de

homologia permitem que a sequência da RFP e de *Pac* seja inserida no local. Para o sgRNA que alinha ao éxon 1 da HABP4 não há um plasmídeo HDR correspondente, isso porque o sgRNA foi desenhado logo no início da sequência, tornando o *design* dos braços de homologia inviáveis.

Células HCT116 foram cotransfectadas com os dois *pools* de plasmídeos, utilizando o PEI (*Polyethylenimine*) como carreador lipídico em meio Opti-MEM (Gibco). Após 48 horas de transfecção, o meio foi substituído por DMEM 10% SFB com 1 µg/mL de puromicina.

### 3.8 Seleção dos nocautes

A seleção do nocaute foi realizada em duas etapas: resistência à puromicina e *cell sorting*. Após o período de 48 horas de transfecção, as células foram mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB contendo 1µg/mL de puromicina por 3 semanas. Nessa primeira etapa, todas as células que não foram transfectadas e/ou não houve recombinação homóloga para integrar o gene de resistência a puromicina, morreram. Após crescimento das células que resistiram ao tratamento com puromicina, foi realizado o *cell sorting*, que consiste na separação de populações celulares. Novamente, somente as células que sofreram recombinação homóloga apresentam fluorescência vermelha, e essa fluorescência foi utilizada para guiar a coleta das células possivelmente nocauteadas (“marcada”). Como forma de aumentar a probabilidade de coletar células que foram nocauteados nos dois alelos, foi coletado separadamente a população que se chamou de “supermarcadas”, que apresentou maior intensidade de fluorescência, da grande população nomeada “marcada”. O Equipamento utilizado foi o BD FACSAria.

Para seleção clonal, plaqueou-se uma célula por poço em placa de 96 poços da população “supermarcada”. Em poços onde houve crescimento das células plaqueadas, expandiu-se a cultura para placas de 24 poços, 6 poços e, por fim, para placa de 10 cm. Após crescimento, as células foram coletadas para validação do nocaute.

### 3.9 Validação dos nocautes

A validação dos nocautes foi realizada por *western blot* e por sequenciamento do DNA. O *western blot* foi realizado para todos os clones, conforme descrito na sessão 3.3, utilizando o anticorpo anti-HABP4 comercializado pela Abcam (ab178593).

Foram desenhados *primers* para a região dos sgRNAs (*forward*, à jusante ao sgRNA, e o *reverse*, à montante) (Tabela 2) e o produto de PCR (Reação em Cadeia da

Polimerase), realizado com o DNA genômico extraído com o kit *DNeasy Blood & Tissue* da Qiagen (69506), foi sequenciado utilizando o *primer forward* correspondente de cada éxon.

	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>	<i>Amplicon</i>
Exon 2	TGGGCAGTTGTAGTATCAGCA	CATTCCTAGGACTGGTACCACA	770 pb
Exon 3	AGTGCTCAGAACAATGCCAG	GATTCATACCACGTGCTGAC	407 pb

**Tabela 2: Primers para validação do nocaute de HABP4.** O *primer forward* foi desenhado à jusante ao sgrRNA e o *reverse* à montante.

### 3.10 Ensaio de Colônia ou Clonogênico

Para investigar a relação da HABP4 em vias de proliferação celular, foi realizado o ensaio de colônia com a linhagem celular HCT116 e HCT116 *Habp4* *-/-*. Para ambas, foram plaqueadas 500, 1000 e 1500 células, em meio DMEM suplementado com 10% de SFB, em placas de 6 poços e as colônias foram quantificadas após 7, 14 e 21 dias de crescimento.

Ao final de cada período de crescimento, o meio de cultura foi removido e células foram fixadas/marcadas com solução PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) contendo 0,05% de cristal violeta, 1% formaldeído e 1% metanol por 20 minutos a temperatura ambiente, seguido por múltiplas lavagens com água tipo II.

### 3.11 Cell Counting Kit 8 – CCK8

Também para avaliar o papel da HABP4 no contexto de proliferação celular, foi realizado o ensaio Cell Counting Kit 8 – CCK8 (Dojindo), em que a atividade metabólica das células reduz o sal de tetrazólio (WST-8) em formazam, o que confere uma cor laranja ao meio de cultura. Essa coloração é mensurada por absorbância a 460 nm, e é proporcional ao número de células.

Para este ensaio foram plaqueadas 500, 1000, 1500 e 2000 células em placa de 96 poços e, após três dias de crescimento, foi adicionado 10% do volume de meio do reagente WST-8. As células foram incubadas com o reagente por 2 horas à 37 °C, protegidas da luz, para posterior análise da absorbância.

### 3.12 Ciclo celular

A citometria de fluxo foi utilizada para investigar se a HABP4 tem relação com o ciclo celular. Para identificar o perfil populacional das células controle e nocaute para a HABP4, com ou sem tratamento com etoposídeo, em uma confluência de  $1 \times 10^6$  células, foram tripsinizadas e centrifugadas (330 g por 5 min a 4 °C) e o *pellet* formado lavado com 500  $\mu$ L de PBS. Em seguida foram adicionados 4,5 mL de etanol 70% em PBS e deixado em gelo por 30 min. Ao fim da incubação, as células foram novamente centrifugadas (330 g por 5 min a 4 °C), o *pellet* lavado com 500  $\mu$ L de PBS, e centrifugado novamente. Após descarte do sobrenadante, as células foram incubadas por 20 min a 37 °C com 500  $\mu$ L de solução corante PI (0,1 % Triton X-100, 0,2 mg/mL RNase A, 20  $\mu$ g/mL iodeto de propídeo em PBS) e, posteriormente, incubadas imediatamente no gelo por 30 min. Por fim, as células foram centrifugadas (330 g por 5 min a 4 °C) e ressuspendidas em PBS para realização do experimento no citômetro BD FACSVersé.

### 3.13 Dano de DNA

As células controle e as nocaute para o gene da HABP4 foram tratadas com etoposídeo 25  $\mu$ M para induzir quebra de dupla fita de DNA (Vesela et al. 2017), ou com o equivalente de DMSO, por 1 hora a 37 °C. Após o período de tratamento, deixou-se as células em recuperação pelos períodos de 0, 5, 20 ou 60 minutos, e então elas foram tripsinizadas, centrifugadas a 330 g por 5 min e armazenadas a -80 °C para posterior lise celular e realização de *western blot* (ver item 3.2 e 3.3). Nos ensaios de *western blot* foi avaliado o nível de expressão de  $\gamma$ H2AX, uma histona marcadora de dano de DNA (Kuo and Yang 2008, Georgoulis et al. 2017, Kopp, Khoury and Audebert 2019).

### 3.14 Imunofluorescência

As células HCT116 controle ou nocaute para a HABP4 foram plaqueadas em lamínulas de vidro em placa de 12-well e, após aderidas, foram tratadas com etoposídeo 25  $\mu$ M, ou com quantidade equivalente de DMSO, por 1 hora a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>. As células foram então fixadas com formaldeído 3,7% (sigma-Aldrich) em PBS por 20 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foram tratadas com 7,5 mg/mL de glicina por 5 minutos com posterior reidratação com PBS. Por fim, as células foram bloqueadas com 3% de BSA e 0,2% Triton X-100 em PBS, por 30 minutos em temperatura ambiente. As células fixadas foram então incubadas por 1 hora em temperatura ambiente com anticorpo primário anti- $\gamma$ H2AX. O anticorpo primário foi removido por três lavagens com

PBS e em seguida as células foram incubadas com o anticorpo secundário, por 40 minutos a temperatura ambiente. Após lavagens com PBS para retirada do anticorpo secundário, as células foram marcadas com Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich) para visualização do núcleo. As imagens foram coletadas no microscópio Leica DMIL LED em aumento de 60x.

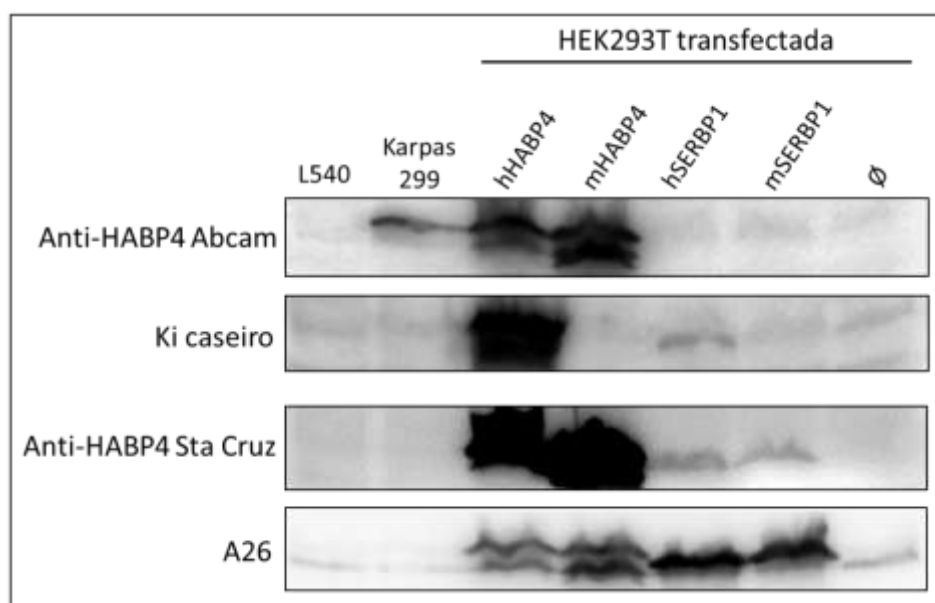
## 4. RESULTADOS

### 4.1 Busca por anticorpo específico anti-HABP4

Para a identificação da HABP4 endógena, oito anticorpos anti-HABP4 foram testados por ensaios de *western blot*. Foram eles: Ki-1, anti-HABP4 da Santa Cruz Biotechnology (sc138020), anti-HABP4 da Abcam (ab178593), anti-HABP4 da Sigma-Aldrich (HPA055969), Ki caseiro, A2B3 e C2A6 da Rhea Biotech e o hibridoma A26. Para encontrar um anticorpo que pudesse identificar a HABP4 de modo específico, foram selecionadas as linhagens celulares L540 e Karpas 299, linfoma de Hodgkin e não-Hodgkin respectivamente, que sabidamente expressam essa proteína.

A Figura 9 mostra o resultado dos quatro anticorpos que apresentaram boa marcação. Os demais anticorpos testados não marcaram ou marcaram de forma inespecífica diversas proteínas, independente da titulação do anticorpo ou tempo de bloqueio testados.

Como controle, foram utilizados extrato proteicos de células HEK293T transfectadas com plasmídeo pcDNA6-FLAG contendo a sequência da HABP4 humana (hHABP4) ou de camundongo (mHABP4), da SERBP1 humana (hSERBP1) ou de camundongo (mSERBP1), ou ainda com o vetor vazio ( $\emptyset$ ). Assim, foi possível saber se o anticorpo reconhece a HABP4 ou sua paráloga, e se ele é capaz de reconhecer a proteína de camundongo também.



**Figura 9: Identificação de anticorpo específico anti-HABP4 endógena.** Canaleta 1: L540; canaleta 2: Karpas 299; canaleta 3: HEK 293T transfectada com HABP4 humana; canaleta 4: HEK 293T transfectada com HABP4 de camundongo; canaleta 5: HEK 293T transfectada com SERBP1 humana; HEK 293T transfectada com SERBP1 de camundongo; HEK 293T transfectada com vetor vazio. Os lisados foram

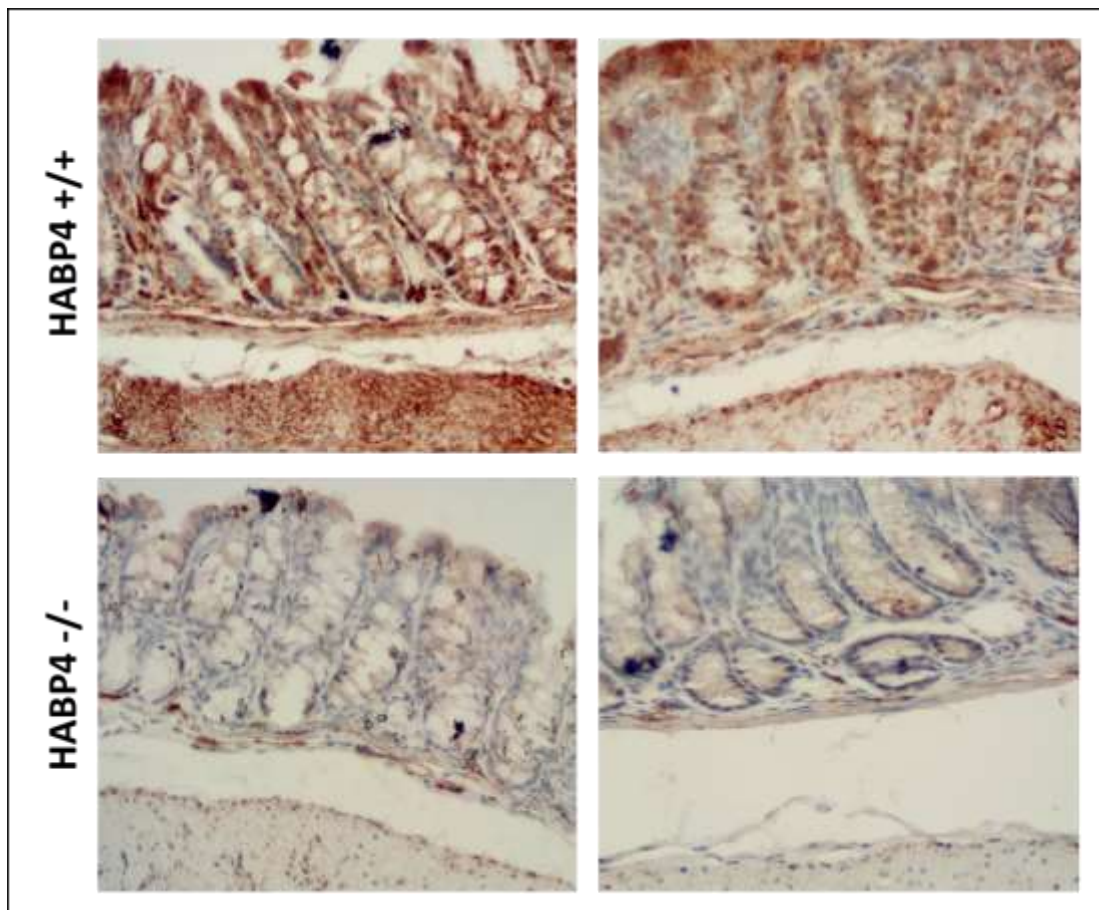
expostos aos anticorpos da Abcam, Ki caseiro, da Santa Cruz e ao hibridoma A26. Para a corrida eletroforética foram aplicados 50 µg de proteína total para cada amostra

Como pode ser observado, o anticorpo anti-HABP4 da Abcam (ab178593) (Figura 9, linha 1) foi capaz de reconhecer a HABP4 endógena, principalmente na Karpas 299, e ao mesmo tempo não reconheceu a paróloga SERBP1. Além disso, ele foi capaz de identificar a HABP4 de camundongo. O anticorpo Ki caseiro (Figura 9, linha 2) apresentou uma marcação mais discreta, mas que também aparece na canaleta da SERBP1 humana. Apesar da grande diferença entre as bandas da HABP4 e SERBP1 recombinantes, essa marcação indica que ele não é tão específico quanto o da Abcam; ele também não foi capaz de reconhecer as proteínas de camundongo. Já o anticorpo produzido pela Santa Cruz Biotechnology (sc138020) (Figura 9, linha 3), não reconheceu as proteínas endógenas e, assim como o Ki caseiro, teve uma pequena marcação na SERBP1 recombinante, tanto humana quanto de camundongo. Por fim, o hibridoma A26 (Figura 9, linha 4) apresentou marcação em ambas linhagens e em todos os controles, mostrando que ele é capaz de identificar a proteína endógena mas não de diferenciar entre as duas.

## **4.2 Nocaute de HABP4 em camundongo**

### **4.2.1 Comprovação do nocaute**

Os cortes dos cólons dos animais nocaute para o gene da HABP4 e dos controle (*wild type*) incluídos em parafina foram tratados conforme descrito no item 3.3 para que fosse testada a especificidade dos seguintes anticorpos anti-HABP4: anti-Ki-1/57 (Santa Cruz), anti-HABP4 (Abcam), anti-HABP4 (Sigma), A2B3 (Rhea Biotech), C2A6 (Rhea Biotech) e Ki caseiro. Dentre esses anticorpos, o único capaz de marcar o tecido do animal selvagem mas não o tecido do animal nocaute foi o anti-HABP4 produzido pela Sigma (Figura 10). Os demais anticorpos não apresentaram marcação alguma nas lâminas ou marcaram todas, independente do animal ser ou não nocaute (dados não apresentados).

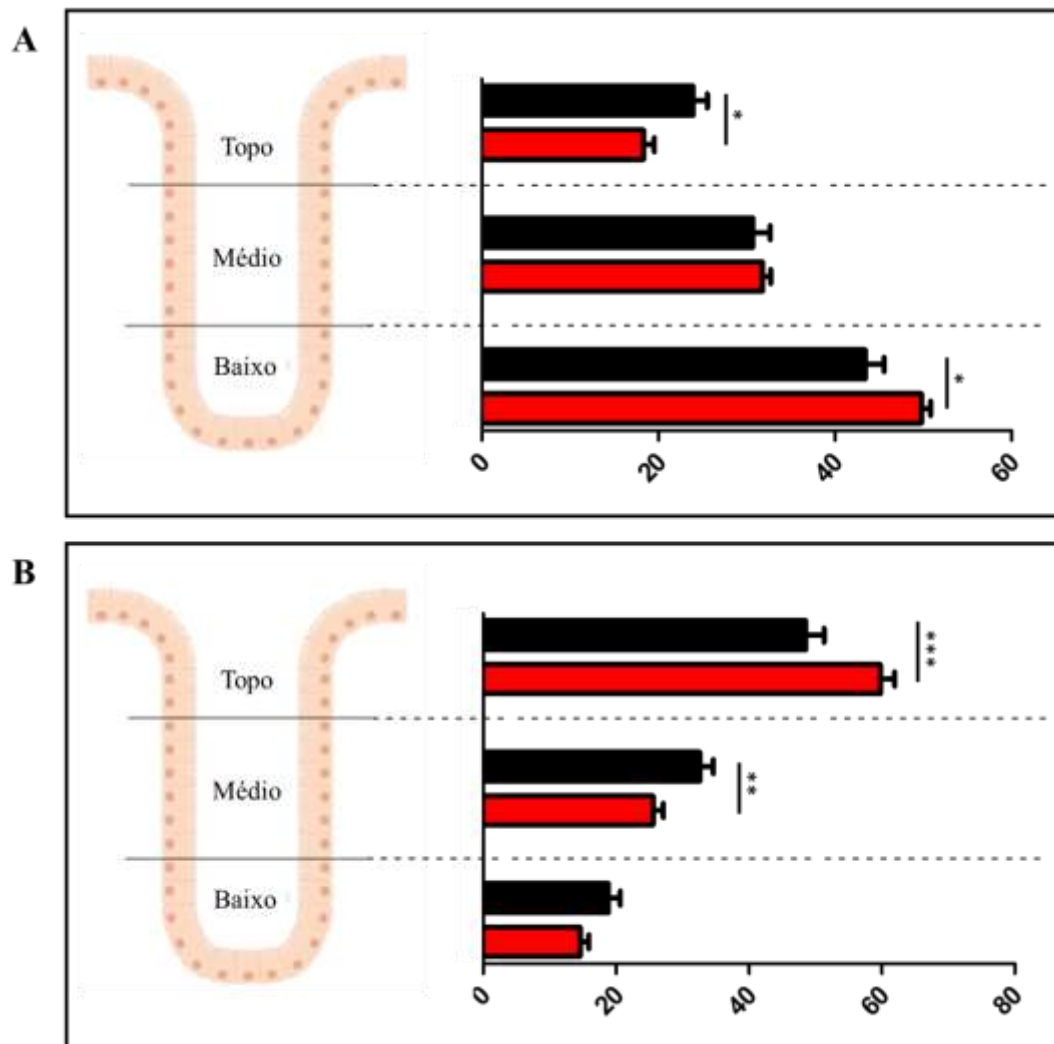


**Figura 10: Confirmação do nocaute do gene *Habp4* nos animais.** Os cortes foram marcados com anti-HABP4 (Sigma). Na parte superior da figura são apresentadas as imagens dos cólons dos animais selvagem, com forte marcação de HABP4. Na parte inferior, imagens dos cólons dos animais nocaute, onde não há marcação pelo anticorpo, são apresentadas.

#### 4.2.2 Incorporação de BrdU

Para investigar o envolvimento da HABP4 em processos proliferativos, foi avaliada a incorporação de BrdU pelas células do cólon dos animais selvagens e nocautes, após 2 horas ou 5 dias da injeção, por imunohistoquímica. Como mostra a Figura 11, a cripta foi dividida em três seções: topo, médio e baixo. As células marcadas por anticorpo anti-BrdU foram quantificadas manualmente.





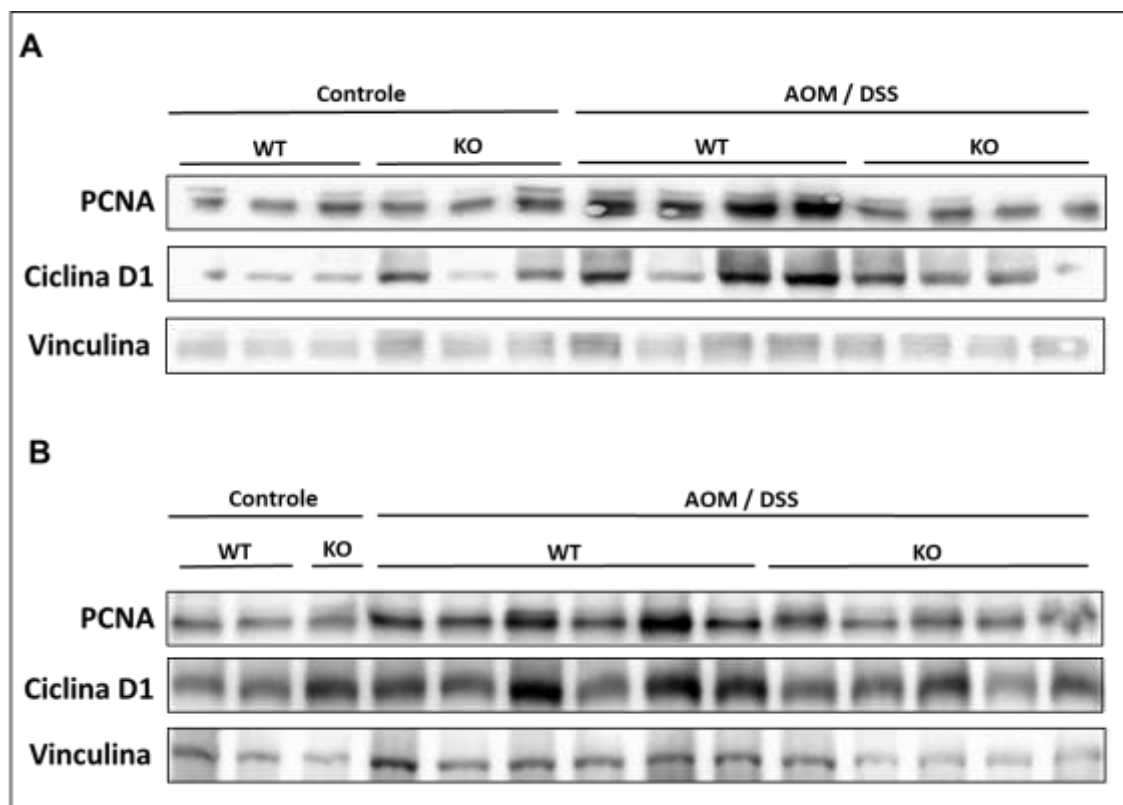
**Figura 11: Aumento da proliferação no cólon dos animais nocaute.** O ensaio de incorporação de BrdU foi realizado com os cólons dos animais *Habp4*<sup>-/-</sup> (vermelho) e controles (preto), após 2 horas (A) e 5 dias (B) da injeção. As células marcadas com anti-BrdU foram quantificadas nos três compartimentos da cripta, por contagem manual, e ao menos 20 criptas por animal (número de camundongos: 2 h controle n = 2; 2 h HABP4<sup>-/-</sup> n = 5; 5 dias controle n = 3; 5 dias HABP4<sup>-/-</sup> n = 5). p-value ≤ 0,05, Test T.

A contagem de células positivas mostrou que após 2 horas de tratamento, os animais nocautes tinham mais núcleos nas criptas marcados pelo anti-BrdU do que as células das criptas dos animais que expressam HABP4 normalmente. Para acompanhar o destino dessas células ao longo da cripta, também foi analisado após cinco dias da injeção. Neste segundo momento, tanto nos animais nocaute quanto nos controles, a marcação na base da cripta diminuiu, mostrando que as células migraram sentido topo da cripta em resposta à contínua divisão celular que ocorre na base. Entretanto, nos animais nocaute foi observado mais células marcadas no topo do que nos animais controles, e, em contrapartida, houve maior marcação na parte central da cripta nos controles.

### 4.2.3 Perfil de expressão proteico dos animais controle e nocaute

Em colaboração com a Dra. Talita Diniz Melo Hanchuk, os animais nocaute e selvagem foram tratados com Azoximetano (AOM), um carcinógeno, e com Dextran Sulfato de Sódio (DSS), um agente que causa irritação da mucosa do cólon e do reto. A combinação desses reagentes diminui a latência para indução de carcinomas de cólon e reto, mimetizando a formação de tumores nos animais (De Robertis et al. 2011).

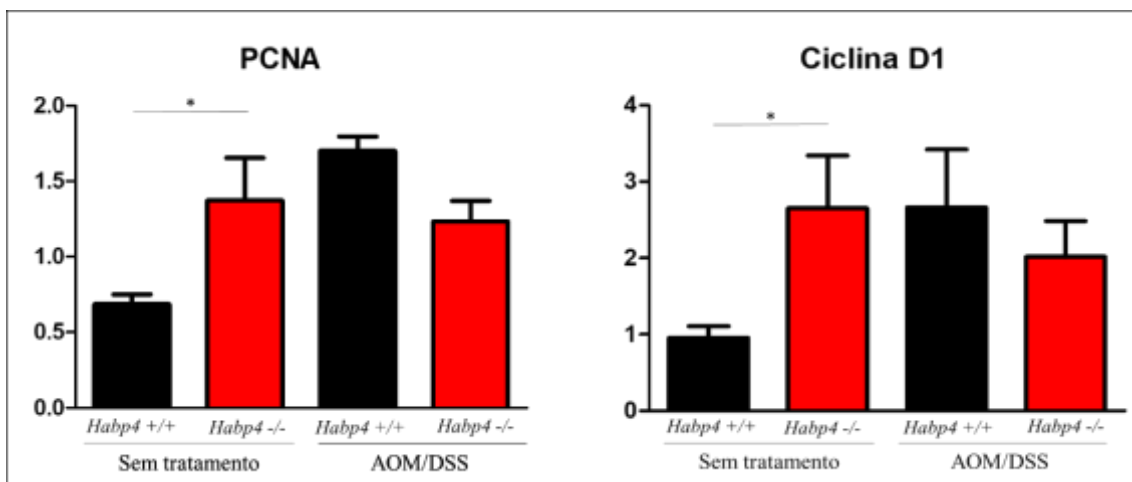
A fim de melhor entender o envolvimento da HABP4 nesse tipo de câncer, foram realizados ensaios de *western blot* com amostras de cólon dos animais selvagens e nocautes, tratados ou não com a combinação AOM/DSS, contra proteínas das vias de apoptose, proliferação e inflamação, em que foi observado alteração nas proteínas envolvidas com vias de proliferação celular. Ao todo foram avaliados 6 animais selvagens não tratados, 5 animais nocaute não tratados, 10 animais selvagens tratados e 9 animais nocautes tratados. Abaixo, na Figura 12, são apresentadas as imagens representativas do grupo amostral e cada canaleta corresponde a amostra de cólon de um animal e cada linha representa a marcação com um anticorpo, anti-Ciclina D1 ou PCNA e contra a Vinculina que foi utilizada como controle interno.



**Figura 12:** Alteração da expressão proteica de Cyclina D1 e PCNA no cólon de animais nocaute. Os animais foram divididos em dois grandes grupos: (A) e (B). Em cada um há animais controles (selvagem e

nocaute não tratados com AOM/DSS) e animais tratados (selvagens e nocaute tratados com AOM/DSS), indicados no topo da figura. As proteínas imunomarcadas estão indicadas no lado esquerdo. Para a corrida eletroforética foram aplicados 50 µg de proteína total para cada amostra.

Para quantificar as bandas e analisar se a diferença visual era estatística, foi realizada a densitometria das bandas pelo programa ImageJ e os resultados foram normalizados pela expressão de vinculina (Figura 13).

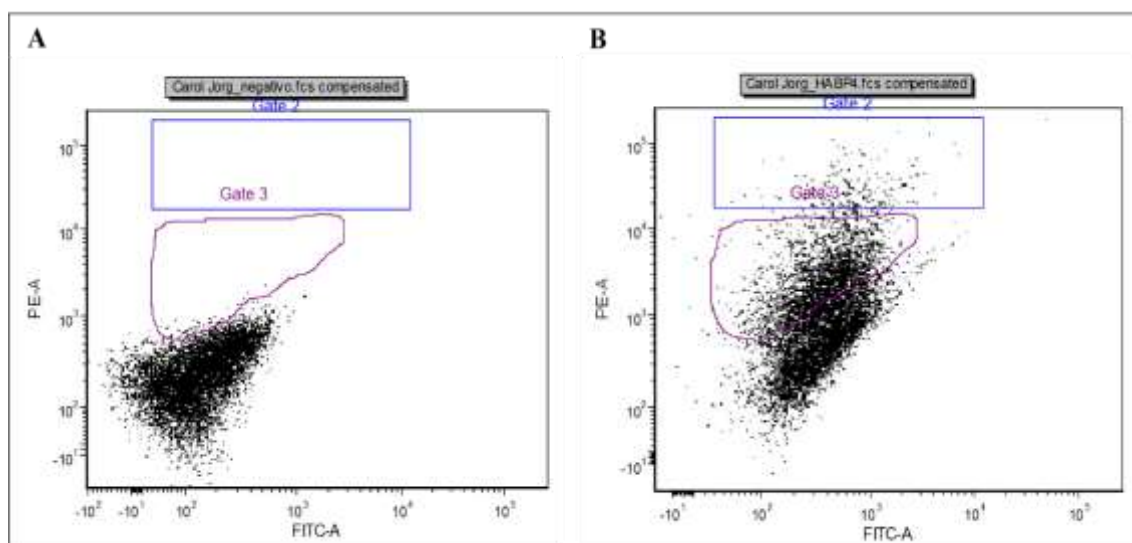


**Figura 13: Quantificação do resultado de *western blot* da Figura 12.** A densitometria das bandas foi realizada pelo ImageJ e os valores foram normalizados pelos da vinculina. Os asteriscos (\*) representam a diferença significativa pelo Teste T, para um p-valor < 0,05.

#### 4.3 Nocaute de HABP4 em células HCT116

##### 4.3.1 CRISPR/Cas9 da *Habp4* em células HCT116

Para nocautear o gene da HABP4 em células humanas HCT116 foi utilizado o sistema CRISPR/Cas9. Os plasmídeos utilizados foram transfectados com PEI e após 48 horas iniciou-se a seleção com puromicina. As células que resistiram ao tratamento da primeira seleção foram expandidas e selecionadas pela segunda vez por meio do *cell*

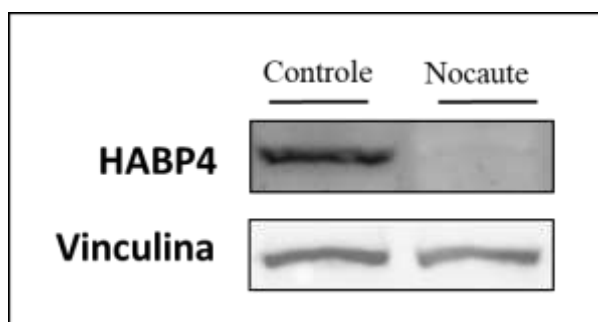


*sorting*. As células controles foram utilizadas para ajustar os parâmetros de voltagem e os gates, para posterior coleta das células nocauteadas, ou seja, somente as que apresentam fluorescência no filtro PE-A superior a observada no controle. Foram coletadas duas populações: a marcada (gate 3) e a supermarcada (gate 2) (Figura 14). A escolha dos gates teve o intuito de coletar separadamente as células que teriam maior chance de serem duplo nocaute (nocaute da HABP4 nos dois alelos), por apresentarem uma maior intensidade de fluorescência do que as demais células.

**Figura 14: Cell sorting CRISPR/Cas9 da HABP4.** (A) Células HCT116 controle utilizadas para ajustar os parâmetros de voltagem e os gates; (B) Células HCT116 transfectadas com os plasmídeos do CRISPR/Cas9 para nocautear o gene *Habp4* e pré-selecionadas com puomicina. Os gates 3 e 2 foram coletados separadamente, nomeados de população marcada e supermarcada, respectivamente.

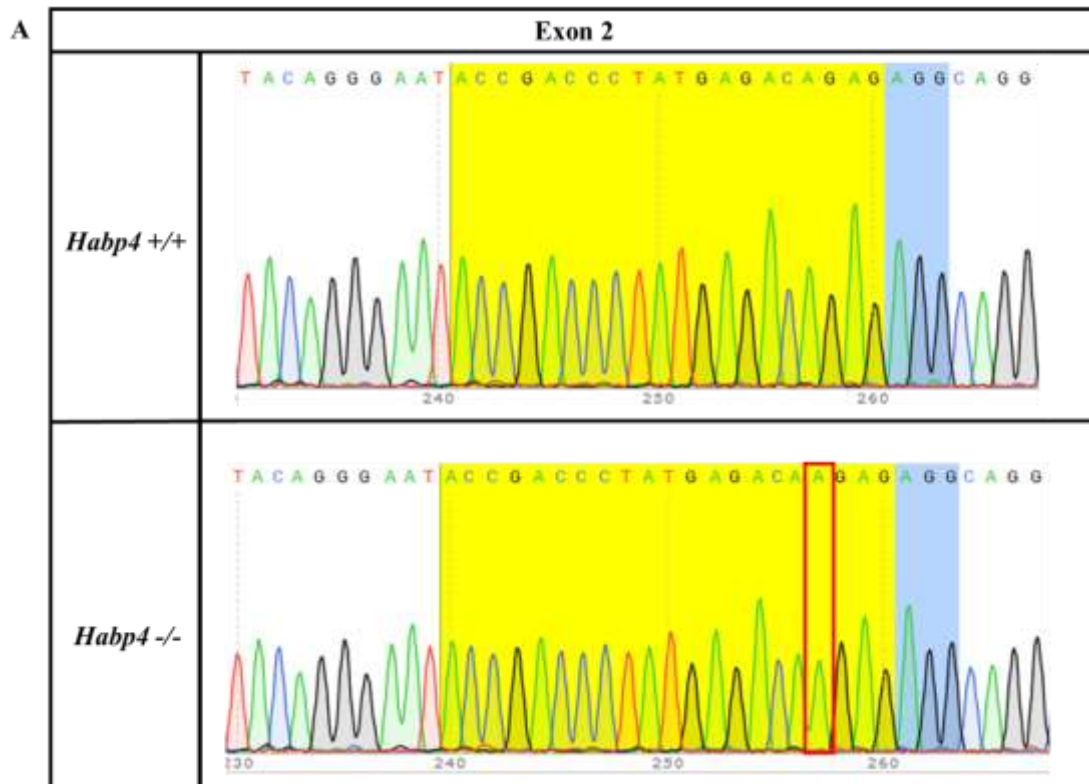
Posteriormente, foi plaqueada uma célula por poço da população supermarcada em placa de 96 poços. As células foram mantidas em cultura até atingir confluência para serem transferidas progressivamente para placa de 24 poços, 6 poços e, por fim, para placa de 10 cm. Nesse processo, 28 clones cresceram partindo de uma única célula.

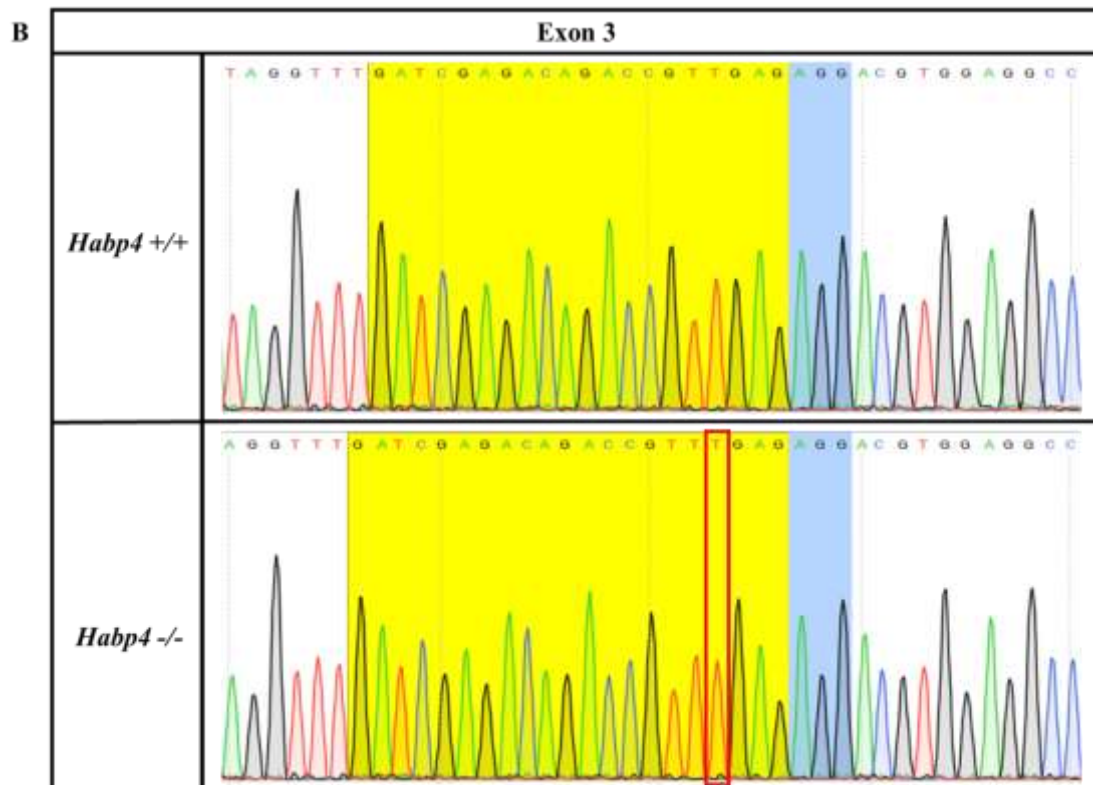
O primeiro ensaio para confirmar o nocaute desses clones foi o *western blot*. O clone nomeado 8G, devido a sua posição inicial na placa de 96 poços, foi o que não apresentou marcação da HABP4, e por isso foi escolhido para seguir com os próximos experimentos (Figura 15).



**Figura 15: Confirmação do nocaute de HABP4 em células HCT116.** *Western blot* com anticorpo anti-HABP4 produzido pela Abcam (ab188593), mostrando que não há expressão de HABP4 no clone 8G.

A segunda forma de confirmar o nocaute foi por sequenciamento de DNA, em que foi utilizado o DNA genômico extraído das células nocaute ou controle e utilizado como *template* na reação de PCR. O produto originado foi sequenciado utilizando o *primer forward*, comprovando a inserção de uma adenina quatro bases antes da sequência PAM, no éxon 2 (Figura 16A), e uma timina no éxon 3, também quatro bases antes da sequência PAM (Figura 16B).





**Figura 16: Sequenciamento do clone 8G.** O sequenciamento realizado com o clone 8G em comparação com o controle, mostrou a inserção (box vermelho) de (A) uma adenina no exon 2 e (B) uma timina no exon 3. Ambas foram inseridas quatro bases antes da sequência PAM (azul). Em amarelo são as sequências em que os sgRNAs se ligaram para guiar a Cas9 para clivagem.

A mudança no quadro de leitura causada por essas inserções provocou uma drástica mudança na sequência da HABP4. A adenina inserida no éxon 2 deu origem a 23 *stop* códons prematuros ao longo da sequência. Já a inserção da timina no éxon 3 deu origem a 18 *stop* códons (Figura 17 A e B, respectivamente). Estas inserções impedem completamente a proteína de ser traduzida corretamente, acarretando em seu nocaute.

**A**

Exon 2	
<i>Habp4</i> <b>+/+</b>	<p>Met K G A L G S P V A A A G A A Met Q E S F G C V V A N R F H Q L L  D D E S D P F D I L R E A E R R R Q Q Q L Q R K R R D E A A A A A G  A G P R G G R S P A G A S G H R A G A G G R R E S Q K E R K S L P A  P V A Q R P D S P G G G L Q A P G Q K R T P R R G E Q Q G W N D S R  G P E G Met L E R A E R R S Y R E Y R P Y E T E R Q A D F T A E K F  P D E K P G D R F D R D R P L R G R G G P R G G Met R G R G R G G P  G N R V F D A F D Q R G K R E F E R Y G G N D K I A V R T E D  N Met G G C G V R T W G S G K D T S D V E P T A P Met E E P T V V E  E S Q G T P E E E S P A K V P E L E V E E E T Q V Q E Met T L D E W  K N L Q E Q T R P K P E F N I R K P E S T V P S K A V V I H K S K Y  R D D Met V K D D Y E D D S H V F R K P A N D I T S Q L E I N F G N  L P R P G R G A R G G T R G G R G R I R R A E N Y G P R A E V  V Met Q D V A P N P D D P E D F P A L S Stop</p>
<i>Habp4</i> <b>-/-</b>	<p>Met K G A L G S P V A A A G A A Met Q E S F G C V V A N R F H Q L L  D D E S D P F D I L R E A E R R R Q Q Q L Q R K R R D E A A A A A G  A G P R G G R S P A G A S G H R A G A G G R R E S Q K E R K S L P A  P V A Q R P D S P G G G L Q A P G Q K R T P R R G E Q Q G W N D S R  G P E G Met L E R A E R R S Y R E Y R P Y E T R* E A G R L H  S Stop E V S R Stop K T R Stop Stop V Stop S R Q T V E R T W R P E  R G Y A R Q R Q R W P W E Q S F Stop R F Stop P E R K A R  I Stop K I W W E Stop Q N S S Q N Stop R Q H G W Met W S S N L G I  G Stop R Y Q Stop C G A N C T D G G T H S G G G V P G H P G R G V S  S Q S S Stop V G G R R R N P S S R D D F R Stop V E K S S R T D Q T  K A Stop V Stop H P E T R I H C S F Q S R G D S Q V K I Q  R Stop Y G K R Stop L Stop G R F P C F P E T R Q Stop H H I P A G  D Stop F W Stop P P S S W A W S Q R R H P G R P G K D Q E G R E L W  T Q S R S G D A R C C P Q P R Stop P G R F P C A V L</p>

**B**

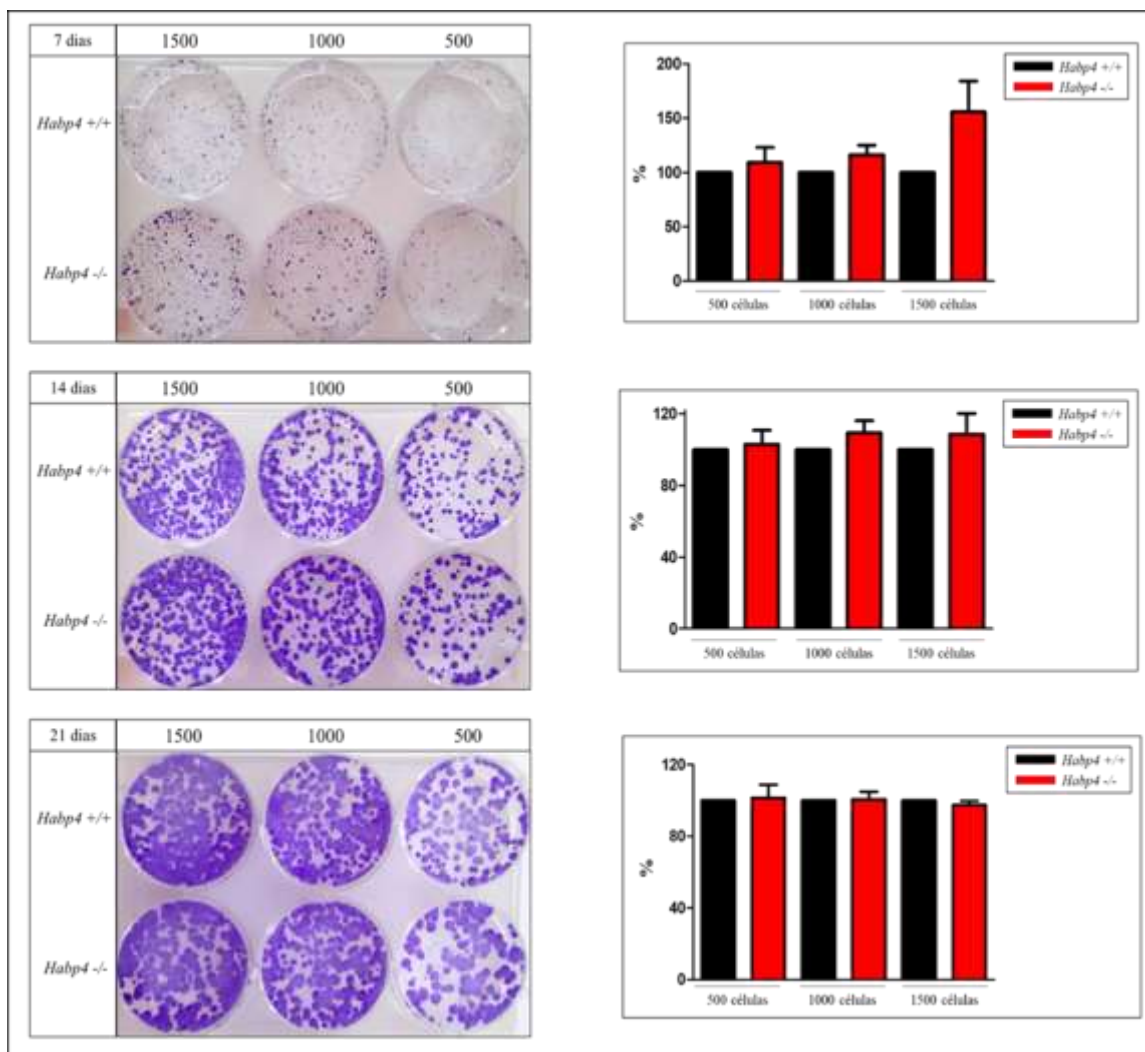
Exon 3	
<i>Habp4</i> <b>+/+</b>	<p>Met K G A L G S P V A A A G A A Met Q E S F G C V V A N R F H Q L L  D D E S D P F D I L R E A E R R R Q Q Q L Q R K R R D E A A A A A G  A G P R G G R S P A G A S G H R A G A G G R R E S Q K E R K S L P A  P V A Q R P D S P G G G L Q A P G Q K R T P R R G E Q Q G W N D S R  G P E G Met L E R A E R R S Y R E Y R P Y E T E R Q A D F T A E K F  P D E K P G D R F D R D R P L R G R G G P R G G Met R G R G R G G P  G N R V F D A F D Q R G K R E F E R Y G G N D K I A V R T E D  N Met G G C G V R T W G S G K D T S D V E P T A P Met E E P T V V E  E S Q G T P E E E S P A K V P E L E V E E E T Q V Q E Met T L D E W  K N L Q E Q T R P K P E F N I R K P E S T V P S K A V V I H K S K Y  R D D Met V K D D Y E D D S H V F R K P A N D I T S Q L E I N F G N  L P R P G R G A R G G T R G G R G R I R R A E N Y G P R A E V  V Met Q D V A P N P D D P E D F P A L S Stop</p>
<i>Habp4</i> <b>-/-</b>	<p>Met K G A L G S P V A A A G A A Met Q E S F G C V V A N R F H Q L L  D D E S D P F D I L R E A E R R R Q Q Q L Q R K R R D E A A A A A G  A G P R G G R S P A G A S G H R A G A G G R R E S Q K E R K S L P A  P V A Q R P D S P G G G L Q A P G Q K R T P R R G E Q Q G W N D S R  G P E G Met L E R A E R R S Y R E Y R P Y E T E R Q A D F T A E K F  P D E K P G D R F D R D R P F* E R T W R P E R G Y A R Q R Q R W P  W E Q S F Stop R F Stop P E R K A R I Stop K I W W E Stop Q N S S Q  N Stop R Q H G W Met W S S N L G I G Stop R Y Q Stop C G A N C T D  G G T H S G G G V P G H P G R G V S S Q S S Stop V G G R R R N P S  S R D D F R Stop V E K S S R T D Q T K A Stop V Stop H P E T R I H  C S F Q S R G D S Q V K I Q R Stop Y G K R Stop L Stop G R F P C F  P E T R Q Stop H H I P A G D Stop F W Stop P P S S W A W S Q R R H  P G R P G K D Q E G R E L W T Q S R S G D A R C C P Q P R Stop P G  R F P C A V L</p>

**Figura 17: Análise da sequência proteica do clone 8G. (A)** A inserção da adenina no éxon 2 da HABP4 alterou o quadro de leitura, a partir da arginina marcada com um asterisco (\*), e levou ao surgimento de 23 stop códons (em azul); **(B)** A timina inserida no éxon 3 causou 18 stop códons prematuros a partir da fenilalanina (\*) gerada com a nova base.



### 4.3.2 Proliferação celular

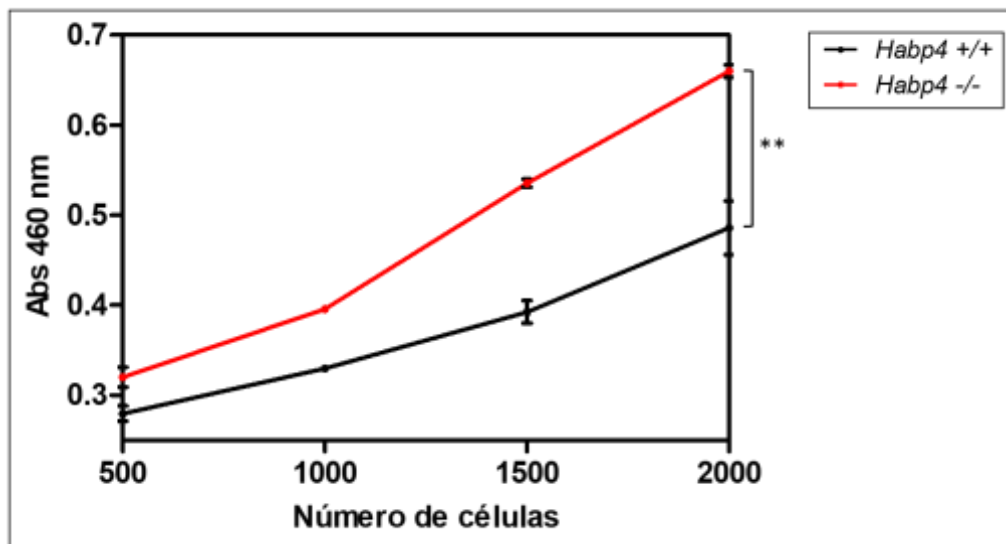
O ensaio de colônia, ou ensaio clonogênico, foi realizado a fim de avaliar o envolvimento da HABP4 no processo de proliferação celular. O resultado apresentado na Figura 18 mostra que o nocaute de HABP4 apresentou uma maior taxa de proliferação em comparação com a célula que expressa normalmente a HABP4, indicando envolvimento desta proteína em vias de proliferação celular. Entretanto, após 14 dias de crescimento, as células nocautes começam a ter diminuição na taxa de proliferação, e ao final, com 21 dias de crescimento, nocaute e controle apresentam a mesma taxa proliferativa.



**Figura 18: Ensaio clonogênico mostrando maior proliferação celular do nocaute de HABP4.** O ensaio clonogênico foi realizado com células controle (*Habp4* +/+) e nocautes (*Habp4* -/-) plaqueando 500, 1000 ou 1500 células (indicadas no topo de cada quadro) por 7, 14 e 21 dias. As células foram marcadas com cristal violeta.

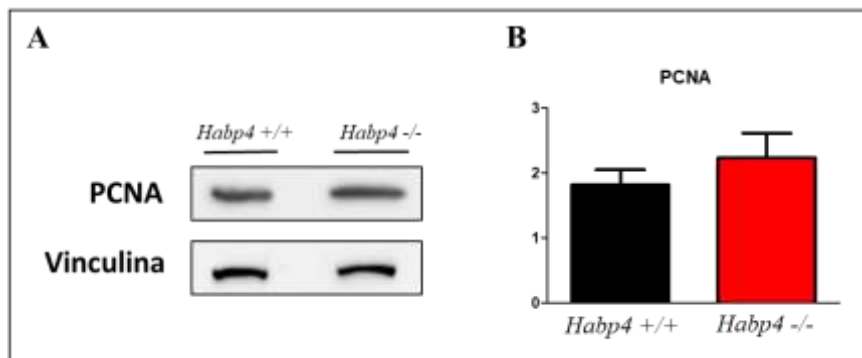


A proliferação celular também foi avaliada com o kit *Cell Counting Kit 8* (CCK8), em que é monitorado a formação de formazam pela absorvância em 460 nm, com diferentes números de células plaqueadas. Neste ensaio foi observado que as células nocautes metabolizaram mais sal de tetrazólio, formando mais formazam, o que é correlacionado com uma maior taxa de proliferação (Figura 19).



**Figura 19: Ensaio de proliferação CCK8 com células nocaute e controle.** A formação de formazam foi monitorada pela absorvância a 460 nm e correlacionada com a taxa de proliferação celular. A curva obtida para o nocaute (vermelho) é mais acentuada do que a das células controle (preto), indicando que as células nocautes proliferaram mais. Os \* representam a diferença significativa pelo Teste T, para um p-valor < 0,05.

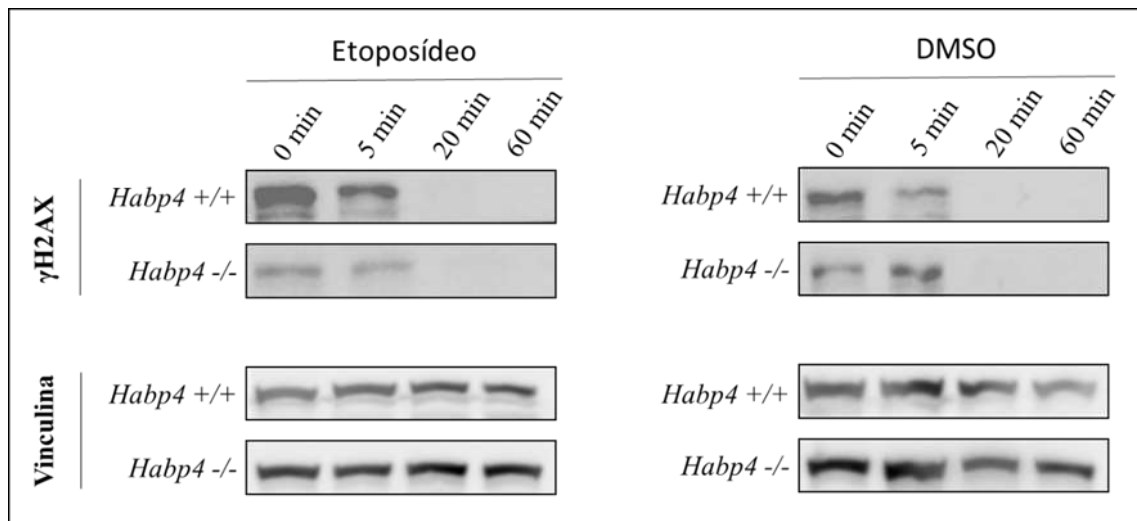
A proteína PCNA, um marcador para proliferação (Kubben et al. 1994, Bologna-Molina et al. 2013, Juríková et al. 2016, Lu, Ratnayake and Rich 2019), foi imunomarcada por *western blot* nas amostras de células controle e nocaute para o gene da HABP4. Conforme a Figura 20, não houve diferença estatística na expressão de PCNA, embora seja possível observar uma tendência de maior expressão no nocaute.



**Figura 20: Expressão de PCNA em células controle e nocaute.** (A) Avaliação da expressão da proteína PCNA por *western blot* nas amostras de células controle (WT) e nocaute (KO). (B) A densitometria das bandas foi realizada com o ImageJ, normalizando a expressão de PCNA pela vinculina. Não há diferença estatística para um p-valor < 0,05.

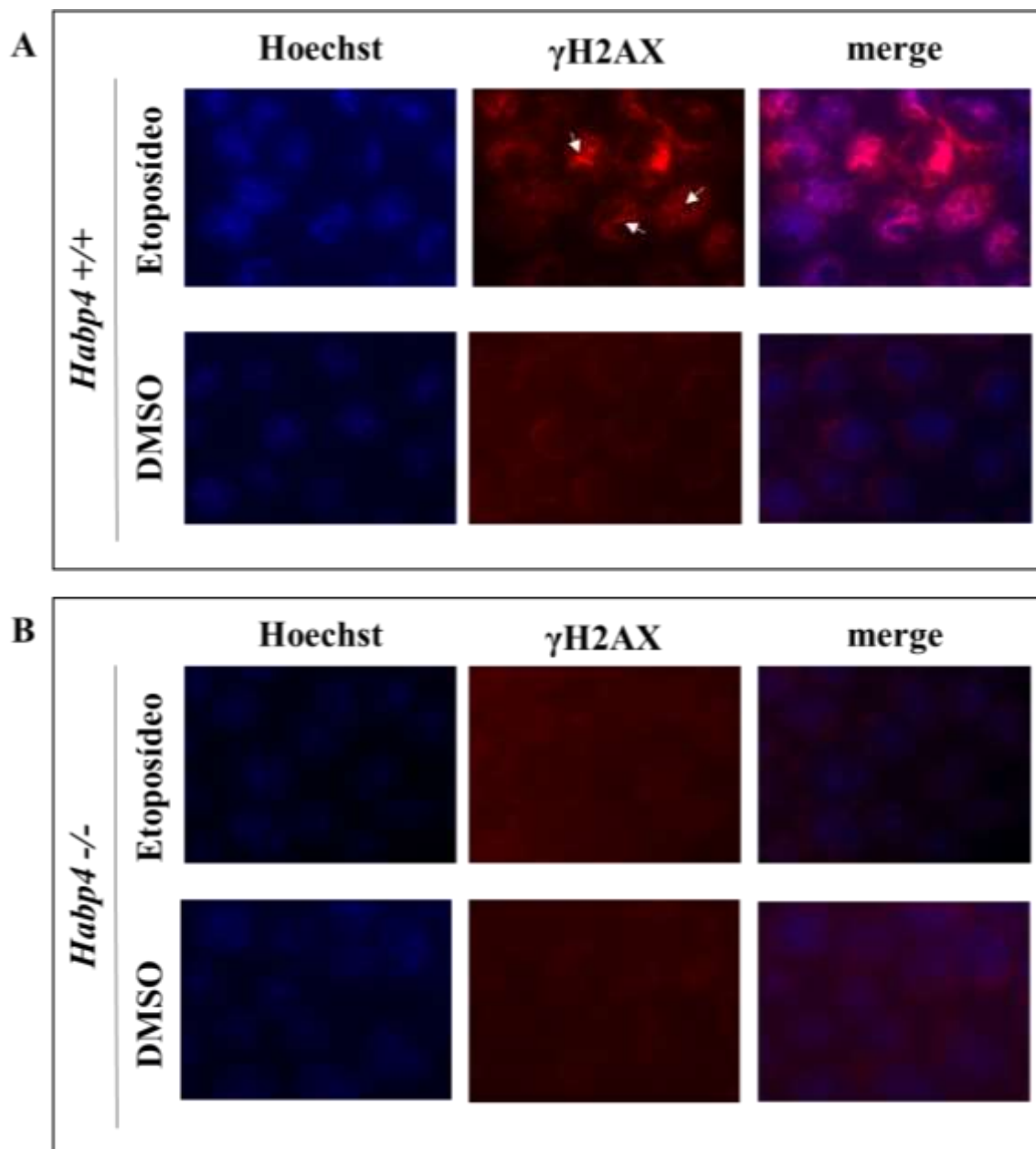
### 4.3.3 Reparo de dano de DNA

A ativação da histona H2AX foi avaliada por *western blot* para que pudesse ser avaliado o possível envolvimento da HBP4 com vias de reparo de dano de DNA. O dano foi causado por etoposídeo 25  $\mu$ M conforme literatura (Vesela et al. 2017) e foi monitorado o nível de  $\gamma$ H2AX (H2AX fosforilada na Serina 139) em diferentes tempos de recuperação (0, 5, 20 e 60 minutos).



**Figura 21: Diminuição de  $\gamma$ H2AX em células nocautes.** Avaliação da ativação da H2AX ( $\gamma$ H2AX) por *western blot* nas amostras de células controle (*Habp4* +/+) e nocaute (*Habp4* -/-). A expressão foi normalizada pela vinculina como controle interno.

Além da expressão proteica, foi avaliado por imunofluorescência os focos de  $\gamma$ H2AX no núcleo das células controles e nocautes, quando estas foram tratadas com etoposídeo 25  $\mu$ M, ou com DMSO, por 1 hora a 37 °C. Como pode ser observado na Figura 22A, nas células controle (*Habp4* +/+) que houve indução de quebra de dupla fita pelo etoposídeo, há focos no núcleo mostrando a concentração de  $\gamma$ H2AX nas regiões do DNA lesionado. O mesmo não é observado para as células nocaute (*Habp4* -/-) expostas ao mesmo tratamento. Todas as imagens foram visualizadas com o mesmo tempo de exposição e de ganho para que pudessem ser comparadas.

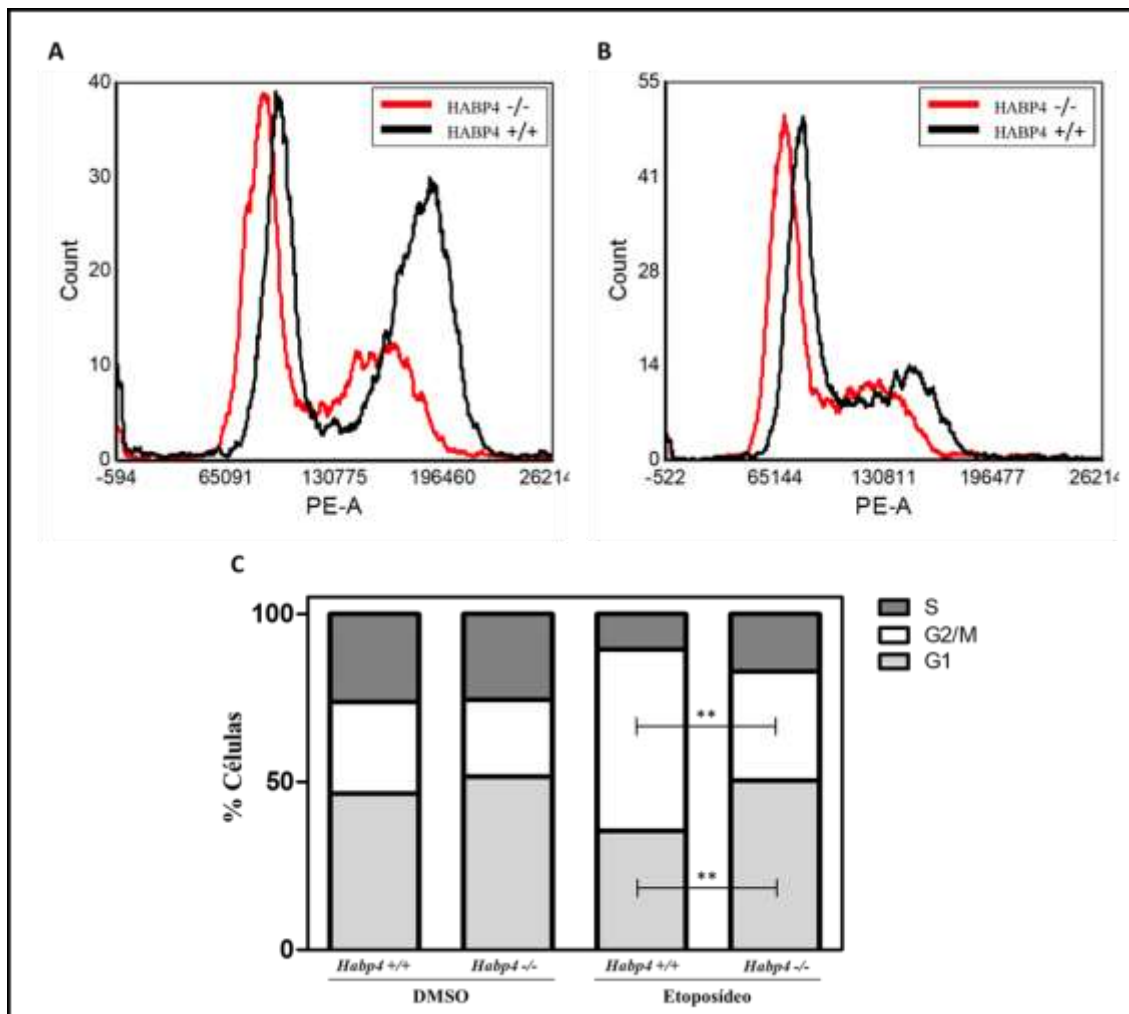


**Figura 22: Ausência de focos de  $\gamma$ H2AX em células nocautes.** Células HCT116 controle (A) ou nocaute (B) para o gene *Habp4* foram tratadas com etoposídeo 25  $\mu$ M por 1 hora, ou com quantidade equivalente de DMSO. As setas brancas apontam regiões onde há focos de  $\gamma$ H2AX nas células controles que tiveram dano de DNA induzido pelo etoposídeo. A visualização das imagens foi realizada com o mesmo tempo de exposição e de ganho no microscópio Leica DMIL LED.

#### 4.3.4 Ciclo celular

A análise do ciclo celular entre células HCT116 controle e *Habp4* -/- através da incorporação de iodeto de propídeo (PI) por meio de citometria de fluxo, mostrou que quando as células são previamente tratadas com etoposídeo, as células *Habp4* +/+ normalmente apresentaram um aumento na parada do ciclo em G2/M, ao passo que as células *Habp4* -/- não realizaram essa parada no ciclo (Figura 23A). Essa diferença não é

observada quando ambas foram tratadas com quantidade equivalente de DMSO (Figura 23B).



**Figura 23: Células nocaute apresentam falha no *checkpoint* G2/M.** A incorporação de iodo de propídeo foi avaliada por citometria de fluxo quando (A) as células foram tratadas previamente com etoposídeo 25  $\mu$ M ou (B) com quantidade equivalente de DMSO. O primeiro pico corresponde a fase G1 do ciclo celular e o segundo, a G2/M. Em vermelho, é apresentado o histograma das células nocaute e, em preto, das células controle. (C) Visualização gráfica da variação ao longo do ciclo celular entre células nocaute e controle, com ou sem tratamento com etoposídeo.

## 5. DISCUSSÃO

---

### 5.1 Busca por anticorpo anti-HABP4

O grupo do Prof. Dr. Jörg Kobarg investe há bastante tempo na busca por um anticorpo capaz de reconhecer a proteína HABP4 de modo específico. Os anticorpos disponíveis também reconhecem a proteína paróloga SERBP1, ou não são capazes de reconhecer a HABP4 endógena, apenas a recombinante. Na etapa de *screening* foram testados oito anticorpos distintos, dos quais quatro apresentaram boa marcação (Figura 9). Dentre os quatro anticorpos, o anti-HABP4 produzido pela Abcam (ab178593) foi o que apresentou melhores resultados, sendo capaz de reconhecer a HABP4 endógena nas linhagens L540 e Karpas299, além de reconhecer a proteína recombinante, tanto humana quanto de camundongo, e não apresentou marcação para a paróloga SERBP1.

Apesar dos ótimos resultados obtidos com a padronização do anticorpo produzido pela Abcam, a empresa descontinuou sua produção. A análise da sequência da HABP4 e da SERBP1 mostra que o N-terminal da HABP4 é a região que mais se difere da paróloga, e é a região que foi utilizada como antígeno pela Abcam para imunizar os coelhos utilizados na produção do anticorpo ab178593. Diante disso, será produzido um novo anticorpo em que o antígeno será baseado na sequência disponibilizada pela Abcam. Com isso, é esperado que a especificidade encontrada no anticorpo comercial da Abcam seja mantida na produção caseira.

### 5.2 Caracterização da HABP4 em modelo animal

#### 5.2.1 Validação do nocaute

Os camundongos da linhagem C57BL/6 tiveram o gene da HABP4 nocauteado pela técnica de CRISPR/Cas9 pela Dra. Ângela Saito, na época doutoranda do Prof. Dr. Jörg Kobarg. O nocaute foi comprovado a nível de DNA, por sequenciamento e pelo ensaio com a T7 Endonuclease I, mas a nível proteico ainda não havia sido possível. Essa dificuldade se devia a falta de um anticorpo que reconheça especificamente a HABP4 endógena, e não sua paróloga SERBP1, como descrito no item anterior.

A confirmação do nocaute foi alcançada pela técnica de imunohistoquímica, em que os cortes incluídos em parafina dos cólons dos animais nocaute (*Habp4* <sup>-/-</sup>) e controle (*Habp4* <sup>+/+</sup>) foram imunomarcados com diferentes anticorpos anti-HABP4 (anti-HABP4 da Santa Cruz, Abcam, Sigma, dois da Rhea Biotech e o Ki caseiro), a fim de encontrar um que fosse específico. Neste *screening*, o anti-HABP4 produzido pela Sigma

marcou fortemente os cortes dos camundongos controle, enquanto que em animais nocaute a marcação é quase nula, sugerindo que ele é capaz de reconhecer de modo específico a HABP4 endógena. Com esse resultado foi possível confirmar o nocaute do gene da HABP4 nos camundongos.

O anticorpo da Abcam (ab178593) apesar de ter apresentados bons resultados com a técnica de *western blot*, não foi capaz de marcar os cólons dos animais por meio da imunohistoquímica. Ao passo que o anticorpo da Sigma, que não apresenta marcação alguma nas membranas de *western blot*, funcionou muito bem com essa técnica. Com isso, além de confirmar o nocaute dos animais, foi padronizado o anticorpo da Sigma para técnicas de imunohistoquímica, e o da Abcam para ensaios de *western blot*.

### 5.2.2 HABP4 e o Câncer de Cólon

A HABP4 vem sendo relacionada a processos cancerosos desde sua descoberta. Foi observada sua expressão em diversos tipos de tumores, como linfoma de Hodgkin, linfoma de células T, adenocarcinoma, carcinoma de próstata e carcinoma de bexiga (Kobarg et al. 1997).

Algumas características da HABP4 permitiram especular sua relação com processos tumorigênicos, como extensas modificações pós-traducionais, translocação entre núcleo e citoplasma e sua estrutura também indica forte relação com o câncer. Como explicitado na sessão 1.3, a HABP4 faz parte da classe de proteínas intrinsecamente desenoveladas (Bressan et al. 2008), e a falta de estrutura dessas proteínas lhes confere a plasticidade funcional necessária para que interajam com uma grande quantidade de proteínas envolvidas em diversos processos celulares. Por conta dessa alta capacidade de interação, essa classe de proteínas tem ganhado bastante atenção da comunidade científica ao longo dos anos, sendo associadas a várias doenças, inclusive câncer (Das and Mukhopadhyay 2011, Uversky 2014, Santofimia-Castaño et al. 2019, Gadhav et al. 2020). Adicionalmente, o perfil de interação da HABP4 mostrou que ela tem papel importante em mecanismos de regulação, como regulação da transcrição, *splicing*, tradução, pontos de checagem do ciclo celular, entre outros, tanto através da sua interação proteína:proteína quanto via DNA/RNA, de maneira direta ou mediada por outras proteínas (Costa et al. 2014, Gonçalves et al. 2011, Nery et al. 2006b, Passos et al. 2006, Saito et al. 2017, Bressan et al. 2009b).

Especificamente, a HABP4 tem grande conexão com câncer colorretal. Como já mencionado, o gene da HABP4 foi mapeado na banda 9q22.3-q31 no braço longo do

cromossomo 9 humano, e essa região foi associada a neoplasia de cólon familiar, estando o gene da HABP4 em desequilíbrio de ligação. Gray-McGuire mostrou por meio de análises de Polimorfismo de Nucleotídeos Simples (SNPs) que 5 SNPs identificados no estudo de associação, estão no gene *Habp4* (quatro intrônicos e um na região 3 'UTR) (Gray-McGuire et al. 2010). Adicionalmente, o intestino é o órgão com maior número de mutações no gene da HABP4, com 19% do total das mutações ocorridas, de acordo com o banco de dados COSMIC.

Em resposta a indução de tumor colorretal por colite realizado pela Dra. Talita D. M. Hanchuk, observou-se que os animais nocautes apresentam mais tumores no cólon e que estes são maiores, quando comparados com os do controle (dados não publicados), o que poderia indicar que a HABP4 tem alguma relação com processos proliferativos. Para confirmar essa hipótese foi realizado o ensaio de incorporação de BrdU (bromodeoxiuridina). Esse ensaio vem sendo utilizado desde a década de 1980, quando Miller e Nowakowski mostraram, em células do sistema nervoso central, que o análogo de timina, a bromodeoxiuridina, poderia ser utilizada em experimentos de proliferação e migração celular por ser incorporado ao DNA durante a replicação (Miller and Nowakowski 1988). Desde então a incorporação de BrdU também passou a ser empregada em estudos com células intestinais (Kubben et al. 1994, Nakagawa et al. 2004, Rocha et al. 2014, Fisher et al. 2019, Zhang, Li and Lan 2020).

O padrão de marcação das criptas observado no ensaio de incorporação de BrdU mostra que as células das criptas dos animais nocaute migraram mais rapidamente para o topo do que as dos animais controle, devido a maior proliferação que ocorre na base. Dessa forma, pode-se concluir que camundongos *Habp4*<sup>-/-</sup> exibiram uma maior taxa de proliferação, o que está relacionado a um *turnover* mais rápido das células epiteliais, validando então a hipótese de que a HABP4 de alguma maneira influencia nos processos de proliferação celular.

Além da incorporação de BrdU, foi avaliado o perfil de expressão de proteínas envolvidas em vias de apoptose, proliferação e inflamação. Dentre as proteínas avaliadas, PCNA e Ciclina D1, que estão envolvidas com via de proliferação celular (Chen et al. 2019, Tian et al. 2019, Juríková et al. 2016, Bologna-Molina et al. 2013), foram diferencialmente expressas. Os animais, tanto controle quanto nocaute, tratados com a combinação de AOM/DSS apresentaram uma elevação no nível de expressão, o que está de acordo com a característica clássica de crescimento acelerado de células cancerosas, sendo inclusive um dos *Hallmarks* do câncer (Hanahan and Weinberg 2000, Hanahan and

Weinberg 2011). Mas, interessante, para ambas proteínas, os animais nocaute para o gene da HAP4 que não foram submetidos ao tratamento com AOM/DSS, apresentaram o mesmo comportamento molecular dos animais que tiveram tumor induzido. Isso sugere que a ausência da HAP4 nos animais por si só já os tornam predispostos geneticamente a desenvolver tumores, por ter a via de proliferação alterada.

O perfil de expressão proteico corrobora com o resultado da incorporação de BrdU, mostrando mais uma vez que a ausência de HAP4 causa aumento na proliferação celular, e que esse aumento é devido a alterações nas vias de PCNA e/ou Ciclina D1. Com isso, a HAP4 pode ser considerada supressora tumoral no contexto de câncer colorretal.

### 5.3 Caracterização da HAP4 em modelo celular

#### 5.3.1 Nocaute da HAP4 em células HCT116

A fim de estudar mais a fundo o papel molecular da HAP4, foi tentado imortalizar as MEFs (*mouse embryonic fibroblast*) dos animais nocaute e controle para que ensaios celulares pudessem ser realizados, mas não foi possível e, por isso, também tentou-se dissociar células do cólon destes animais para posterior imortalização, entretanto nenhum protocolo de dissociação teve sucesso. Diante destes percalços, foi decidido nocautear o gene da HAP4 em linhagem estável de câncer colorretal humano e investigar seu papel nesse novo modelo.

O nocaute foi realizado pela técnica de CRISPR/Cas9 e validado por *western blot* e sequenciamento de DNA. O clone nomeado 8G não apresentou banda de HAP4 no *western blot* utilizando o anticorpo produzido pela Abcam, validando o nocaute da proteína HAP4 neste clone. O sequenciamento do DNA genômico deste clone mostrou que o nocaute ocorreu via NHEJ, com a inserção de apenas uma base, A e T nos éxons 2 e 3, respectivamente, no processo de reparo. Apesar do nocaute ter ocorrido pela mudança no quadro de leitura, não é observado a inserção da sequência da RFP e do *Pac*, como esperado pelo método utilizado (via HD). Entretanto, a seleção foi realizada tanto pela resistência à puromicina conferida por *Pac* e pela fluorescência vermelha da RFP.

Essas informações conflitantes podem ser explicadas pelo fato da HCT116 ser uma célula diploide. A sequência inserida por reparo por homologia possui quase 3 mil pares de base e ela pode ter sido inserida em apenas um dos alelos, ao passo que no outro o nocaute ocorreu por INDEL. A diferença de tamanho dos *amplicons* entre o alelo possivelmente nocauteado por HD e o nocauteado por NHEJ é muito grande e, provavelmente, durante a reação de PCR o alelo que teve a inserção de apenas uma base



teve sua amplificação favorecida por ser muito menor. Como o sequenciamento foi realizado com o produto de PCR, se este foi tendenciado a amplificar apenas um dos alelos, o sequenciamento mostraria apenas a sequência dele.

Apesar da dificuldade em rastrear a inserção da sequência RFP + *Pac*, é sabido que ele foi inserido em um dos alelos por conta dos métodos de seleção utilizados. A possibilidade da sequência ter sido inserida em outro lugar do genoma e não na sequência da HABP4 é bastante improvável devido ao tamanho das sequências dos braços de homologia. Suas sequências não alinham em nenhuma outra região do genoma da HCT116. O mais importante para comprovar o nocaute completo, e não a geração de uma linhagem heterozigótica *Habp4*<sup>+/-</sup>, é que no alelo que não houve inserção de RFP + *Pac*, ocorreu nocaute via NHEJ. Dessa maneira, mesmo que em um alelo houve inserção de RFP + *Pac* pela via HD, e no outro houve a inserção de uma base por NHEJ, em ambos a tradução da HABP4 está comprometida.

### 5.3.2 HABP4 e proliferação celular

Com o nocaute confirmado, foram iniciados os experimentos para a caracterização da HABP4 neste novo modelo. Como foi observado no modelo animal que a falta da HABP4 causa maior proliferação nas células intestinais dos animais, e que as proteínas PCNA e Ciclina D1 apresentam níveis de expressão elevados, foi realizado o ensaio de colônia para verificar se no modelo humano a falta da HABP4 apresenta o mesmo perfil. O ensaio de colônia mostrou que houve maior proliferação nas células que foram nocauteadas nos pontos de 7 e 14 dias, por apresentarem mais colônias e estas serem maiores. No último ponto, 21 dias após as células terem sido plaqueadas, não houve diferença, indicando que as células nocauteadas poderiam ter entrado em apoptose ou em senescência, e por isso a taxa de proliferação diminuiu, se igualando à taxa das células controle.

O resultado do ensaio de colônia vai ao encontro com resultados prévios obtidos pelo grupo, em que a análise de expressão genica global realizado com a superexpressão da HABP4, em células HEK293T, identificou que a maior parte dos genes alterados estavam relacionados com proliferação celular, como IL1B, MAPK12, TXLNA e WNK1, estando todos regulados negativamente (Costa et al. 2014). De modo geral, 88% dos 413 genes alterados pela superexpressão de HABP4 tiveram sua expressão diminuída, corroborando com o resultado inverso obtido na ausência de HABP4, tanto no modelo animal quanto no nocaute em HCT116.

No mesmo estudo, a incorporação de EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) foi mensurada em células superexpressando ou não HABP4, e foi observado que em resposta ao seu aumento, ocorre diminuição da incorporação (Costa et al. 2014). Esse resultado é exatamente oposto ao observado na incorporação de BrdU nos animais e no ensaio de colônia, em que ambos mostraram uma maior taxa de proliferação em resposta à ausência de HABP4.

Corroborando com esses dados, o ensaio do kit *Cell Count* Kit 8 – CCK8 mostrou que as células nocaute apresentaram uma taxa estatisticamente maior de proliferação do que as células controles ao metabolizarem mais sal de tetrazolio em formazam. Esse ensaio vem sendo utilizado para avaliar a taxa de proliferação celular, inclusive utilizando a célula HCT116 como modelo de estudo (Huang et al. 2011, Zhou et al. 2017, Piao and Shang 2019, Ji et al. 2020).

Ainda no contexto da proliferação celular, assim como foi realizado com amostras dos camundongos, foi avaliado por *western blot* os níveis de expressão de PCNA nas células HCT116. Essa é uma informação bastante importante por se tratar de uma proteína marcadora de processos proliferativos (Bologna-Molina et al. 2013, Juríková et al. 2016). O aumento da expressão observado nos animais se repete no nocaute em HCT116, em que é visto uma tendência de maior expressão de PCNA no nocaute, mostrando que ausência da HABP4 causa um efeito consistente tanto em camundongos quanto em humanos.

Essa relação da HABP4 com o controle da proliferação celular ainda precisa ser elucidada. É preciso entender o mecanismo que envolve a atividade da HABP4 para que, quando ela não está presente, as células proliferem mais rapidamente. De maneira especulativa, uma hipótese é que a HABP4 possa regular a expressão das proteínas que controlam a proliferação, como no caso da PCNA, e/ou regular fatores de transcrição, que por sua vez regulam a expressão destas proteínas. Essa hipótese tem como base o fato de já ter sido mostrado que a HABP4 está envolvida com processos regulatórios. No contexto da regulação da transcrição, a HABP4 interage com as proteínas CHD3, DAXX, TOPORS, PIAS1/3, HMG e p53 (Lemos et al. 2003, Lemos and Kobarg 2006, Nery et al. 2006b), e também interage com proteínas envolvidas no metabolismo de RNA (YB-1 /NSEP1, SFRS9 e SF2/p32) (Bressan et al. 2009a). Além da sua relação a nível de RNA, a HABP4 tem associação com proteínas da maquinaria traducional, como RACK1, CIRP, FXR1 e RPL38, e também foi mostrado que ela co-sedimenta com as subunidades 40-

60S do ribossomo, além de uma parcela significativa co-sedimentar com os polissomos (Gonçalves et al. 2010, Gonçalves et al. 2011).

A localização celular da HABP4 também dá embasamento para a hipótese. Ela colocaliza com a proteína p80-coilin, um marcador dos corpos de Cajal, e também com os GEMS (*Gemini of coiled bodies*), quando a célula é previamente tratada com Adox (um inibidor de metilação) (Lemos and Kobarg 2006, Bressan et al. 2009b). Ambos, corpos de Cajal e GEMS, são considerados compartimentos nucleares em que há armazenamento de snRNPs – *small nuclear ribonucleoproteins*, e montagem de complexos de *splicing* de pré-mRNAs (Morimoto and Boerkoel 2013, Staněk 2017). Também, quando há tratamento com Adox, a HABP4 colocaliza com a SC-35, um marcador dos *splicing speckles* (Bressan et al. 2009b). Esses eventos mostram que o nível de metilação da HABP4 promovido pela PRMT1 (Passos et al. 2006), regula seu envolvimento com corpúsculos nucleares que promovem o metabolismo de RNA e, em última instância, promovem a regulação da transcrição.

Além destes corpúsculos, a HABP4 interage com proteínas do PML-NBs (*Promyelocytic Leukemia (PML) nuclear bodies*), tais como p53, DAXX, TOPORS, UBC9 e PIASy (Lemos and Kobarg 2006, Nery et al. 2006b). Esse corpúsculo nuclear está envolvido em diversos processos celulares como apoptose, reparo de dano de DNA, e, inclusive, proliferação e regulação da transcrição (Chang et al. 2018). Mais recentemente, Saito e colaboradores mostraram que a superexpressão da HABP4 afeta a formação e distribuição destes corpúsculos, diminuindo em resposta ao aumento de HABP4 em células expostas ao trióxido de arsênio ( $As_2O_3$ ) (Saito et al. 2017). Ademais, foi demonstrado que a influência exercida pela HABP4 nos PML-NBs é dependente de SUMOilação (Saito et al. 2017).

Todo esse envolvimento da HABP4 com proteínas e corpúsculos nucleares que de alguma maneira estão relacionados aos processos de regulação, desde o nível transcricional até ao nível da tradução, sustenta a hipóteses que a HABP4 atue no processo de proliferação por controlar a expressão de proteínas ditas proliferativas, como é o caso da PCNA. O desafio agora é afunilar esse conhecimento e identificar as proteínas, e/ou fatores de transcrição, que estão sob controle da HABP4, e entender como ela os regula.

### **5.3.3 HABP4 e resposta ao dano de DNA**

As células sofrem dano em seu DNA constantemente por diversos fatores, sejam externos, como radiação ultravioleta ou ionizante, quimioterapia, radioterapia, ou agentes

endógenos, como espécies reativas de oxigênio (Boulton, Kyle and Durkacz 2000, Henle and Linn 1997, Pommier et al. 2003, Zhou and Elledge 2000). A resposta ao dano varia de acordo com o tipo de dano causado, podendo haver reparo de DNA, mudança transcricional, apoptose, senescência, ou ainda levando ao bloqueio/ativação dos *checkpoints* do ciclo celular (Zhou and Elledge 2000, Zhao et al. 2018).

É sabido que a HBP4 interage com proteínas envolvidas em vias de reparo de dano de DNA, como UBC9, DAXX, PIAS, p53, YB-1 e GADD34 (Lemos and Kobarg 2006, Bressan et al. 2009b). A proteína YB-1, após estresse, é translocada para o núcleo onde se liga com alta afinidade ao DNA danificado e, além disso, ela interage com as proteínas APE1, DNA polimerase Beta e DNA glicosilases que estão relacionadas às vias de BER (*base excision repair*) e NER (*nucleotide excision repair*) (Cohen et al. 2010, Koike et al. 1997, Chattopadhyay et al. 2008, Kim et al. 2013, Prasad et al. 2012).

Como mencionado anteriormente, a HBP4 também interage com a p53 e com a DAXX (Nery et al. 2006b, Lemos and Kobarg 2006). Os níveis de p53 na célula são regulados pela ubiquitina ligase MDM2, que por sua vez é regulada por DAXX. Após indução de dano de DNA pelo tratamento com etoposídeo, DAXX é fosforilada por ATM (um dos sensores de dano de DNA, que transduzem a informação de dano aos mediadores) e o complexo DAXX-MDM2 é então rompido, ativando a p53 (Tang et al. 2013). Além disso, isoforma  $\Delta 113p53/\Delta 133p53$  da p53 apresenta expressão aumentada após dano por irradiação, promovendo reparo via HR e NHEJ, por regular a expressão gênica de RAD51/ 52 e LIG4 (Gong et al. 2015).

PIAS, outra interator da HBP4, quando superexpressa causa resistência a radiação ionizante e está envolvida nas vias de reparo HR e NHEJ (Liu et al. 2013). Ademais, PIAS3 atua como E3 ligase e modula a SUMOilação de BRCA1, que é necessária para sua atividade de ubiquitina ligase (Morris et al. 2009).

A SUMOilação que a HBP4 sofre também indica uma possível relação com reparo de dano de DNA (Saito et al. 2017). Essa modificação pós-traducional tem importante papel nessa regulação, de modo que diversas proteínas nucleares envolvidas com vias de reparo de dano de DNA são SUMOiladas, como JARID1B/KDM5B, JARID1C/KDM5C, p300, CBP, PARP1, SetDB1, e MBD1 (Gill 2004, Hendriks and Vertegaal 2015, Hendriks et al. 2015).

Para avaliar a resposta ao dano de DNA, é possível utilizar drogas que causam diferentes tipos de dano, como cisplatina, hidroxiuréia, camptotecina e etoposídeo (Vesela et al. 2017). O etoposídeo é um inibidor da topoisomerase II (topoII), aprovado

para tratamento como agente antineoplásico em 1983 (Hande 1998). Seu mecanismo de ação como causador de dano de DNA envolve a estabilização do complexo topoII:DNA, enquanto os sítios catalíticos da enzima são inativados pela interação com o etoposídeo, diminuindo o número de complexos ativos. Por causar um desacoplamento dos principais resíduos catalíticos, o etoposídeo impede a religação das extremidades clivadas do DNA, aumentando a quebra de dupla fita (Bender et al. 2008, Wu et al. 2011, Gibson et al. 2016). Essa indução de quebra de dupla fita ocorre independente do momento do ciclo celular (Rogakou et al. 1998).

As células controles e nocautes para o gene da HAP4 foram submetidas ao tratamento com etoposídeo para que a relação da HAP4 com processos de dano de DNA, que até então era apenas especulativa com base em seus interatores, fosse comprovada experimentalmente. Para isso os níveis da histona H2AX fosforilada na Ser-139 ( $\gamma$ H2AX) foram mensurados por *western blot* e imunofluorescência após o tratamento com etoposídeo.  $\gamma$ H2AX é um importante marcador de dano de DNA por ser uma resposta precoce ao dano e, por ser formada *de novo*, é um marcador mais confiável do que outras proteínas das vias de reparo, que são expressas mesmo quando não ocorre dano (Mah, El-Osta and Karagiannis 2010).

Foi observado nos ensaios de *western blot* que nas células depletadas de HAP4 os níveis de  $\gamma$ H2AX são muito inferiores aos observados para as células controles, quando ambas tiveram quebra de dupla fita induzida pelo etoposídeo. A imunofluorescência realizada com o anti-  $\gamma$ H2AX mostrou focos no núcleo das células controles após tratamento com etoposídeo. O mesmo não é observado para a célula nocaute, corroborando com os dados de *western blot*.

Esses dados indicam que a HAP4 possa afetar a célula de duas maneiras: a primeira, afetando a via *upstream* a H2AX, impedindo que o dano de DNA seja percebido pela maquinaria de reparo, e por isso não ocorre fosforilação da H2AX; e a segunda é *downstream* a H2AX, impedindo que a informação de dano no DNA seja transmitida às proteínas mediadoras por meio da  $\gamma$ H2AX.

Essa falha na resposta ao dano de DNA também foi observada no ensaio de ciclo celular realizado por meio de citometria de fluxo. Sem exposição ao tratamento com etoposídeo, não houve diferença no ciclo celular entre célula controle e nocaute. Entretanto, quando o dano é induzido as células controles apresentam parada do ciclo em G2/M, que é um ponto de checagem em que a célula avalia se o DNA está danificado

antes de prosseguir para a mitose (Chen et al. 2012, Lemmens and Lindqvist 2019, Campos and Clemente-Blanco 2020).

A não-parada do ciclo neste ponto de checagem nas células nocauteadas provavelmente se deve à falta de  $\gamma$ H2AX, mostrando que de fato a ausência de HABP4 influencia na maquinaria de resposta ao dano de DNA. Além disso, como a ausência de HABP4 aumenta a taxa de proliferação, a combinação fará com que a célula continue se dividindo rapidamente e, em última instância, a célula pode entrar em apoptose ou senescência por ter acumulado muitos danos que não foram reparados ao longo das divisões.

Devido ao que já é sabido acerca da rede de interação da HABP4, é provável que a célula nocaute de HABP4 entre em apoptose em resposta ao acúmulo de dano de DNA. No ensaio de expressão gênica global, muitos genes relacionados a apoptose alteraram sua expressão, como IL1B, GRK5, SHB, FAS, PNMA2 e MAP2K5. Para avaliar se o nocaute de HCT116 de fato entra em apoptose, ensaios como o de citometria de fluxo com marcação com anexina-FITC devem ser realizados. Com essa informação será possível entender o que ocorre com a célula nocaute em resposta ao dano de DNA não reparado.

## 6. CONCLUSÕES

---

- No artigo de revisão foi feito um extenso levantamento bibliográfico acerca do que já é sabido sobre a HABP4 e também sobre sua paróloga SERBP1. Foi apresentado o contexto funcional de ambas, bem como as informações sobre sua estrutura, modificações pós-traducionais e localização celular, fazendo uma análise sobre suas características sobrepostas e apontando o papel singular de cada uma. A revisão também aponta a relação de ambas com o câncer, e explicita a necessidade de entendermos melhor o papel da HABP4, e da SERBP1, na célula.
- O anticorpo anti-HABP4 produzido pela Abcam (ab178593) foi o que apresentou maior especificidade para a HABP4. Ele foi capaz não apenas de reconhecer a HABP4 endógena, como não reconhece a paróloga SERBP1, e por isso foi padronizado para ensaios de *western blot*.
- O nocaute de HABP4 em camundongo foi comprovado por meio de imunohistoquímica, utilizando o anticorpo anti-HABP4 da Sigma-Aldrich (HPA055969).
- O ensaio de incorporação de BrdU mostrou que houve maior taxa de proliferação nos animais nocaute em comparação aos controles.
- A análise do perfil de expressão proteico mostrou que PCNA e Ciclina D1 apresentaram uma expressão elevada quando os animais foram tratados com AOM/DSS. Interessantemente, os animais nocaute que não foram submetidos a combinação de drogas, também apresentaram o mesmo perfil molecular. Isso demonstra que a ausência da HABP4 torna os animais susceptíveis ao desenvolvimento de câncer de cólon.
- O nocaute de HABP4 em linhagem de carcinoma colorretal humano, HCT116, foi realizado com sucesso por meio da técnica de CRISPR/Cas9. A validação do nocaute foi confirmada tanto pela ausência da proteína, por *western blot*, quanto pela identificação de mutações no DNA que levam ao surgimento de *stop* códons prematuros, identificadas por meio de sequenciamento.

- Os ensaios de colônia, CCK8 e a tendência de maior expressão de PCNA observada nas células nocaute, mostram que a HABP4 regula processos proliferativos e que, na sua ausência, a célula apresenta uma maior taxa de crescimento celular. Além disso, esses resultados indicam que o efeito da falta de HABP4 é consistente entre camundongos e humanos.
- Em relação a resposta ao dano de DNA, foi observado que as células que não expressam HABP4 apresentam menos  $\gamma$ H2AX do que as células que expressam normalmente.
- Células controles previamente tratadas com etoposídeo apresentaram parada do ciclo em G2/M, em resposta ao dano de DNA causado. Esse mecanismo de correção não foi observado nas células nocaute, de modo que elas acumulam os danos e os propagam para as células seguintes, por não reconhece-los e/ou por não ser capaz de corrigi-los.
- De maneira geral, a ausência de HABP4 em células HCT116 causa aumento da proliferação celular e ao mesmo tempo possui falhas no mecanismo de resposta ao dano de DNA, de modo que ocorre acúmulo de dano nas novas células formadas. A união de alta proliferação e ausência de reconhecimento/reparo dos danos no DNA pode levar as células nocautes a entrar em apoptose ou em senescência celular.



## **7. APROVAÇÕES NOS COMITÊS DE ÉTICA**

---



## INFORMAÇÃO

INFORMAMOS que o projeto **2018/04 - Estudos funcionais da proteína Ki-1/57 e do seu parálogo CGI-55 em modelos celulares e de animais**, cujo pesquisador responsável é o Prof. Dr. Jörg Kobarg, sub-projeto “HABP4 e o câncer de cólon: caracterização do papel da HABP4 em células tumorais e em modelo animal”, do pós-graduando “Carolina Colleti”, encontra-se devidamente aprovado e regularizado junto a CIBio/IB-UNICAMP e a CTNBio, conforme legislação vigente. O professor responsável se compromete a incluir os novos alunos no próximo relatório anual CIBio - IB/UNICAMP em dezembro 2019.

Cidade Universitária “Zeferino Vaz”,

11 de outubro de 2019.

A handwritten signature in black ink, reading "José Luiz Proença Módena".

Prof. Dr. **JOSÉ LUIZ PROENÇA MÓDENA**

Presidente da CIBio

Instituto de Biologia – UNICAMP

Of. CIBio/IB 07/2018

Cidade Universitária "Zeferino Vaz",  
21 de maio de 2018.

**Prof. Dr. JORG KOBARG**  
**Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual**  
**Instituto de Biologia**  
**UNICAMP**

Prezado Professor:

Informamos que o projeto CIBio **2018/04 - Estudos funcionais da proteína Ki-1/57 e do seu parálogo CGI-55 em modelos celulares e de animais**, sob sua responsabilidade, envolvendo OGM do tipo I, foi aprovado pela CIBio-IB/Unicamp para ser desenvolvido nas dependências do **Laboratório de Mecanismos de Sinalização e Biotério de Camundongos Transgênicos (bloco E), DBBT/IB/UNICAMP**, nível de biossegurança 1:

**Transcrição do parecer:**  
**OGMs**

1. Bactérias E. coli (BL-21) com expressão de Ki-1/57 full size (ou com alterações- Ki-1/57 full size K336R + K213R + K276R; Ki-1/57 full size K336R + K213R + K276R + K313R + K306R; Ki-1/57 full size K336R + K276R)
2. Bactérias E. coli (BL-21) com expressão de CGI-55 em vetor pGEX4T.
3. Camundongos nocaute (Habp4<sup>-/-</sup>)

**Objetivos:**

Nesse projeto, o grupo de pesquisa do Prof. Jörg Kobarg pretende caracterizar as vias de sinalização e as alterações celulares envolvidas no desenvolvimento de tumores do cólon em animais nocaute para o gene Habp4 (que codifica a proteína Ki-1/57). Esses animais possuem maior susceptibilidade ao câncer de cólon e com esse projeto espera-se compreender o papel da proteína Ki-1/57 na inibição do câncer de cólon.

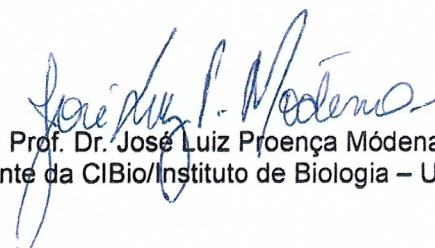
**Recomendação:** Aprovar sem ressalvas

Recomendamos que sejam observadas as instruções normativas referentes transporte e contenção da OGMs, disponíveis na webpage da CTNBio <[www.ctnbio.gov.br](http://www.ctnbio.gov.br)>.

**Informamos que toda documentação impressa e assinada deve ser entregue na Secretaria da CIBio, assim como deve estar disponível para futuras visitas/inspeções pela CIBio/IB-UNICAMP e pelos órgãos externos competentes.**

Atenciosamente,

Atenciosamente,



Prof. Dr. José Luiz Proença Módena  
Presidente da CIBio/Instituto de Biologia – UNICAMP

Cópia: Prof. Dr. Marcelo Alves da Silva Mori, Chefe do DBBT/IB/UNICAMP  
Prof. Dr. Claudio C. Werneck, coordenador do Biotério de Camundongos Transgênicos (bloco E),  
DBBT/IB/UNICAMP





UNICAMP



CEUA/UNICAMP

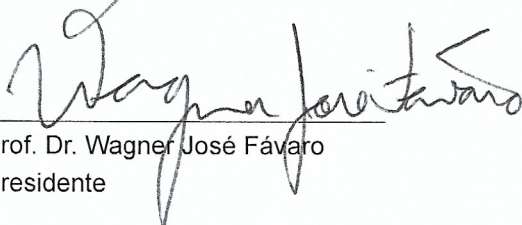
**CERTIFICADO**


Certificamos que a proposta intitulada **Caracterização funcional de proteínas reguladoras envolvidas no reparo de DNA**, registrada com o nº **4938-1/2018**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Jorg Kobarg e Talita Diniz Melo Hanchuk, Carolina Colleti, Flávia Regina Moraes da Silva**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de **25/07/2018**.

Finalidade:	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/08/2018 a 31/12/2020
Vigência da autorização para manipulação animal:	25/07/2018 a 31/12/2020
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / C57BL/6J-Habp4tm4.1LNBio /LNBio
No. de animais:	40
Idade/Peso:	8.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	20 Machos 20 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	40
Idade/Peso:	8.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	20 Machos 20 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / C57BL/6J-Habp4tm4.1LNBio /LNBio
No. de animais:	20
Idade/Peso:	8.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	10 Machos 10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	20
Idade/Peso:	8.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	10 Machos 10 Fêmeas
Origem:	Biotério de Camundongos Transgênicos (bloco E), DBBT/IB/UNICAMP (animais provenientes do LNBio)
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério de Camundongos Transgênicos (bloco E), DBBT/IB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio** e é restrita a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, **27 de junho de 2019**.

  
 Prof. Dr. Wagner José Fávaro  
 Presidente

  
 Rosângela dos Santos  
 Secretária Executiva

na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.





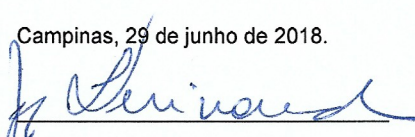
### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Manutenção de linhagem de camundongos selvagens e nocautes para o gene HAP4**, registrada com o nº **4937-1/2018**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Jorg Kobarg, Talita Diniz Melo Hanchuk, Flávia Regina Moraes da Silva e Carolina Colleti**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em **29 de junho de 2018**.

Finalidade:	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	15/07/2018-31/12/2023
Vigência da autorização para manipulação animal:	15/07/2018-31/12/2023
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / C57BL/6J-Habp4tm4.1LNBio/LNBio
No. de animais:	04
Idade/Peso:	04 meses / 30g
Sexo:	02 machos / 02 fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	04
Idade/Peso:	04 meses / 30g
Sexo:	02 machos / 02 fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / C57BL/6J-Habp4tm4.2LNBio/LNBio
No. de animais:	04
Idade/Peso:	04 meses / 30g
Sexo:	02 machos / 02 fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / C57BL/6J-Habp4tm3.1LNBio/LNBio
No. de animais:	04
Idade/Peso:	04 meses / 30g
Sexo:	02 machos / 02 fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / C57BL/6J-Habp4tm5.1LNBio/LNBio
No. de animais:	04
Idade/Peso:	04 meses / 30g
Sexo:	02 machos / 02 fêmeas
Origem:	LNBio
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério de Camundongos Transgênicos (bloco E), DBBT/IB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio** e é restrita a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 29 de junho de 2018.

  
Prof. Dr. Wagner José Fávaro  
Presidente

  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva

**IMPORTANTE:** Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

## 8. REFERÊNCIAS

---

- Bender, R. P., M. J. Jablonksy, M. Shadid, I. Romaine, N. Dunlap, C. Anklin, D. E. Graves & N. Osheroff (2008) Substituents on etoposide that interact with human topoisomerase II $\alpha$  in the binary enzyme-drug complex: contributions to etoposide binding and activity. *Biochemistry*, 47, 4501-9.
- Bologna-Molina, R., A. Mosqueda-Taylor, N. Molina-Frechero, A. D. Mori-Estevez & G. Sánchez-Acuña (2013) Comparison of the value of PCNA and Ki-67 as markers of cell proliferation in ameloblastic tumors. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 18, e174-9.
- Boulton, S., S. Kyle & B. W. Durkacz (2000) Mechanisms of enhancement of cytotoxicity in etoposide and ionising radiation-treated cells by the protein kinase inhibitor wortmannin. *Eur J Cancer*, 36, 535-41.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.
- Bressan, G. C. & J. Kobarg (2010) From protein interaction profile to functional assignment: the human protein Ki-1/57 is associated with pre-mRNA splicing events. *RNA Biol*, 7, 268-71.
- Bressan, G. C., E. C. Moraes, A. O. Manfiolli, T. M. Kuniyoshi, D. O. Passos, M. D. Gomes & J. Kobarg (2009a) Arginine methylation analysis of the splicing-associated SR protein SFRS9/SRP30C. *Cell Mol Biol Lett*, 14, 657-69.
- Bressan, G. C., A. J. Quaresma, E. C. Moraes, A. O. Manfiolli, D. O. Passos, M. D. Gomes & J. Kobarg (2009b) Functional association of human Ki-1/57 with pre-mRNA splicing events. *FEBS J*, 276, 3770-83.
- Bressan, G. C., J. C. Silva, J. C. Borges, D. O. Dos Passos, C. H. Ramos, I. L. Torriani & J. Kobarg (2008) Human regulatory protein Ki-1/57 has characteristics of an intrinsically unstructured protein. *J Proteome Res*, 7, 4465-74.
- Campos, A. & A. Clemente-Blanco (2020) Cell Cycle and DNA Repair Regulation in the Damage Response: Protein Phosphatases Take Over the Reins. *Int J Mol Sci*, 21.
- Chang, H. R., A. Munkhjargal, M. J. Kim, S. Y. Park, E. Jung, J. H. Ryu, Y. Yang, J. S. Lim & Y. Kim (2018) The functional roles of PML nuclear bodies in genome maintenance. *Mutat Res*, 809, 99-107.
- Chattopadhyay, R., S. Das, A. K. Maiti, I. Boldogh, J. Xie, T. K. Hazra, K. Kohno, S. Mitra & K. K. Bhakat (2008) Regulatory role of human AP-endonuclease (APE1/Ref-1) in YB-1-mediated activation of the multidrug resistance gene MDR1. *Mol Cell Biol*, 28, 7066-80.
- Chen, L., L. Lin, N. Xian & Z. Zheng (2019) Annexin A2 regulates glioma cell proliferation through the STAT3-cyclin D1 pathway. *Oncol Rep*, 42, 399-413.
- Chen, T., P. A. Stephens, F. K. Middleton & N. J. Curtin (2012) Targeting the S and G2 checkpoint to treat cancer. *Drug Discov Today*, 17, 194-202.
- Cohen, S. B., W. Ma, V. A. Valova, M. Algie, R. Harfoot, A. G. Woolley, P. J. Robinson & A. W. Braithwaite (2010) Genotoxic stress-induced nuclear localization of oncoprotein YB-1 in the absence of proteolytic processing. *Oncogene*, 29, 403-10.
- Colleti, C., T. D. Melo-Hanchuk, F. R. M. da Silva, Â. Saito & J. Kobarg (2019) Complex interactomes and post-translational modifications of the regulatory proteins HABP4 and SERBP1 suggest pleiotropic cellular functions. *World J Biol Chem*, 10, 44-64.
- Costa, F. C., A. Saito, K. A. Gonçalves, P. M. Vidigal, G. V. Meirelles, G. C. Bressan & J. Kobarg (2014) Ki-1/57 and CGI-55 ectopic expression impact cellular pathways involved in proliferation and stress response regulation. *Biochim Biophys Acta*, 1843, 2944-56.
- Das, S. & D. Mukhopadhyay (2011) Intrinsically unstructured proteins and neurodegenerative diseases: conformational promiscuity at its best. *IUBMB Life*, 63, 478-88.

- De Robertis, M., E. Massi, M. L. Poeta, S. Carotti, S. Morini, L. Cecchetelli, E. Signori & V. M. Fazio (2011) The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies. *J Carcinog*, 10, 9.
- Druckrey, H., R. Preussmann, F. Matzkies & S. Ivankovic (1967) [Selective production of intestinal cancer in rats by 1,2-dimethylhydrazine]. *Naturwissenschaften*, 54, 285-6.
- Dyson, H. J. & P. E. Wright (2005) Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 197-208.
- Fisher, R. C., K. Bellamkonda, L. Alex Molina, S. Xiang, D. Liska, S. K. Sarvestani, S. Chakrabarti, A. Berg, M. L. Jorgensen, D. Hatala, S. Chen, A. Aiello, H. D. Appelman, E. W. Scott & E. H. Huang (2019) Disrupting Inflammation-Associated CXCL8-CXCR1 Signaling Inhibits Tumorigenicity Initiated by Sporadic- and Colitis-Colon Cancer Stem Cells. *Neoplasia*, 21, 269-281.
- Gadhve, K., B. R. Gehi, P. Kumar, B. Xue, V. N. Uversky & R. Giri (2020) The dark side of Alzheimer's disease: unstructured biology of proteins from the amyloid cascade signaling pathway. *Cell Mol Life Sci*.
- Georgoulis, A., C. E. Vorgias, G. P. Chrousos & E. P. Rogakou (2017) Genome Instability and  $\gamma$ H2AX. *Int J Mol Sci*, 18.
- Gibson, E. G., M. M. King, S. L. Mercer & J. E. Dewese (2016) Two-Mechanism Model for the Interaction of Etoposide Quinone with Topoisomerase II $\alpha$ . *Chem Res Toxicol*, 29, 1541-8.
- Gill, G. (2004) SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes Dev*, 18, 2046-59.
- Gong, L., H. Gong, X. Pan, C. Chang, Z. Ou, S. Ye, L. Yin, L. Yang, T. Tao, Z. Zhang, C. Liu, D. P. Lane, J. Peng & J. Chen (2015) p53 isoform  $\Delta$ 113p53/ $\Delta$ 133p53 promotes DNA double-strand break repair to protect cell from death and senescence in response to DNA damage. *Cell Res*, 25, 351-69.
- Gonçalves, K. A., J. C. Borges, J. C. Silva, P. F. Papa, G. C. Bressan, I. L. Torriani & J. Kobarg (2010) Solution structure of the human signaling protein RACK1. *BMC Struct Biol*, 10, 15.
- Gonçalves, K. e. A., G. C. Bressan, A. Saito, L. G. Morello, N. I. Zanchin & J. Kobarg (2011) Evidence for the association of the human regulatory protein Ki-1/57 with the translational machinery. *FEBS Lett*, 585, 2556-60.
- Gray-McGuire, C., K. Guda, I. Adrianto, C. P. Lin, L. Natale, J. D. Potter, P. Newcomb, E. M. Poole, C. M. Ulrich, N. Lindor, E. L. Goode, B. L. Fridley, R. Jenkins, L. Le Marchand, G. Casey, R. Haile, J. Hopper, M. Jenkins, J. Young, D. Buchanan, S. Gallinger, M. Adams, S. Lewis, J. Willis, R. Elston, S. D. Markowitz & G. L. Wiesner (2010) Confirmation of linkage to and localization of familial colon cancer risk haplotype on chromosome 9q22. *Cancer Res*, 70, 5409-18.
- Hanahan, D. & R. A. Weinberg (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.
- (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-74.
- Hande, K. R. (1998) Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur J Cancer*, 34, 1514-21.
- Hansen, H., G. Bredfeldt, B. Havsteen & H. Lemke (1990) Protein kinase activity of the intracellular but not of the membrane-associated form of the Ki-1 antigen (CD30). *Res Immunol*, 141, 13-31.
- Hansen, H., H. Lemke, G. Bredfeldt, I. Könnecke & B. Havsteen (1989) The Hodgkin-associated Ki-1 antigen exists in an intracellular and a membrane-bound form. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 370, 409-16.
- Heaton, J. H., W. M. Dlakic, M. Dlakic & T. D. Gelehrter (2001) Identification and cDNA cloning of a novel RNA-binding protein that interacts with the cyclic nucleotide-responsive sequence in the Type-1 plasminogen activator inhibitor mRNA. *J Biol Chem*, 276, 3341-7.



- Hendriks, I. A., L. W. Treffers, M. Verlaan-de Vries, J. V. Olsen & A. C. O. Vertegaal (2015) SUMO-2 Orchestrates Chromatin Modifiers in Response to DNA Damage. *Cell Rep*, 10, 1778-1791.
- Hendriks, I. A. & A. C. Vertegaal (2015) SUMO in the DNA damage response. *Oncotarget*, 6, 15734-5.
- Henle, E. S. & S. Linn (1997) Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. *J Biol Chem*, 272, 19095-8.
- Huang, L., N. Grammatikakis, M. Yoneda, S. D. Banerjee & B. P. Toole (2000) Molecular characterization of a novel intracellular hyaluronan-binding protein. *J Biol Chem*, 275, 29829-39.
- Huang, Z., S. Huang, Q. Wang, L. Liang, S. Ni, L. Wang, W. Sheng, X. He & X. Du (2011) MicroRNA-95 promotes cell proliferation and targets sorting Nexin 1 in human colorectal carcinoma. *Cancer Res*, 71, 2582-9.
- Iakoucheva, L. M., C. J. Brown, J. D. Lawson, Z. Obradović & A. K. Dunker (2002) Intrinsic disorder in cell-signaling and cancer-associated proteins. *J Mol Biol*, 323, 573-84.
- Ji, D., Y. Feng, W. Peng, J. Li, Q. Gu, Z. Zhang, W. Qian, Q. Wang, Y. Zhang & Y. Sun (2020) NMI promotes cell proliferation through TGF $\beta$ /Smad pathway by upregulating STAT1 in colorectal cancer. *J Cell Physiol*, 235, 429-441.
- Juríková, M., L. Danihel, Š. Polák & I. Varga (2016) Ki67, PCNA, and MCM proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer. *Acta Histochem*, 118, 544-52.
- Kanth, P., J. Grimmer, M. Champine, R. Burt & N. J. Samadder (2017) Hereditary Colorectal Polyposis and Cancer Syndromes: A Primer on Diagnosis and Management. *Am J Gastroenterol*, 112, 1509-1525.
- Kim, H. L., P. Koedrich, S. M. Lee, Y. J. Kim & Y. R. Seo (2013) Base excision DNA repair defect in thioredoxin-1 (Trx1)-deficient cells. *Mutat Res*, 751-752, 1-7.
- Kobarg, C. B., J. Kobarg, D. P. Crosara-Alberto, T. H. Theizen & K. G. Franchini (2005) MEF2C DNA-binding activity is inhibited through its interaction with the regulatory protein Ki-1/57. *FEBS Lett*, 579, 2615-22.
- Kobarg, J., S. Schnittger, C. Fonatsch, H. Lemke, M. A. Bowen, F. Buck & H. P. Hansen (1997) Characterization, mapping and partial cDNA sequence of the 57-kD intracellular Ki-1 antigen. *Exp Clin Immunogenet*, 14, 273-80.
- Koike, K., T. Uchiumi, T. Ohga, S. Toh, M. Wada, K. Kohno & M. Kuwano (1997) Nuclear translocation of the Y-box binding protein by ultraviolet irradiation. *FEBS Lett*, 417, 390-4.
- Kopp, B., L. Khoury & M. Audebert (2019) Validation of the  $\gamma$ H2AX biomarker for genotoxicity assessment: a review. *Arch Toxicol*, 93, 2103-2114.
- Kubben, F. J., A. Peeters-Haesevoets, L. G. Engels, C. G. Baeten, B. Schutte, J. W. Arends, R. W. Stockbrügger & G. H. Blijham (1994) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a new marker to study human colonic cell proliferation. *Gut*, 35, 530-5.
- Kuo, L. J. & L. X. Yang (2008) Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo*, 22, 305-9.
- Lai, C. H., C. Y. Chou, L. Y. Ch'ang, C. S. Liu & W. Lin (2000) Identification of novel human genes evolutionarily conserved in *Caenorhabditis elegans* by comparative proteomics. *Genome Res*, 10, 703-13.
- Lemmens, B. & A. Lindqvist (2019) DNA replication and mitotic entry: A brake model for cell cycle progression. *J Cell Biol*, 218, 3892-3902.
- Lemos, T. A. & J. Kobarg (2006) CGI-55 interacts with nuclear proteins and co-localizes to p80-coilin positive-coiled bodies in the nucleus. *Cell Biochem Biophys*, 44, 463-74.
- Lemos, T. A., D. O. Passos, F. C. Nery & J. Kobarg (2003) Characterization of a new family of proteins that interact with the C-terminal region of the chromatin-remodeling factor CHD-3. *FEBS Lett*, 533, 14-20.

- Liu, S., Z. Fan, Z. Geng, H. Zhang, Q. Ye, S. Jiao & X. Xu (2013) PIAS3 promotes homology-directed repair and distal non-homologous end joining. *Oncol Lett*, 6, 1045-1048.
- Lu, E. M., J. Ratnayake & A. M. Rich (2019) Assessment of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression at the invading front of oral squamous cell carcinoma. *BMC Oral Health*, 19, 233.
- Mah, L. J., A. El-Osta & T. C. Karagiannis (2010) gammaH2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia*, 24, 679-86.
- Miller, M. W. & R. S. Nowakowski (1988) Use of bromodeoxyuridine-immunohistochemistry to examine the proliferation, migration and time of origin of cells in the central nervous system. *Brain Res*, 457, 44-52.
- Moolenbeek, C. & E. J. Ruitenbergh (1981) The "Swiss roll": a simple technique for histological studies of the rodent intestine. *Lab Anim*, 15, 57-9.
- Morimoto, M. & C. F. Boerkoel (2013) The role of nuclear bodies in gene expression and disease. *Biology (Basel)*, 2, 976-1033.
- Morris, J. R., C. Boutell, M. Keppler, R. Densham, D. Weekes, A. Alamshah, L. Butler, Y. Galanty, L. Pangon, T. Kiuchi, T. Ng & E. Solomon (2009) The SUMO modification pathway is involved in the BRCA1 response to genotoxic stress. *Nature*, 462, 886-90.
- Nakagawa, H., S. Liyanarachchi, R. V. Davuluri, H. Auer, E. W. Martin, A. de la Chapelle & W. L. Frankel (2004) Role of cancer-associated stromal fibroblasts in metastatic colon cancer to the liver and their expression profiles. *Oncogene*, 23, 7366-77.
- Nery, F. C., G. C. Bressan, M. R. Alborghetti, D. O. Passos, T. M. Kuniyoshi, C. H. Ramos, S. Oyama & J. Kobarg (2006a) A spectroscopic analysis of the interaction between the human regulatory proteins RACK1 and Ki-1/57. *Biol Chem*, 387, 577-82.
- Nery, F. C., D. O. Passos, V. S. Garcia & J. Kobarg (2004) Ki-1/57 interacts with RACK1 and is a substrate for the phosphorylation by phorbol 12-myristate 13-acetate-activated protein kinase C. *J Biol Chem*, 279, 11444-55.
- Nery, F. C., E. Rui, T. M. Kuniyoshi & J. Kobarg (2006b) Evidence for the interaction of the regulatory protein Ki-1/57 with p53 and its interacting proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, 341, 847-55.
- Pandurangan, A. K., T. Divya, K. Kumar, V. Dineshbabu, B. Velavan & G. Sudhandiran (2018) Colorectal carcinogenesis: Insights into the cell death and signal transduction pathways: A review. *World J Gastrointest Oncol*, 10, 244-259.
- Passos, D. O., G. C. Bressan, F. C. Nery & J. Kobarg (2006) Ki-1/57 interacts with PRMT1 and is a substrate for arginine methylation. *FEBS J*, 273, 3946-61.
- Piao, S. S. & B. Shang (2019) Pizotifen Inhibits the Proliferation and Migration of Colon Cancer HCT116 Cells by Down-regulating Wnt Signaling Pathway. *Ann Clin Lab Sci*, 49, 183-188.
- Pommier, Y., C. Redon, V. A. Rao, J. A. Seiler, O. Sordet, H. Takemura, S. Antony, L. Meng, Z. Liao, G. Kohlhagen, H. Zhang & K. W. Kohn (2003) Repair of and checkpoint response to topoisomerase I-mediated DNA damage. *Mutat Res*, 532, 173-203.
- Prasad, R., J. G. Williams, E. W. Hou & S. H. Wilson (2012) Pol  $\beta$  associated complex and base excision repair factors in mouse fibroblasts. *Nucleic Acids Res*, 40, 11571-82.
- Rawla, P., T. Sunkara & A. Barsouk (2019) Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Prz Gastroenterol*, 14, 89-103.
- Rocha, C., L. Papon, W. Cacheux, P. Marques Sousa, V. Lascano, O. Tort, T. Giordano, S. Vacher, B. Lemmers, P. Mariani, D. Meseure, J. P. Medema, I. Bièche, M. Hahne & C. Janke (2014) Tubulin glycosylases are required for primary cilia, control of cell proliferation and tumor development in colon. *EMBO J*, 33, 2247-60.
- Rogakou, E. P., D. R. Pilch, A. H. Orr, V. S. Ivanova & W. M. Bonner (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*, 273, 5858-68.
- Rohde, D., H. Hansen, M. Hafner, H. Lange, V. Mielke, M. L. Hansmann & H. Lemke (1992) Cellular localizations and processing of the two molecular forms of the Hodgkin-

- associated Ki-1 (CD30) antigen. The protein kinase Ki-1/57 occurs in the nucleus. *Am J Pathol*, 140, 473-82.
- Saito, Â., E. E. Souza, F. C. Costa, G. V. Meirelles, K. A. Gonçalves, M. T. Santos, G. C. Bressan, M. E. McComb, C. E. Costello, S. A. Whelan & J. Kobarg (2017) Human Regulatory Protein Ki-1/57 Is a Target of SUMOylation and Affects PML Nuclear Body Formation. *J Proteome Res*, 16, 3147-3157.
- Santofimia-Castaño, P., B. Rizzuti, Y. Xia, O. Abian, L. Peng, A. Velázquez-Campoy, J. L. Neira & J. Iovanna (2019) Targeting intrinsically disordered proteins involved in cancer. *Cell Mol Life Sci*.
- Schwab, U., H. Stein, J. Gerdes, H. Lemke, H. Kirchner, M. Schaadt & V. Diehl (1982) Production of a monoclonal antibody specific for Hodgkin and Sternberg-Reed cells of Hodgkin's disease and a subset of normal lymphoid cells. *Nature*, 299, 65-7.
- Staněk, D. (2017) Cajal bodies and snRNPs - friends with benefits. *RNA Biol*, 14, 671-679.
- Tang, J., T. Agrawal, Q. Cheng, L. Qu, M. D. Brewer, J. Chen & X. Yang (2013) Phosphorylation of Daxx by ATM contributes to DNA damage-induced p53 activation. *PLoS One*, 8, e55813.
- Tian, L., Y. Li, R. Chang, P. Zhang, J. Zhang & L. Huo (2019) Lentiviral vector-mediated IL-9 overexpression stimulates cell proliferation by targeting c-myc and cyclin D1 in colitis-associated cancer. *Oncol Lett*, 17, 175-182.
- Tompa, P. & M. Fuxreiter (2008) Fuzzy complexes: polymorphism and structural disorder in protein-protein interactions. *Trends Biochem Sci*, 33, 2-8.
- Uversky, V. N. (2014) Wrecked regulation of intrinsically disordered proteins in diseases: pathogenicity of deregulated regulators. *Front Mol Biosci*, 1, 6.
- Vesela, E., K. Chroma, Z. Turi & M. Mistrik (2017) Common Chemical Inductors of Replication Stress: Focus on Cell-Based Studies. *Biomolecules*, 7.
- Wu, C. C., T. K. Li, L. Farh, L. Y. Lin, T. S. Lin, Y. J. Yu, T. J. Yen, C. W. Chiang & N. L. Chan (2011) Structural basis of type II topoisomerase inhibition by the anticancer drug etoposide. *Science*, 333, 459-62.
- Zhang, Y., Z. Li & Z. Lan (2020) Silencing UNC5B antisense lncRNA 1 represses growth and metastasis of human Colon cancer cells via raising miR-622. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 48, 60-67.
- Zhao, L., H. Kong, H. Sun, Z. Chen, B. Chen & M. Zhou (2018) lncRNA-PVT1 promotes pancreatic cancer cells proliferation and migration through acting as a molecular sponge to regulate miR-448. *J Cell Physiol*, 233, 4044-4055.
- Zhou, B. B. & S. J. Elledge (2000) The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*, 408, 433-9.
- Zhou, J., M. Hu, F. Wang, M. Song, Q. Huang & B. Ge (2017) miR-224 Controls Human Colorectal Cancer Cell Line HCT116 Proliferation by Targeting Smad4. *Int J Med Sci*, 14, 937-942.

## 9. ANEXOS

---

### 9.1 Artigo científico

*“Complex interactomes and post-translational modifications of the regulatory proteins HABP4 and SERBP1 suggest pleiotropic cellular functions”*

**Carolina Colleti**, Talita Diniz Melo-Hanchuk, Flávia Regina Moraes da Silva, Ângela Saito, Jörg Kobarg

### 9.2 Certificado Turnitin

## Complex interactomes and post-translational modifications of the regulatory proteins HABP4 and SERBP1 suggest pleiotropic cellular functions

Carolina Colleti, Talita Diniz Melo-Hanchuk, Flávia Regina Moraes da Silva, Ângela Saito, Jörg Kobarg

**ORCID number:** Carolina Colleti (0000-0001-7626-5601); Talita Diniz Melo-Hanchuk (0000-0001-7268-6687); Flávia Moraes da Silva (0000-0003-0721-6843); Ângela Saito (0000-0003-4421-9226); Jörg Kobarg (0000-0002-9419-0145).

**Author contributions:** Colleti C, Melo-Hanchuk TD, da Silva FRM, Saito Â and Kobarg J performed the literature search, analyzed and interpreted the data, generated the figures, contributed different sections of the manuscript and collated the final version of the text together. All authors read, revised and approved the final version.

**Supported by** the “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico”, Grant No. 302534/2017-2 and the “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo” (FAPESP, Grant 2014/21700-3, to JK).

**Conflict-of-interest statement:** The authors declare no conflict-of-interest.

**Open-Access:** This article is an open-access article which was selected by an in-house editor and fully peer-reviewed by external reviewers. It is distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and

Carolina Colleti, Flávia Regina Moraes da Silva, Jörg Kobarg, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Campinas, Campinas 13083-871, Brazil

Carolina Colleti, Talita Diniz Melo-Hanchuk, Flávia Regina Moraes da Silva, Jörg Kobarg, Institute of Biology, Department of Biochemistry and Tissue Biology, University of Campinas, Campinas 13083-862, Brazil

Ângela Saito, Laboratório Nacional de Biociências, CNPEM, Campinas 13083-970, Brazil

**Corresponding author:** Jörg Kobarg, PhD, Full Professor, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Campinas, Rua Monteiro Lobato 255, Bloco F, Sala 3, Campinas 13083-862, Brazil. [jorgkoba@unicamp.br](mailto:jorgkoba@unicamp.br)  
**Telephone:** +55-19-35211443

### Abstract

The 57 kDa antigen recognized by the Ki-1 antibody, is also known as intracellular hyaluronic acid binding protein 4 and shares 40.7% identity and 67.4% similarity with serpin mRNA binding protein 1, which is also named CGI-55, or plasminogen activator inhibitor type-1-RNA binding protein-1, indicating that they might be paralog proteins, possibly with similar or redundant functions in human cells. Through the identification of their protein interactomes, both regulatory proteins have been functionally implicated in transcriptional regulation, mRNA metabolism, specifically RNA splicing, the regulation of mRNA stability, especially, in the context of the progesterone hormone response, and the DNA damage response. Both proteins also show a complex pattern of post-translational modifications, involving Ser/Thr phosphorylation, mainly through protein kinase C, arginine methylation and SUMOylation, suggesting that their functions and locations are highly regulated. Furthermore, they show a highly dynamic cellular localization pattern with localizations in both the cytoplasm and nucleus as well as punctuated localizations in both granular cytoplasmic protein bodies, upon stress, and nuclear splicing speckles. Several reports in the literature show altered expressions of both regulatory proteins in a series of cancers as well as mutations in their genes that may contribute to tumorigenesis. This review highlights important aspects of the structure, interactome, post-translational modifications, sub-cellular localization and function of both regulatory proteins and further discusses their possible functions and their potential as tumor markers in different cancer settings.

the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

**Manuscript source:** Unsolicited manuscript

**Received:** July 5, 2019

**Peer-review started:** July 16, 2019

**First decision:** August 20, 2019

**Revised:** August 30, 2019

**Accepted:** October 15, 2019

**Article in press:** October 15, 2019

**Published online:** November 21, 2019

**P-Reviewer:** Chen CJ, Tanabe S, Zhou J

**S-Editor:** Ma RY

**L-Editor:** Webster JR

**E-Editor:** Qi LL



**Key words:** Cancer; Cell signaling; Regulatory protein; Protein interactions; Post-translational modifications

©The Author(s) 2019. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

**Core tip:** Intracellular hyaluronic acid binding protein 4 and serpin mRNA binding protein 1 are paralog human regulatory proteins that share 41% amino acid sequence identity. The characterization of their protein interactomes suggested their functional association with transcriptional regulation, mRNA metabolism and in the cell's DNA damage and stress responses. Their complex post-translation modifications, involving phosphorylation, arginine methylation and SUMOylation, as well as their finely regulated sub-cellular localization in the nucleus and cytoplasm as well as in several cytoplasmic and nuclear granules suggest extensive functional regulation. This review discusses the functional and structural aspects and emerging roles of these regulatory proteins in human cancer.

**Citation:** Colleti C, Melo-Hanchuk TD, da Silva FRM, Saito Â, Kobarg J. Complex interactomes and post-translational modifications of the regulatory proteins HABP4 and SERBP1 suggest pleiotropic cellular functions. *World J Biol Chem* 2019; 10(3): 44-64

**URL:** <https://www.wjgnet.com/1949-8454/full/v10/i3/44.htm>

**DOI:** <https://dx.doi.org/10.4331/wjbc.v10.i3.44>

## INTRODUCTION

Ki-1 was the first monoclonal antibody specific for Hodgkin and Stenberg-Reed cells in Hodgkin's lymphoma<sup>[1]</sup>. Ki-1 recognizes CD30, a glycoprotein of 120 kDa found on the surface of Hodgkin's cells, and cross-reacts with an intracellular antigen of 57 kDa, named Ki-1/57, which was functionally and structurally uncharacterized at that time<sup>[2,3]</sup>. Ki-1/57 was also named intracellular hyaluronic acid binding protein 4 (IHABP4; GeneBank: AF241831) as it bound to hyaluronic acid *in vitro*<sup>[4]</sup>. Huang and co-workers also observed that IHABP4 binds to others negatively charged molecules such as glycosaminoglycans, e.g. chondroitin sulfate and heparin sulfate, and to RNA. However, the functional role of these interactions is not completely understood. The recommended name is hyaluronic acid binding protein 4 (HABP4).

HABP4 shares 40.7% identity and 67.4% similarity with serpin mRNA binding protein 1 (SERBP1), indicating that they might be paralogs, possibly with similar or redundant functions in human cells<sup>[5]</sup>. The name of its putative paralog was originally CGI-55, derived from: "Comparative Gene Identification", a method used to search for related genes. In the year 2000, Lin's group obtained 150 potential full-length novel human genes through CGI, identified from the *Caenorhabditis elegans* proteome<sup>[6]</sup>, with the number 55 being one of the SERBP1 transcript variants (GenBank: AF151813). Independently, CGI-55 was identified as an interactor of plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) RNA; therefore, it was also called PAI-1 RNA-binding protein or PAI-RBP1<sup>[7]</sup>. Moreover, other names such as HABP4L and SERPINE 1 were also used. As SERBP1 is most widely used it will be adopted in this review.

Since the identification of these two proteins, several studies have addressed their structure and function. Here, we present a detailed report on the current knowledge on the HABP4 and SERBP1 proteins.

## HABP4 AND SERBP1 STRUCTURE

Structurally, HABP4's amino acid sequence, has a high level of disorder-promoting amino acids (Alanine, Arginine, Glycine, Glutamine, Serine, Proline, Glutamic acid, Lysine), a high net charge and a low mean hydrophathy value in its amino acid composition<sup>[8]</sup>. These features are observed for most intrinsically unstructured proteins (IUP) and inhibit the formation of a hydrophobic core or a regular secondary structure<sup>[9,10]</sup>. Bressan *et al*<sup>[8]</sup> demonstrated using size exclusion chromatography (SEC), analytical ultracentrifugation and small angle X-ray scattering (SAXS) studies on the HABP4 C-terminal region (HABP4<sub>122-413</sub>), that it is an elongated monomer in solution,

without a well-defined core. Thus, the HABP4 C-terminal has been shown to be a pre-molten globule of 37 kDa.

A proteinase K sensitivity assay showed that HABP4<sub>122-413</sub> was readily degraded, confirming its flexibility and absence of a stable hydrophobic core. Additionally, the spectrum obtained by circular dichroism (CD) experiments was typical of a random coil or denatured proteins, indicating the absence of a regular secondary structure<sup>[8]</sup>. However, after the addition of 2,2,2-trifluoroethanol (TFE), the CD pattern for HABP4 shifted, showing an increase in secondary structure. TFE is an alcohol used to promote increased hydrogen bonding, and thus increases propagation of the secondary structures in polypeptides<sup>[11,12]</sup>. The appearance of secondary structure is commonly seen for IUPs when they associate with their interactors<sup>[13]</sup>. The gain of the structure may be explained by the existence of secondary structural elements in the protein sequence<sup>[14]</sup>.

Despite the lack of structural studies for SERBP1, its high level of similarity and identity to HABP4 on the amino acid sequence level, allowed comparative bioinformatics analyses, which suggested that SERBP1 may also be an IUP. The protein secondary structure prediction (PSIPRED) analysis of both proteins illustrated that both HABP4 and SERBP1, have similar contents of predicted secondary structure and random coil. This may lead to the conclusion that that both HABP4 and SERBP1, are unstructured proteins (Figure 1).

Proteins belonging to the IUP family are associated with a plethora of cellular processes, such as translation, RNA recognition, transcriptional regulation, cell cycle control, membrane fusion and transport, protein phosphorylation, storage of small molecules and the regulation and assembly of protein complexes<sup>[13,15]</sup>. All these biological processes are in accordance with the present knowledge on the interaction network of HABP4 and SERBP1 (see the Functional aspects of HABP4 and SERBP1 in the following sections for more details).

## POST-TRANSLATIONAL MODIFICATIONS

Post-translational modifications (PTMs) control protein functions by covalently attaching molecules to specific amino acid residues. The types of modifications exceed 200, such as phosphorylation, glycosylation, methylation, acetylation, ubiquitinylation, and SUMOylation among others, with phosphorylation being the most widely studied<sup>[16-19]</sup>.

The PTMs of HABP4 and SERBP1 have been discovered over the years mainly due to the identification of their interaction with modifying proteins. Until now, HABP4 and SERBP1 were predicted to have phosphorylation, methylation and SUMOylation sites, as shown in Figure 2<sup>[20-22]</sup>. These PTMs and their impact on the functions of HABP4 and SERBP1 are described below.

### Phosphorylation

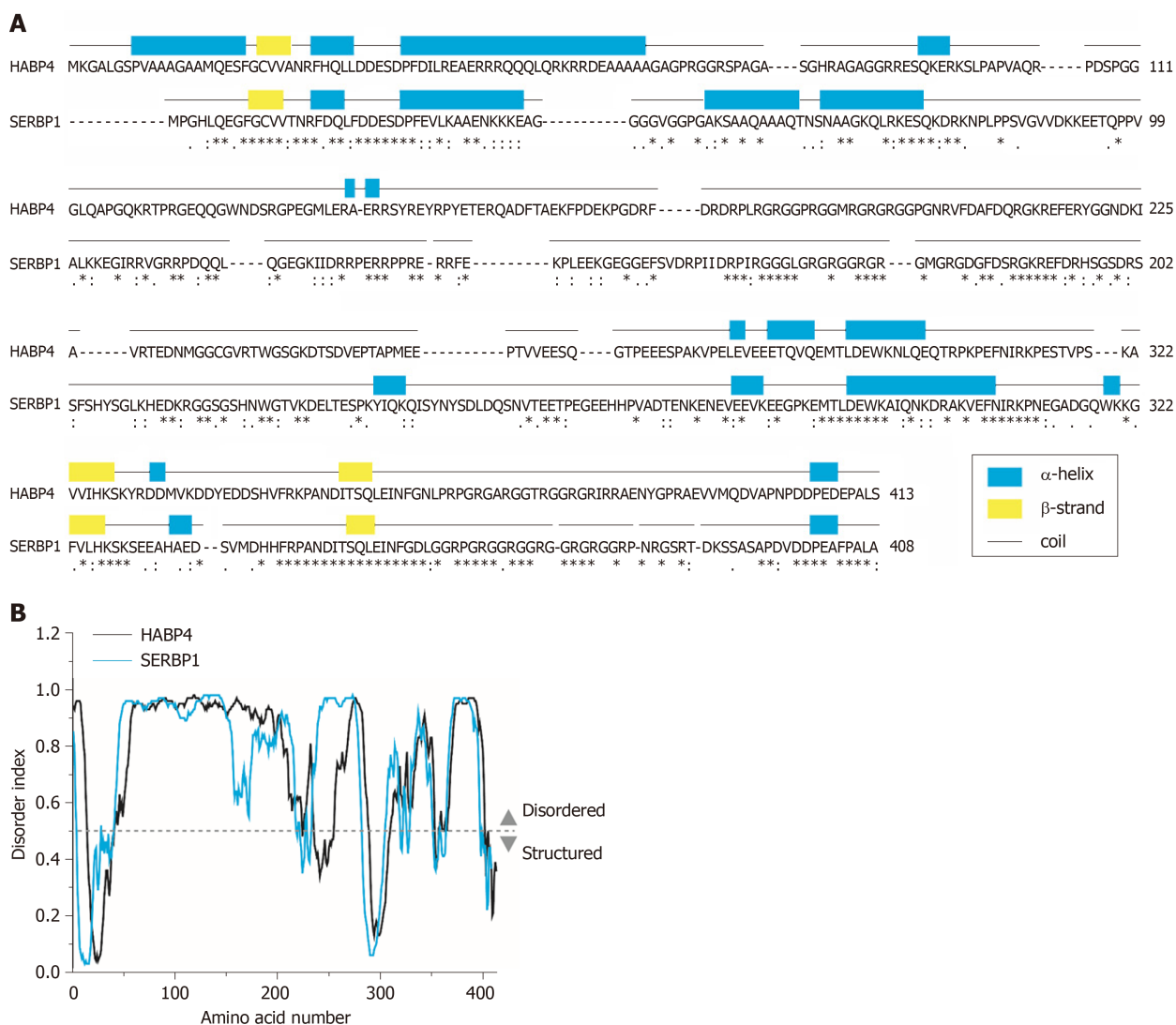
Initially, immunoprecipitates of HABP4 from three different tumor cell lines (L540, U266/B1 and Raji Burkitt), using the Ki-1 antibody, revealed an associated serine/threonine protein kinase activity<sup>[23]</sup>. Based on this it was also hypothesized that HABP4 enzymatic activity could be regulated by self-phosphorylation. This hypothesis was ruled out by Nery and co-workers<sup>[20]</sup>, who demonstrated that full-length recombinant HABP4 did neither exert kinase activity itself nor towards other proteins. These results are in agreement with the sequence analyses that also do not show any kinase domain features in the HABP4 amino acid sequence (Figure 2).

Yeast two-hybrid (Y2H) screens identified the Receptor of ACtivated Kinase 1 (RACK1), a protein kinase C (PKC) adaptor protein, as a HABP4 interactor and it was hypothesized that HABP4 could be a substrate for phosphorylation by PKC, explaining the earlier findings of the co-precipitated kinase activity<sup>[23]</sup>.

Experiments with L540 cells showed that HABP4 is indeed phosphorylated by PKC and that its phosphorylation level is increased when cells are activated by the addition of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)<sup>[20]</sup>. Furthermore, HABP4 can be phosphorylated by different PKC isoforms, such as PKC $\alpha\beta$ , PKC $\delta$ , PKC $\lambda/\zeta$  and more strongly by PKC $\theta$ . PKC $\mu$  was the only member of the PKC family that did not phosphorylate HABP4 *in vitro*<sup>[20]</sup>.

The phosphorylation of HABP4 does not seem to be affected by the presence or absence of RACK1, which binds to HABP4 C-terminal domain. On the other hand, the interactions between HABP4 and nuclear proteins, including RACK1 and CHD3<sup>[5,20]</sup>, were down-regulated in response to phosphorylation. This modulation of interaction in response to phosphorylation shows that HABP4, at some level, may regulate the functions of the adaptor protein RACK1 or other protein interactors.





**Figure 1** Bioinformatics analysis of hyaluronic acid binding protein 4 and serpin mRNA binding protein 1 amino acid sequences. A: Alignment between hyaluronic acid binding protein 4 (HABP4) and serpin mRNA binding protein 1 (SERBP1) and their predicted secondary structure content obtained by Clustal Omega and PSIPRED 4.0, respectively; B: Predictable disorder of HABP4 and SERBP1 structure obtained by DISOPRED 3. Below amino acids: Asterisk: Identical amino acid residues; colon: Strong similar properties; period: Weak similar properties. HABP4: Hyaluronic acid binding protein 4; SERBP1: Serpin mRNA binding protein 1.

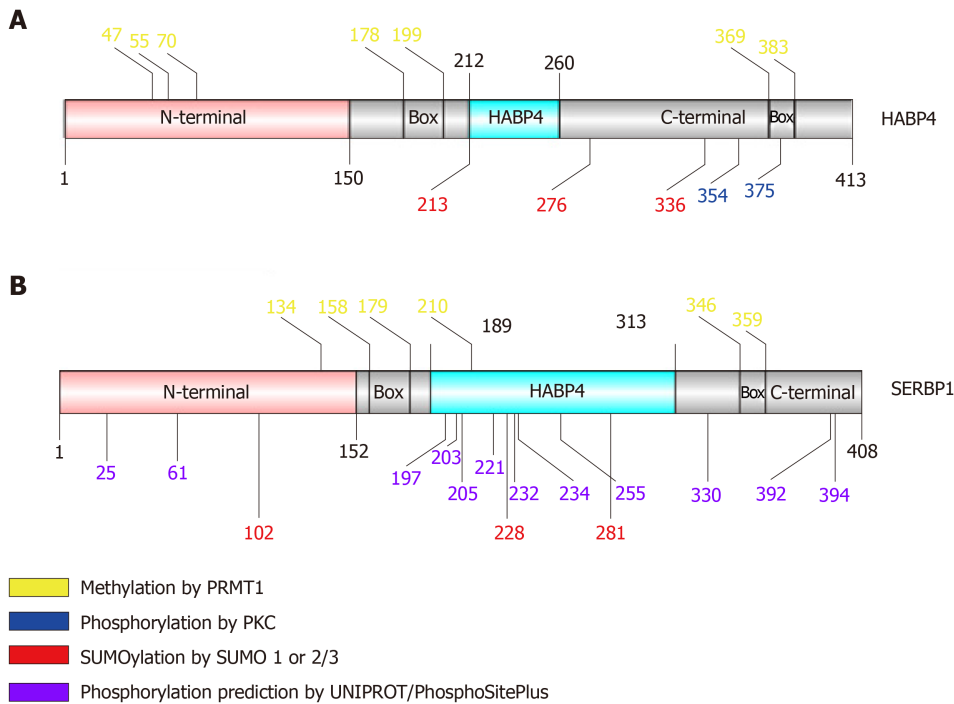
PKC phosphorylates HABP4 only in its C-terminal domain, which contains 15 potential Ser/Thr residues that could be targets of phosphorylation. Interestingly, only two of the threonine residues (T354 and T375) were indeed phosphorylated *in vitro* by commercial PKC-Pan, showing that PKC activity on HABP4 is highly specific<sup>[20]</sup> (Figures 2A and 3A).

More recently, SERBP1 was also established as a RACK1 interactor through Y2H screens<sup>[24]</sup>. Since RACK1 can recruit PKC, we can predict that SERBP1 is also likely to be modified by phosphorylation, since several of the Ser/Thr residues are conserved in both amino acid sequences (Figure 2).

### Methylation

Many of the cellular processes that are mediated by specific interactions between proteins and other proteins or nucleic acids, are regulated by arginine methylation. The RGG/RXR box, where X is any amino acid, is the main target of arginine methyltransferases, such as PRMT1. In general, these motifs are found in proteins related to transcriptional regulation and RNA processing. HABP4 and SERBP1 present conserved RGG/RXR boxes in their sequences, localized mostly in their C-terminal regions (Figure 2). Both, HABP4 and SERBP1, were methylated by PRMT1 *in vitro*<sup>[26-28]</sup>. *In vivo* assays with L540 cells showed that the levels of HABP4 decrease in the cytoplasm in response to the methylation inhibitor Adox (adenosine-2',3'-dialdehyde) treatment, indicating that the methylation status of HABP4 can affect its cellular distribution. Additionally, nuclear HABP4 was stronger methylated than that localized in the cytoplasm. Interestingly, the paralog SERBP1 behaved otherwise. In





**Figure 2 Schematic view of hyaluronic acid binding protein 4 and serpin mRNA binding protein 1 primary structure identifying residues that exhibit post-translational modification.** The pink region corresponds to the N-terminal domain; gray corresponds to the C-terminal; light blue corresponds to the HABP4 domain. "Box" indicates RGG/RXR boxes.

untreated cells, SERBP1 is mostly found in the nucleus and upon Adox treatment more in the cytoplasm<sup>[26]</sup> (Figure 3C).

The interaction between HABP4 and RACK1 did not influence the methylation pattern. Although RACK1 interacts with the C-terminal domain of HABP4, methylation of the RGG/RXR box cluster 369-383 continued to occur. However, it was reported that significant inhibition of methylation in the C-terminal domains of HABP4 and SERBP1 occurred, when they were previously phosphorylated<sup>[26-28]</sup>.

### SUMOylation

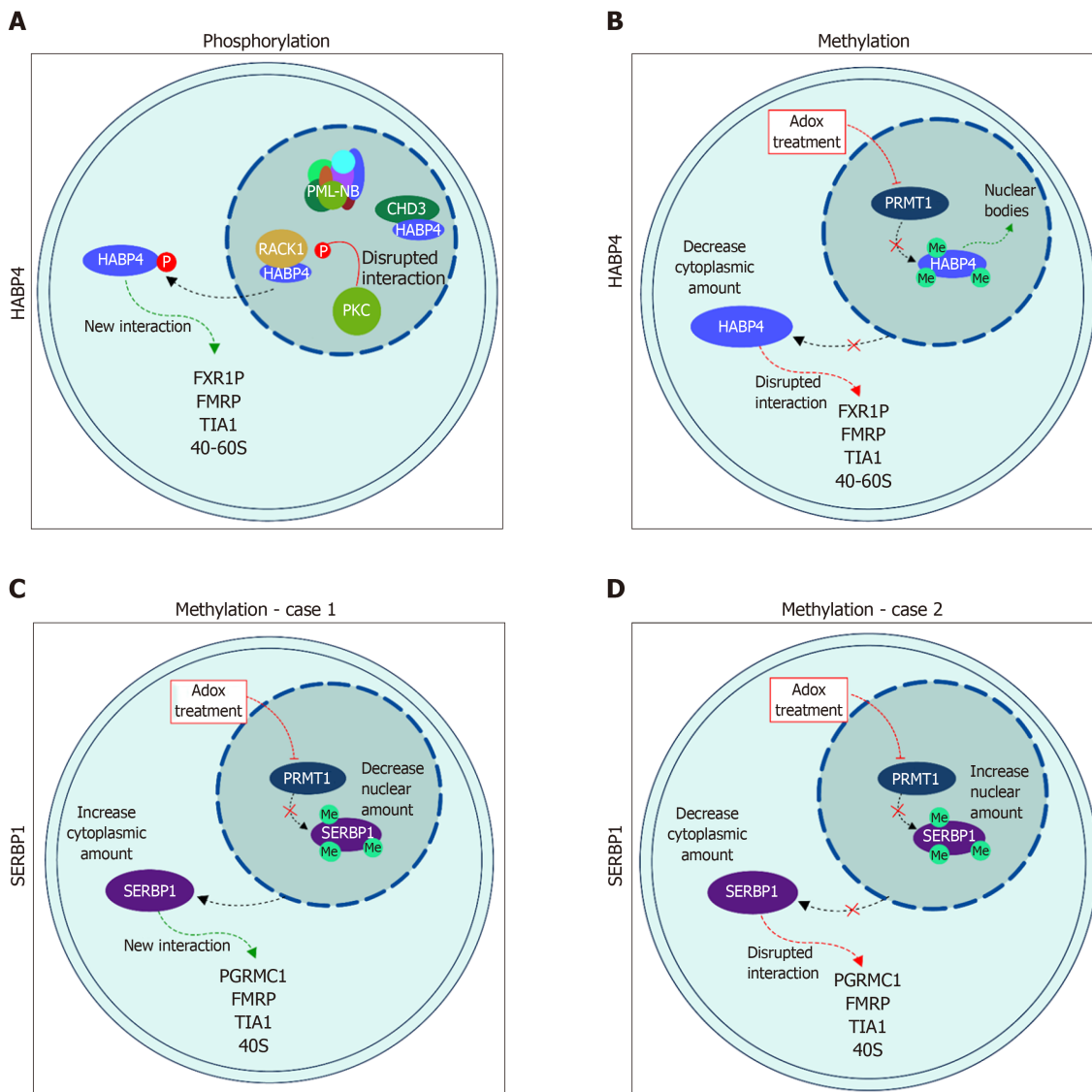
SUMOylation is the attachment of Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO) proteins to a lysine residue in the specific target protein. This PTM regulates proliferation<sup>[29]</sup>, transcription<sup>[30]</sup>, mRNA processing and metabolism<sup>[31]</sup>, among many other processes. The insight that HABP4 and its paralog SERBP1 could be SUMOylated was derived by the finding that both interact with proteins related to the SUMOylation machinery, including: UBC9, PIAS3 and TOPORS interacting with HABP4 and UBA2, PIAS-1/ -3 /-y and TOPORS all interacting with SERBP1<sup>[32,33]</sup>.

HABP4 has seven predicted sites for SUMOylation, of which three are highly likely: Lysine 213, 276 and 336 (Figure 2A). Likewise, SERBP1 exhibited fifteen potential SUMOylation sites, of which six had a higher probability of being conjugated with SUMO (Figure 2B). *In vitro* assays showed that HABP4 is indeed SUMOylated by SUMO-2/3 at the three main targets<sup>[22]</sup>. *In vivo* experiments revealed that wild-type HABP4, but not the SUMOylation-defective mutant HABP4<sup>K213R/K276R/K336R</sup>, co-immunoprecipitated with anti-SUMO-1 and anti-SUMO-2 antibodies.

The same approach was used for SERBP1, and mutations in the three lysine residues with the highest score (K102R/K228R/K281R), resulted in SERBP1 being unavailable for modification by SUMO conjugation that was observed in the wild-type protein<sup>[22]</sup>.

SUMOylation by SUMO-1 or SUMO-2 does not affect the profile of SERBP1's interaction partners. The analysis of the partners identified by immunoprecipitation followed by tandem mass spectrometry (IP-MS/MS) with or without SUMO-1 or SUMO-2 transfection, resulted in the identification of proteins related to gene expression regulation. Specifically proteins involved in transcriptional control, RNA splicing and translation, ribosome biogenesis, apoptosis or mitosis, but no significant differences were observed between SUMO-1 and SUMO-2 co-transfection<sup>[22]</sup>.

On the other hand, HABP4 displayed functional differences when co-expressed with SUMO-1 or SUMO-2. HABP4 co-immunoprecipitated 68 proteins when co-expressed with SUMO-1, whereas only 29 proteins were detected when HABP4 was



**Figure 3 Cellular localization of hyaluronic acid binding protein 4 and serpin mRNA binding protein 1 in response to post-translational modification.** A: Localization of hyaluronic acid binding protein 4 (HABP4), in light blue, after phosphorylation; and B: after methylation; C and D: Localization of serpin mRNA binding protein 1 (SERBP1), in purple, after methylation. SERBP1 methylation is still controversial and both possibilities are presented as related in the literature: C<sup>[26]</sup> and D<sup>[28]</sup>. Please see text for details. HABP4: Hyaluronic acid binding protein 4; SERBP1: Serpin mRNA binding protein 1.

co-expressed with SUMO-2. The enrichment of biological processes also presented some differences: HABP4 co-expressed with SUMO-1 was found to be involved in the regulation of transcription, RNA splicing, translation, ribosome biogenesis, mitotic cell cycle, the apoptotic process, and DNA repair. However, when HABP4 was co-expressed with SUMO-2, much fewer biological processes were observed, such as gene expression regulation (transcription, RNA splicing and translation) and telomere maintenance<sup>[22]</sup>. In summary, these data showed that HABP4 and SERBP1, despite having similar modification sites, respond in different ways to these PTMs in the context of their protein interactomes.

### Cellular localization of HABP4 and SERBP1

More than two decades ago, Rhode and co-workers showed that HABP4 has both cytoplasmic and nuclear localizations. In the nucleus it is often associated with heterochromatin, euchromatin, and the nucleolus<sup>[3]</sup>. The paralog SERBP1 also exhibited shuttling between cytoplasm and nuclei<sup>[5]</sup>. Since then, numerous data on these protein localizations have been reported. For example, Nery and co-workers<sup>[20]</sup> showed that the phosphorylation of HABP4 by PKC affects its cellular localization. Upon PMA-stimulus, HABP4 was no longer found in the nucleus, whereas its cytoplasmic level increased (Figure 3A).

Methylation also influences HABP4 and SERBP1 localization patterns. The methylation inhibition by Adox treatment leads to a decrease in HABP4 cytoplasmic

staining, but shuttling from the nucleus to the cytoplasm of SERBP1<sup>[26]</sup>. The localization of SERBP1 is still controversial. Lee and co-workers<sup>[27,28]</sup>, showed that SERBP1 nuclear staining is stronger than cytoplasmic staining after methylation inhibition (Figure 3D). Altogether, these data suggest that HABP4 and SERBP1 are involved in nuclear functions, this possibly depends on the phase of the cell cycle, or on specific cell growth conditions.

Once in the nucleus, HABP4 was detected at sub-structures such as nucleoli, where ribosome biogenesis and maturation occur<sup>[34]</sup>. Both, SERBP1 and HABP4, were found to co-localize with p80-coilin, a marker for Cajal bodies, and HABP4 has also been observed to co-localize with GEMS (Gemini of coiled bodies) in cells treated with Adox<sup>[33,34]</sup>. Cajal bodies and GEMS are both considered nuclear compartments involved in small nuclear ribonucleoproteins snRNP storage or the assembly of pre-mRNA splicing complexes<sup>[35,36]</sup>. Upon Adox treatment, HABP4 has also been shown to co-localize with SC-35, a marker protein for splicing speckles<sup>[34]</sup>. These sub-compartments are known to store pre-mRNA splicing complexes, and HABP4 interacts with SFRRS1/9 and hnRNPO, both known as splicing regulatory proteins<sup>[34]</sup>. In summary, these data suggest that methylation not only promotes nuclear import but also directs HABP4 more specifically to selected nuclear bodies.

The fact that HABP4 and SERBP1 interacted with several proteins related to promyelocytic leukemia nuclear bodies (PML-NBs), raised interest to determine if both proteins would play a role in the formation and distribution of these bodies. PML-NBs are related to protein modification, transcriptional regulation, DNA-damage response, DNA repair, cell proliferation and apoptosis<sup>[37]</sup>. The relationship of HABP4 and SERBP1 with PML-NBs was explored by Saito and co-workers, who showed that the number of PML-NBs decreases in response to HABP4 or SERBP1 over-expression. After treatment with arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), which under normal conditions increased PML-NBs formation, their abundance was significantly lower in cells over-expressing HABP4 and SERBP1. Interestingly, SERBP1 and HABP4 SUMOylation-defective mutants revealed distinct behaviors in relation to PML-NBs. While the SERBP1 SUMOylation-defective mutant displayed an effect similar to the wild-type protein, the HABP4 SUMOylation-defective mutant did not have any impact on the number of PML-NBs. In addition, the presence of HABP4 or SERBP1 seems to affect the diffuse distribution of the PML protein<sup>[22]</sup>.

The regulation of HABP4's localization to PML-NBs by SUMOylation is exactly the opposite of what was observed for PML protein. PML only co-localizes with nuclear bodies when it is SUMOylated<sup>[38]</sup>. Although HABP4 and SERBP1 influenced the formation and distribution of PML-NBs, the PML protein, the main component of the PML-NBs, did not interact with HABP4 and SERBP1 in IP-MS/MS experiments. It is known that changes in the formation and distribution of PML-NBs can also occur in response to UV-C light exposure in a p53-dependent manner<sup>[39]</sup>. It has also been well established that HABP4 interacts with p53, reducing its transcriptional activity<sup>[32]</sup>. It could be hypothesized that the role of HABP4 in PML-NBs formation is mediated by regulation through p53, which on the other hand is part of PML-NBs.

Outside the nucleus, HABP4 interacts with the Fragile X-Related Protein 1 (FXR1P) and the Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP), both of which are related to translational regulation<sup>[40,41]</sup>. Furthermore, it co-localizes with TIA1 upon arsenite challenge, which is a marker protein for stress granules<sup>[40,42]</sup>.

In ribosomal fractions, HABP4 was detected in fractions containing the 40 and 60S ribosomal subunits and in small amounts in the polysome fraction, thereby pointing to possible additional roles of HABP4 in the context of translation<sup>[40]</sup>. Furthermore, SERBP1 also co-localizes with TIA1, after arsenite treatment. This migration of SERBP1 to the stress granules is affected by its methylation. Cells pre-treated with Adox, before the arsenite challenge, showed a decrease in SERBP1 recruitment to stress granules, but later also showed high retention of it in the granules<sup>[27]</sup>.

---

## FUNCTIONAL ASPECTS OF HABP4 AND SERBP1

---

### ***HABP4 and SERBP1: Interaction partners and functions***

Frequently, HABP4 and SERBP1 are described as hubs in signaling networks<sup>[13]</sup>, as they can bind to their targets through multiple sites, facilitating the dynamic assembly of complexes. These multiple sites also allow for allosteric responses in biological signaling<sup>[43,44]</sup>. Besides the ability to have multiple interaction partners, IUPs are targets of PTMs, often having clusters of modifications<sup>[45]</sup>.

The Y2H system is a powerful tool used to access the pairwise interaction of proteins<sup>[5,26,33,34,46]</sup>. Such assays with SERBP1 as bait identified several nuclear proteins as interactors and many of them are related to the transcriptional control of gene

expression, such as CHD3, DAXX, TOPORS, PIAS1, and PIAS3 (Figure 4)<sup>[5,33]</sup>.

By using the N- and C- terminal domains of HABP4 as bait, a protein-protein interaction network revealed the pleiotropic functions of this protein. Many of its partners act at different levels of signaling processes (RACK1, PRMT1, EB-1, RIL, ALEX 2, CTGF and EPS8, APLP1, Myosin IXA). Other interactors include DNA binding factors and transcription regulators (such as CHD3, TOPORS, ZFP106, ZFP189, TIP60, BTBD2, YB-1/NSEP1, GADD34, DAXX, PIAS, p100 and HMG). A third category includes RNA metabolism-associated proteins (CIRBP, YB-1 /NSEP1, SFRS9 and SF2 / p32, FXRP). All this evidence seems to suggest that HABP4 has functions in all of the above related biological processes (Figure 4).

Interestingly, at the time of the initial discovery of the Ki-1/57 antigen in 1992<sup>[3]</sup> a series of cellular localization studies, using electron microscopy, with the original Ki-1 antibody, were performed using mostly the L540 Hodgkin analogous cells. Part of the data were published, but some figures were criticized as potentially nuclear "artifacts" (Figure 5). With today's knowledge of Ki-1/57/ HABP4 interaction with a number of transcriptional regulators (p53, p100, HMG, Topors, Daxx) and chromatin remodeling machines (CHD3), the images obtained may be interpreted, although in a speculative way, in a different light. Is it possible that the Ki-1 gold-labeling observed represents a chromosome, or chromatin? Is it transcriptionally active or in a repressed state? Future studies should address which parts of the genome are regulated by HABP4.

Based on the protein interaction profile and other assays, SERBP1 and HABP4 were functionally related to the regulation of gene expression<sup>[5,26,34,36,46]</sup>. To identify the candidate genes regulated by SERBP1 and HABP4 over-expression, a global gene expression (DNA microarray, Affymetrix) analysis was performed and revealed that most of the affected genes are related to apoptosis, proliferation, the cell cycle and mRNA metabolism<sup>[47]</sup>. After over-expression of both SERBP1 or HABP4 around 90% of the genes were down-regulated and these target genes were related to mRNA metabolism and transcription, suggesting that SERBP1/HABP4 may act mainly as a gene expression repressor<sup>[47]</sup>.

### **The role of SERBP1 in the progesterone response**

The plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) is the major physiological inhibitor of fibrinolysis and plays important roles in cell adhesion, migration, and invasion<sup>[48]</sup>. PAI-1 has been related to tumor vascularization and metastasis and some inhibitors are currently being evaluated in cancer therapy<sup>[49]</sup>.

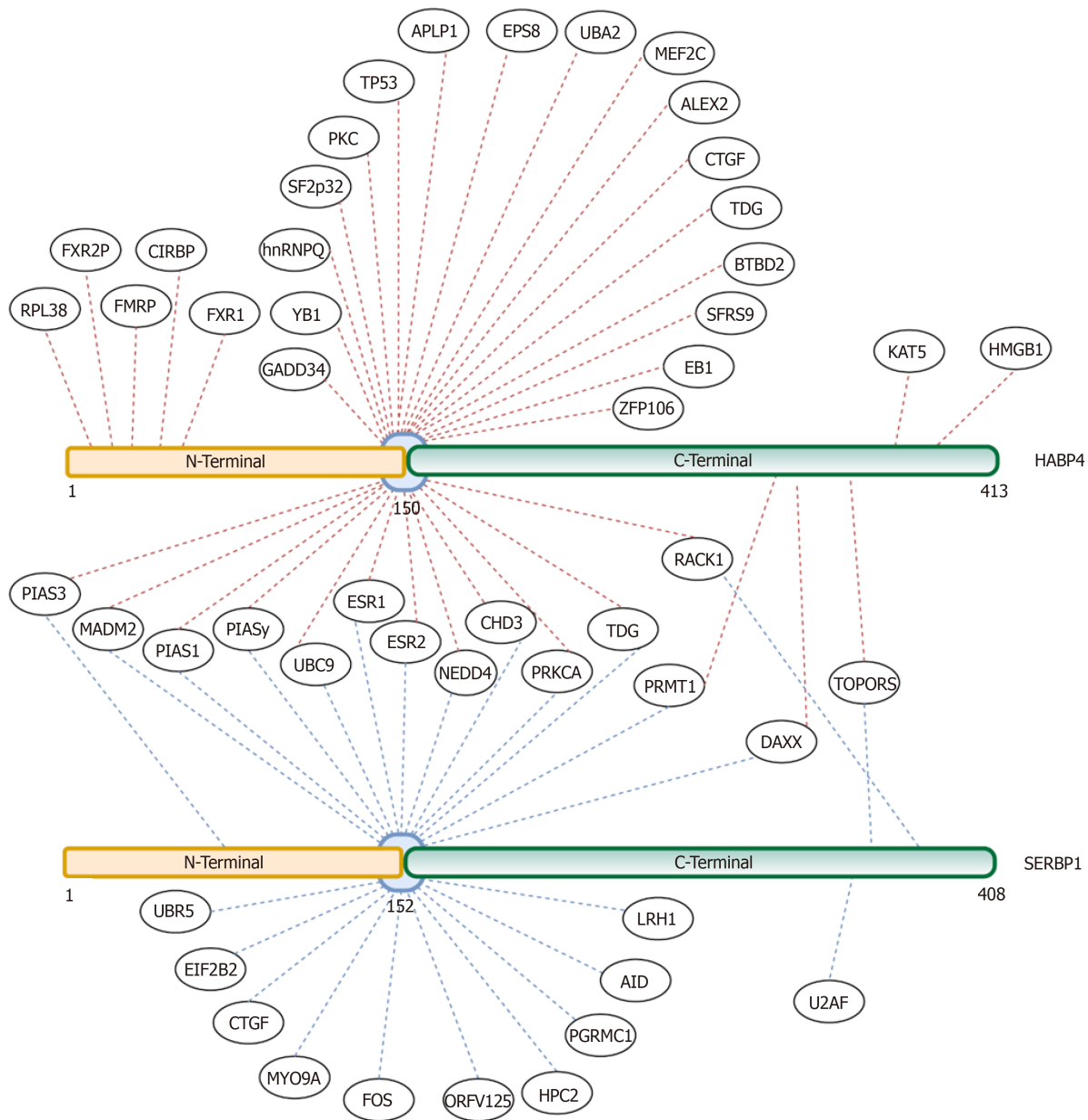
As mentioned before, SERBP1 was previously called PAI-1 mRNA binding protein 1, because it binds to PAI-1 mRNA, and regulates its stability, thereby causing a decrease in overall PAI-1 protein levels in the cell<sup>[7]</sup>. SERBP1 binds to an AU-rich element located in the 3'-untranslated region of the PAI-1 mRNA. AU-rich elements have been determined as RNA instability promoting sequence motifs. The SERBP1/AU-rich element interaction may be regulated by Sphingosine 1-phosphate (S1P), a sphingolipid metabolite<sup>[50]</sup>.

PAI-1 and SERBP1 mRNA are both over-expressed in ovarian tumors and the expression is higher in more advanced diseases<sup>[51]</sup>. In fact, the ovarian hormones progesterone (P4) and 17 $\beta$ -estradiol (E2), both regulate SERBP1 mRNA levels, especially in brain regions. These regions are important for the neuroendocrine control of female reproduction<sup>[52]</sup>. Additionally, the expression of SERBP1 mRNA was also increased in the hypothalamus, which is also important for female reproduction. The expression of SERBP1 mRNA in the brain correlates with the expression of its target mRNA: Progesterone receptor membrane component-1 (PGRMC1) mRNA<sup>[52,53]</sup>. PGRMC1 mediates the anti-apoptotic action of P4. The over-expression of SERBP1 increased the anti-apoptotic effects of P4 by 10-fold in spontaneously immortalized granulosa cells<sup>[54]</sup>. However, its effects seem not to be mediated by direct interaction of SERBP1 with the P4 hormone, as this protein possesses only the hyaluronan-binding region (Figure 2). SERBP1 seems to have allosteric effects on PGRMC1 by binding to its C-terminus, which is distant to the putative P4 binding site but could mediate the actions of P4 by serving as a scaffolding protein or co-activator/regulator of PGRMC1<sup>[55]</sup>. Besides the well-characterized interaction between SERBP1 and PGRMC1, other partners of SERBP1 and HABP4 are also related to P4- and estrogen-related processes, some of which are listed in Table 1.

### **HABP4 and SERBP1 in the context of the DNA damage response**

DNA damage is a constant event in cells due to exposure to exogenous (ultraviolet light, ionizing radiation, chemotherapy, radiotherapy) or endogenous agents (reactive oxygen species, oxidation of bases, formation of adducts)<sup>[56-60]</sup>. Each type of damage is able to activate different cellular responses, including DNA damage repair, changes in the transcriptional response, triggering of apoptosis, senescence, or activation



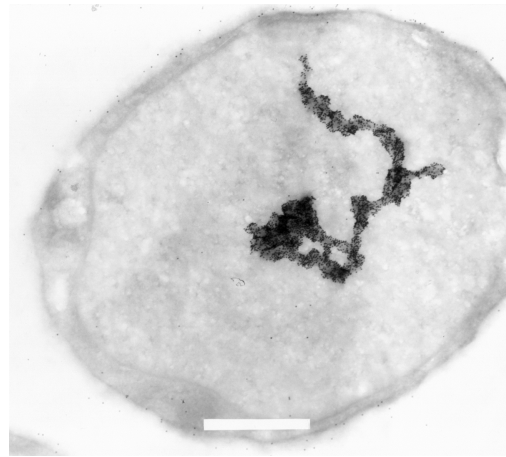


**Figure 4** Global protein interaction network of hyaluronic acid binding protein 4 and serpin mRNA binding protein 1. The published interactors of hyaluronic acid binding protein 4 (HABP4) (top) and serpin mRNA binding protein 1 (SERBP1) (below) were linked to the specific domains of interaction. Proteins that interact with both N- and C-terminal domains, or the site of interaction is unknown, were linked to the blue center. Common interactors between HABP4 and SERBP1 are connected to both proteins and are located between both proteins. Red dotted lines are published interactors of HABP4, and blue dotted lines are interactors of SERBP1. HABP4: Hyaluronic acid binding protein 4; SERBP1: Serpin mRNA binding protein 1.

/blockage of the cell cycle checkpoints<sup>[61]</sup>.

Both HABP4 and SERBP1 interacted with proteins related to the DNA damage response. In response to DNA double-strand breaks, SERBP1-depleted cells showed defects in the activation by phosphorylation of CHK1 and RPA2<sup>[62]</sup>. The effect of SERBP1 in the Homologous Repair pathway is partially explained by the regulation of CtIP (C-terminal binding protein interacting protein) translation in the S phase, once SERBP1 targets CtIP mRNA, thereby controlling its expression levels<sup>[62]</sup>. CtIP is important for end resection-mediated double-strand break repair *via* both the Homology Repair (HR) and Non Homology End Joining (NHEJ) pathways<sup>[63]</sup>.

SERBP1 and HABP4 interact further with UBC9, DAXX and PIAS, all of which are related to DNA damage/repair pathways<sup>[33,34,46]</sup>. HABP4 also interacted in the Y2H system with GADD34, p53, and YB-1<sup>[34,46]</sup>. The YB-1 protein under normal conditions is mainly located in the cytoplasm, but after genotoxic stress, either by UV-radiation or by treatment with cisplatin or mitomycin C, the protein is translocated to the nucleus, where it has a high affinity for damaged DNA sites<sup>[64,65]</sup>. In addition, YB-1



**Figure 5** Electron microscopic image of a L540 Hodgkin-derived cell labeled with 15 nm gold-particle-coupled Ki-1 antibody ( $\times 29.000$  fold magnification). Some labeling on the cell surface is due to Ki-1 binding to the CD30 cell surface receptor. Strong hyaluronic acid binding protein 4 (HABP4) labeling can be detected in the nucleus and the format of the large macrostructure seems to represent part of a chromosome or also (transcriptionally active?) chromatin. A part of the upper end of the macrostructure seems to follow a "corkscrew"-like pattern. Each small black dot is a single Ki-1 gold labeled antibody. Please see<sup>[3]</sup> for more experimental details. In brief, cells were pelleted by centrifugation. The cell pellet was solidified on ice and the solid cell block was prepared in slices of 2 mm that were dehydrated by incubation in a solution containing stepwise increasing sucrose concentration up to 70%. After fixation in frozen nitrogen, ultrathin cryosections were prepared with an ultracut E, FC-4D and collected on nickel grids. After incubation with Ki-1 antibody, washing, and incubation with secondary reagent *Staphylococcus aureus* protein A-gold labeled, and further washing, the sections were fixed and contrasted with 4% uranyl acetate to be subsequently analyzed in a Siemens Elmiskop 101, Electron Microscope. We would like to thank Prof. Dr. Hilmar Lemke (Kiel, Germany) for generously providing the electron micrography.

interacts with key proteins of the base excision repair (BER) and nucleotide excision repair (NER) pathways, such as APE1, DNA polymerase  $\beta$  and DNA glycosylases<sup>[66-68]</sup>.

The  $\Delta 113$  isoform of p53, another HABP4 partner, antagonizes the effects of p53 towards apoptotic activity and its expression is increased after irradiation, promoting the repair of the DNA double-strand breaks through the HR and NHEJ pathways.  $\Delta 113p53/\Delta 133p53$  promotes repair by regulating the expression of RAD51, LIG4 and RAD52<sup>[69]</sup>. p53 levels are also regulated by the ubiquitin ligase MDM2, which in turn is regulated by the DAXX protein, that also interacts with HABP4. After treatment with etoposide, ATM phosphorylates DAXX and the complex DAXX-MDM2 is broken down, thereby promoting the activation of p53<sup>[70]</sup>.

Other HABP4 interactors also have functions related to DNA damage. PRMT1, for example, has a function related to the DNA damage response, once it accumulates in cytoplasmic bodies responsive to DNA damage<sup>[71]</sup>. The protein inhibitor of activated STAT (PIAS) also interacts with HABP4 and when over-expressed in HeLa cells promoted higher resistance to ionizing radiation through its involvement in the repair pathways HR and NHEJ<sup>[72]</sup>. Additionally, PIAS3 acts as E3 ligase and mediates the required BRCA1 SUMOylation, which in turn is essential for the ubiquitin ligase activity of BRCA1 itself<sup>[73]</sup>.

### **The emerging regulation of SERBP1 through miRNAs**

The microRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs that modulate gene expression by binding to target mRNA<sup>[74]</sup>. By binding in the 3' -untranslated region of target mRNAs they inhibit translation or promote degradation of the mRNA. As a consequence the protein expression or non-coding RNAs may be regulated<sup>[75]</sup>. miRNAs have been explored as biomarkers and therapeutic targets for many pathological conditions including cancer<sup>[76]</sup>, diabetes<sup>[77]</sup>, viral infections<sup>[78]</sup>, cardiovascular disease<sup>[79]</sup>, and neurodegenerative diseases<sup>[74]</sup>, among others.

The study of the regulation of SERBP1 by miRNA has emerged in the past few years. The analysis of miRNA expression in peripheral blood of patients with osteonecrosis of the femoral head revealed that many miRNAs target SERBP1 and p53<sup>[80]</sup>. In hepatocellular carcinoma (HCC) SERBP1 is regulated by miR-218<sup>[81]</sup>. miR-218 plays a role as a tumor suppressor in certain types of human cancers and is involved in biological processes such as tumor initiation, progression and metastasis<sup>[82]</sup>. Despite the negative correlation between the expression of miR-218 and SERBP1 in HCC tissues, when both are co-transfected, miR-218's ability to inhibit metastasis and reverse Epithelial Mesenchymal Transition, was abolished, suggesting that the

**Table 1** Table summarizing the interactions of hyaluronic acid binding protein 4 and serpin mRNA binding protein 1 with proteins related to the hormones progesterone and estradiol

Gene	Protein	Biological process reference	Interaction reference
UBR5	E3 ubiquitin-protein ligase UBR5	Progesterone receptor signaling pathway <sup>[158]</sup>	SERBP1 <sup>[22]</sup>
EIF2B2	Translation initiation factor eIF-2B subunit beta	Ovarian follicle development <sup>[159]</sup>	SERBP1 <sup>[22]</sup>
FOS	Proto-oncogene c-Fos	Response to progesterone stimulus <sup>[160]</sup>	SERBP1 <sup>[22]</sup>
PGRMC1	Membrane-associated progesterone receptor component 1	Progesterone receptor signaling pathway <sup>[161,162]</sup>	SERBP1 <sup>[149]</sup>
ESR2	Estrogen receptor beta	Cellular response to estradiol stimulus <sup>[163]</sup>	SERBP1, HABP4 <sup>[22]</sup>
MDM2	E3 ubiquitin-protein ligase Mdm2	Cellular response to progesterone stimulus <sup>[164]</sup>	SERBP1, HABP4 <sup>[165]</sup>
NEDD4	E3 ubiquitin-protein ligase NEDD4	Progesterone receptor signaling pathway <sup>[166]</sup>	SERBP1, HABP4 <sup>[22]</sup>
ESR1	Estrogen receptor	Cellular response to estradiol stimulus <sup>[163]</sup>	SERBP1, HABP4 <sup>[22]</sup>
PKC	Protein Kinase C	Cellular response to estradiol stimulus <sup>[167]</sup>	HABP4 <sup>[20]</sup>
p53	Cellular tumor antigen p53	Cellular response to estradiol stimulus <sup>[168]</sup>	HABP4 <sup>[21]</sup>

function of miR-218 is dependent on SERBP1<sup>[81]</sup>. In pancreatic cancer cells, miRNAs also act on SERBP1, mainly through miR-448, in a pathway dependent on the long non-coding RNA-PVT1, which regulates proliferation and migration<sup>[83]</sup>.

## HABP4 AND SERBP1 INVOLVEMENT IN CANCER

### *HABP4 and SERBP1 in cancer*

Based on the broad clinical spectrum and the underlying, associated molecular behavior, cancer is an extremely complex disease. Tumor initiation and progression result from inherited or acquired genomic alterations within the cells<sup>[64]</sup>, resulting in the acquisition of advantageous features that lead to uncontrolled growth and proliferation<sup>[85]</sup>. For each type of cancer, specific proteins are frequently altered during cancer initiation and progression, disrupting or promoting protein-protein interactions<sup>[86]</sup>, or causing loss- or gain of function protein variants. The interaction profiles of HABP4 and SERBP1 suggest that they are involved in important cellular events which are related to tumorigenesis<sup>[47]</sup>. This includes the regulation of gene transcription, translation, RNA splicing, mRNA metabolism, mitotic cell cycle, and apoptosis, as described before<sup>[5,22,46,47]</sup>.

The over-expression of HABP4 in HEK293 cells followed by microarray analysis, showed alterations in gene expression related to proliferation, including those coding for the proteins PLAU, PDXK, NRG1 and  $\alpha$ -taxilin (TXLNA). Repression of the TXLNA protein correlates with the proliferative activity of HCC and the metastatic and invasive potential of renal cell carcinoma<sup>[87,88]</sup>. The over-expression of SERBP1 also resulted in reduced expression of genes related to proliferation, such as GNB1 and CCL14. Based on these findings, both HABP4 and SERBP1 are involved in repressive control mechanisms of proliferation<sup>[47]</sup>. The proliferation status of cells with HABP4 and SERBP1 over-expression was also evaluated by MTS and EdU incorporation and a lower rate of proliferation was observed, relative to non-transfected cells.

In the same study, HABP4 over-expression led to down-regulation of negative apoptosis regulators, including MAP2K5, ADNP, ANXA4, as well as the positive regulator BCLAF1<sup>[47]</sup>. In addition, under treatment with the ER-stress inducer thapsigargin, it was found that HABP4 over-expression increased the mRNA level of HSP90B1, an endoplasmic reticulum chaperone that protects against apoptosis<sup>[89]</sup>. In cells with SERBP1 over-expression, down-regulation of negative apoptotic regulators MAP2K5, PAK7 and FOXO1<sup>[47]</sup>, was observed. The expression of some genes related to the cell cycle or cell division control, such as cyclin-dependent kinase 15 (CDK15), MAPK12<sup>[90,91]</sup>, and the nuclear distribution genes NDEL1 and GORASP1<sup>[92,93]</sup>, was also down-regulated by HABP4 and SERBP1 over-expression, respectively<sup>[47]</sup>.

Taken together, these data suggest that HABP4 and SERBP1 have similar functions, mainly as repressors of genes involved in proliferation, cell cycle and apoptosis regulation, cellular processes that are frequently de-regulated in cancer<sup>[47]</sup>. However, the target genes can be different for both proteins and consequently the outcome. Several studies suggest important functions of the HABP4 and SERBP1 proteins in human cells that can contribute to a better understanding of the tumorigenic process<sup>[47]</sup>.

### *HABP4 and SERBP1 are related to epigenetic modifications*

Epigenetic modifications, such as alterations in chromatin structure, represent critical regulatory events for cellular proliferation and tumor formation. Many tissue types have altered epigenetic profiles, which contribute to cancer development<sup>[94,95]</sup>. Chromatin remodeling is one of the epigenetic alterations that is important for the maintenance of chromatin structure and genomic stability<sup>[95]</sup>. It can change the gene expression patterns and plays important roles in tumor growth, coordinating the transcription factors and protein complexes during the regulation of gene expression<sup>[96]</sup>. HABP4 and SERBP1 interact with the chromatin remodeling protein “Chromo-Helicase DNA-binding domain-3” (CHD-3), which regulates gene transcription<sup>[5,33]</sup>. Although the exact mechanisms by which the complexes HABP4- and SERBP1-CHD-3 act, are still unknown, they might influence gene expression regulation of genes related to tumorigenesis. These mechanisms require further analysis. However, the altered transcriptional regulation through pathways targeting chromatin-remodeling has already been reported in tumors<sup>[95,97]</sup>.

The histone modification patterns are crucial for the organization and maintenance of chromatin and as a result, transcriptional regulation. These processes are fundamental in understanding epigenetic mechanisms and their involvement in cancer development, as transcriptional control is essential for appropriate cell proliferation and differentiation<sup>[98,99]</sup>.

Furthermore, HABP4 over-expression in HEK293 cells revealed an increase in the expression in histone genes<sup>[47]</sup>. These histones could be involved in chromatin compaction during the gene repression process caused by HABP4 over-expression. The above-mentioned repressed genes may also be associated to other, already mentioned, biological processes, such as cellular proliferation, apoptosis and the cell cycle<sup>[47,100]</sup>.

HABP4 may regulate gene expression in response to stress<sup>[47]</sup>. Some of the histones triggered by HABP4 over-expression are related to the stress response. For example, H2AX, which is responsible for recruiting multiple proteins to chromatin, during the DNA damage/repair response<sup>[101]</sup>. Additionally, HABP4 and SERBP1 over-expression also influence some histone gene clusters that are preferentially associated with PML-NBs, which respond to basic physiological processes and several forms of stress<sup>[102]</sup>. Interestingly, PML-NBs also play a role in chromatin regulation and contain histone-modifying enzymes and transcription factors within them<sup>[102]</sup>.

For example, DAXX, a histone component of PML-NB that interacts with HABP4 and SERBP1, possibly coordinates chromatin dynamics by binding to histone deacetylases and chromatin remodeling proteins<sup>[103]</sup>. Also, HABP4 over-expression reduces histone-lysine N-methyltransferase (SETMAR) expression, which is responsible for the methylation of lysine residues in histone and heterochromatin formation<sup>[104]</sup>.

The histone methyltransferases (HMTs) transfer methyl groups from S-adenosyl methionine (AdoMet) to the lysine and arginine residues of target substrates, which may affect gene transcription, chromatin compaction and effector protein binding<sup>[105-107]</sup>. HMTs have been found to play fundamental roles in cell differentiation, gene regulation, DNA recombination and DNA damage repair<sup>[108-110]</sup>. The over-expression of different HMTs and their interaction with oncogenes is associated with the cancer phenotype<sup>[111]</sup>. Interestingly, HABP4 and SERBP1 not only interact with HMTs but are also methylated by the protein arginine methyltransferase PRMT1<sup>[26]</sup>. A misregulation of methyltransferases modifies the balance of transcription and leads to changes in cell destination, which in turn may result in tumor development<sup>[107]</sup>. Further studies are required to better understand the roles of HABP4 and SERBP1 proteins in tumorigenesis events mediated through methyltransferases such as PRMT1 and SETMAR.

### **HABP4 and cancer**

Kobarg and co-workers<sup>[112]</sup> showed, for the first time, the expression of HABP4 in some tumor cell lines and in activated leukocytes. The HABP4 gene was mapped in the human chromosome 9, bands 9q22.3-31, an area associated with secondary chromosomal aberrations in acute myeloid leukemia and in colon neoplasia<sup>[113]</sup>. Although previous experiments with HABP4 protein were performed in the Hodgkin's lymphoma analogous cell line L540<sup>[5,112]</sup>, the relationship between HABP4 and Hodgkin's disease is still not clear<sup>[47]</sup>.

However, in the colon, the 9q22.2-31.2 region, which contains the HABP4 gene, was found to be in linkage disequilibrium with SNP haplotypes found in families with a certain colon neoplasia risk<sup>[113]</sup>. Preliminary studies have revealed that HABP4 has characteristics also very common in several onco-proteins, such as PTMs, shuttling between the cytoplasm and nucleus, and transcriptional regulation activity<sup>[5,40,112,114]</sup>. Additionally, HABP4 interacted with PKC<sup>[3,21,112]</sup>, which is considered a tumor suppressor, and loss of function mutations were linked to breast, bladder, skin, and



other forms of cancer<sup>[115]</sup>. However, the exact role of HABP4 in human cells and cancer remains unknown<sup>[46]</sup>.

Another correlation of HABP4 protein with cancer is based on the fact that it belongs to the class of IUPs<sup>[8]</sup>. Members of the IUPs have received considerable attention lately, due to some of them being involved in the development of several pathologies<sup>[46,116]</sup>. Indeed, many proteins or domains that are functionally associated with cancer and other human diseases have long regulatory regions<sup>[116-118]</sup>. Additionally, HABP4 plays a role in important regulatory mechanisms such as transcription, translation, cell-cycle checkpoints, and signal transduction, through its interacting proteins and *via* DNA/RNA either directly or mediated by other proteins<sup>[8]</sup>. This suggests its functional plasticity and ability to bind to various partners involved in the tumorigenic process<sup>[8,116]</sup>.

The p53 is a nuclear transcription factor that regulates numerous target genes involved in important cellular processes, such as cell cycle arrest and monitoring of the G1 checkpoint, apoptosis, senescence, repair of damaged DNA, as well as metabolic regulation, playing a central role in human cancer as a tumor suppressor<sup>[119,120]</sup>. When DNA is damaged, free p53 is induced to accumulate in the cell nucleus, mediated through PTMs such as phosphorylation and acetylation<sup>[121]</sup>. Some studies have shown that the p53 gene is mutated in over 50% of human cancers. The tumor suppressor p53 has also been associated with PML-NBs<sup>[82,122]</sup>, which play significant roles in genome maintenance<sup>[37]</sup>. Y2H system assays have shown that HABP4 interacts with p53 and with other p53 interacting proteins, as well as with several nuclear proteins involved in the regulation of transcription in the human Hodgkin's disease analogous cell line L540<sup>[32]</sup>. HABP4 can negatively influence p53-dependent transcription by blocking its DNA binding. The p53/HABP4 interaction was reported to be inhibited by *in vitro* phosphorylation of p53<sup>[32]</sup>.

### **HABP4 and mRNA splicing in cancer**

Pre-mRNA splicing is a post-transcriptional process of the eukaryotic gene expression machinery and consists of the removal of introns and the junction of exons in gene transcripts, leading to mature RNAs<sup>[123,124]</sup>. Deregulation of the splicing process has been discovered to be a critical contributor to the genesis and development of different types of cancers<sup>[125,126]</sup>. Mutations were found in diverse types of cancers and are linked to alterations in splicing, regulation of specific transcripts and control of spliceosomal activity<sup>[123,127]</sup>.

Several HABP4 interaction partners are involved in gene expression regulation, at the transcriptional level or pre-mRNA splicing<sup>[26,32,40,128]</sup>. In this way, HABP4 is a potential candidate that could affect cellular fate and function in cancer<sup>[127]</sup>. HABP4 can also play an important role in tumorigenic events through pre-mRNA splicing alterations<sup>[128]</sup>. Following this argument, further studies are required to identify the expression of some specific subsets of mRNA that may be regulated by HABP4 in cancer, considering that altered proteins originating from alternative RNA splicing are promising candidates for the diagnosis and even targets for novel therapeutic strategies<sup>[123]</sup>.

It is worth noting that two protein partners were identified for HABP4 that are involved in the regulation of pre-mRNA splicing and cancer. They are serine/arginine-rich splicing factor 9 (SFRS9), a member of the serine/arginine-rich (SR) protein family and heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (such as hnRNPO)<sup>[128-130]</sup>. In immunoprecipitation and pull-down assays of HeLa cell extracts, both proteins were pulled down by HABP4, suggesting that these splicing proteins interact specifically with HABP4, probably forming functional complexes *in vivo*<sup>[128]</sup>.

In addition, these proteins have some similar characteristics with HABP4. SFRS9 protein, for example, is a target of arginine methylation, which is required for its localization and trafficking to mammalian cell nuclei<sup>[128]</sup>. hnRNP proteins act on pre-mRNA splicing through site-specific binding (Arg/Gly-rich clusters) within the target RNA<sup>[131]</sup>, and HABP4 has several RGG-box (Figure 2A) that are important for the interaction with many RNA-binding proteins that mediate splicing decisions<sup>[128,132]</sup>.

Interestingly, SRSF9 has been considered a proto-oncogene by promoting cell proliferation *via*  $\beta$ -catenin (key effector of the Wnt signaling pathway).  $\beta$ -catenin accumulation in the cytosol and nucleus was found in colon cancer cell lines, and led to increasing colony formation in SRSF9 over-expressing NIH3T3 cells. Furthermore, when these cells were implanted in nude mice they generated tumors of increased sizes compared to control cells, that do not over-express SRSF9<sup>[129]</sup>.

Moreover, elevated levels of SRSF9 expression were found in glioblastoma, colon adenocarcinoma, squamous cell lung carcinoma and malignant melanoma<sup>[129]</sup>, in cancer tissue arrays, when compared to normal tissues. In addition, SRSF9 is implicated in the proliferation of a bladder cancer cell line *via* an unknown mechanism and SRSF9 over-expression was found in a clinical bladder cancer

sample<sup>[133]</sup>.

The hnRNPQ splicing protein has also been reported to be a proto-oncogene<sup>[134]</sup>. It can promote cell proliferation and translationally regulates cell cycle-related genes in SW480 colon cancer cells, by translation control. In this way, it may increase cell growth ability during tumor formation. Moreover, both its mRNA and protein levels were found to be elevated in colon tumor tissue, possibly, involving transcriptional or post-transcriptional regulation mechanisms.

The contribution of hnRNPs to the control of splicing site selection has been found for apoptotic genes. It was also reported that there was tight control of the balance between the activities of pro- and anti-apoptotic variants produced by apoptotic peptidase activating factor (APAF-1)<sup>[135]</sup>, Bcl-x<sup>[136]</sup>, Fas<sup>[137]</sup> and caspases<sup>[138]</sup>. hnRNPs also have a suppressive effect on DNA damage repair<sup>[139]</sup>. In general, studies have documented that several hnRNPs are involved in human malignancies and metastasis, being promising biomarkers of lung, head and neck, colon, breast, and pancreatic cancers and acute myeloid leukemia<sup>[140-142]</sup>.

### **SERBP1 and cancer**

The over-expression of SERBP1 was reported in epithelial ovarian cancer, in breast-, colon-, prostate- and lung cancer as well as in glioblastoma<sup>[51,143,144-146]</sup>. In ovarian carcinoma, over-expression of SERBP1 was associated with higher tumor grades (Grade III *vs* Grades II and I tumors)<sup>[143,147]</sup>. Indeed, SERBP1 has prognostic value in ovarian cancer and other solid tumors<sup>[51]</sup>. Although its exact mechanism of action is not well known, SERBP1 was implicated in tumorigenicity and resistance to anti-cancer drugs<sup>[51,62]</sup>.

In human breast cancer, SERBP1 over-expression was classified as a new prognostic marker<sup>[144]</sup>. A correlation between the expression of SERBP1 and nuclear P4 receptors was observed in malignant breast epithelial cells<sup>[27,144,148]</sup>. This relation is very important, as P4 receptors are ligand-activated transcription factors, playing a crucial role in the regulation of growth, survival, and differentiation of normal and malignant breast epithelial cells<sup>[144,148]</sup>. Furthermore, as pointed out above, SERBP1 interacts with PGRMC1, which is involved in mediating anti-apoptotic actions through the P4 receptor<sup>[55,144,149]</sup>.

Interestingly, abundant SERBP1 expression in human breast cancer was associated with low PAI-1 protein levels in Western blot analysis<sup>[144]</sup>, showing that SERBP1 can not only stabilize but can also destabilize PAI-1 mRNA, depending on the cellular context<sup>[7]</sup>. Heaton and co-workers documented an inverse relationship between SERBP1 and PAI in rat hepatoma, reporting that high SERBP1 protein levels, lead to increased degradation of PAI-1 mRNA and consecutively to low PAI-1 protein levels in rat hepatoma<sup>[150]</sup>.

Other studies showed over-expression and high protein levels of PAI-1 in breast cancer, which was associated with poor prognosis. PAI-1 is considered a valuable factor in clinical practice<sup>[51,144,151]</sup>. In ovarian cancer, the over-expression of PAI-1 was also detected and related to advanced tumor stages, and poor prognosis in ovarian cancer patients<sup>[51,152-154]</sup>. Moreover, studies have reported an association between the high expression of PAI-1 in ovarian cancer and its histological grade<sup>[153,155]</sup>, tumor stage<sup>[156]</sup>, tumor recurrence<sup>[153]</sup> and residual tumor<sup>[157]</sup> (Table 2).

---

## **CONCLUSION**

HABP4 and SERBP1 share high levels of amino acid sequence identity and similarity and seem to have overlapping functions in the cell, related to transcription regulation, mRNA metabolism and DNA damage and stress responses. However, they have also exclusive interacting partners and might be differentially regulated. Thus, HABP4 and SERBP1 may be required in different situations to exert unique functions specific to each paralog protein. In this review, we presented the emerging role of HABP4 and SERBP1 in the cancer field, and the need for further studies to understand more deeply the cellular functions of both proteins.

Table 2 Hyaluronic acid binding protein 4 and serpin mRNA binding protein 1 expression in different types of cancer

Protein	Expression/overexpression	Cancer types	Ref.
HABP4	Expression	Hodgkin's lymphoma	Kobarg <i>et al.</i> <sup>[112]</sup>
HABP4	Expression	B-cell lymphatic leukemia	Kobarg <i>et al.</i> <sup>[112]</sup>
HABP4	Expression	non-Hodgkin-T-cell lymphoma	Kobarg <i>et al.</i> <sup>[112]</sup>
HABP4	Expression	Bladder	Kobarg <i>et al.</i> <sup>[112]</sup>
SERBP1	Overexpression	Ovarian	Koensgen <i>et al.</i> <sup>[51]</sup>
SERBP1	Overexpression	Breast	Serce <i>et al.</i> <sup>[144]</sup>
SERBP1	Overexpression	Colon	Wang <i>et al.</i> <sup>[81]</sup>
SERBP1	Overexpression	Prostate	Guo <i>et al.</i> <sup>[145]</sup>
SERBP1	Overexpression	Lung	Sun <i>et al.</i> <sup>[147]</sup>
SERBP1	Overexpression	Glioblastoma	Hlavaty <i>et al.</i> <sup>[146]</sup>

## REFERENCES

- Schwab U, Stein H, Gerdes J, Lemke H, Kirchner H, Schaadt M, Diehl V. Production of a monoclonal antibody specific for Hodgkin and Sternberg-Reed cells of Hodgkin's disease and a subset of normal lymphoid cells. *Nature* 1982; **299**: 65-67 [PMID: 7110326 DOI: 10.1038/299065a0]
- Hansen H, Lemke H, Bredfeldt G, Könnecke I, Havsteen B. The Hodgkin-associated Ki-1 antigen exists in an intracellular and a membrane-bound form. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1989; **370**: 409-416 [PMID: 2545229 DOI: 10.1515/bchm3.1989.370.1.409]
- Rohde D, Hansen H, Hafner M, Lange H, Mielke V, Hansmann ML, Lemke H. Cellular localizations and processing of the two molecular forms of the Hodgkin-associated Ki-1 (CD30) antigen. The protein kinase Ki-1/57 occurs in the nucleus. *Am J Pathol* 1992; **140**: 473-482 [PMID: 1310832]
- Huang L, Grammatikakis N, Yoneda M, Banerjee SD, Toole BP. Molecular characterization of a novel intracellular hyaluronan-binding protein. *J Biol Chem* 2000; **275**: 29829-29839 [PMID: 10887182 DOI: 10.1074/jbc.M002737200]
- Lemos TA, Passos DO, Nery FC, Kobarg J. Characterization of a new family of proteins that interact with the C-terminal region of the chromatin-remodeling factor CHD-3. *FEBS Lett* 2003; **533**: 14-20 [PMID: 12505151 DOI: 10.1016/s0014-5793(02)03737-7]
- Lai CH, Chou CY, Ch'ang LY, Liu CS, Lin W. Identification of novel human genes evolutionarily conserved in *Caenorhabditis elegans* by comparative proteomics. *Genome Res* 2000; **10**: 703-713 [PMID: 10810093 DOI: 10.1101/gr.10.5.703]
- Heaton JH, Dlakic WM, Dlakic M, Gelehrter TD. Identification and cDNA cloning of a novel RNA-binding protein that interacts with the cyclic nucleotide-responsive sequence in the Type-1 plasminogen activator inhibitor mRNA. *J Biol Chem* 2001; **276**: 3341-3347 [PMID: 11001948 DOI: 10.1074/jbc.M006538200]
- Bressan GC, Silva JC, Borges JC, Dos Passos DO, Ramos CH, Torriani IL, Kobarg J. Human regulatory protein Ki-1/57 has characteristics of an intrinsically unstructured protein. *J Proteome Res* 2008; **7**: 4465-4474 [PMID: 18788774 DOI: 10.1021/pr8005342]
- Uversky VN, Gillespie JR, Fink AL. Why are "natively unfolded" proteins unstructured under physiologic conditions? *Proteins* 2000; **41**: 415-427 [PMID: 11025552 DOI: 10.1002/1097-0134(20001115)41:3<415::AID-PROT130>3.0.CO;2-7]
- Tompa P. Intrinsically unstructured proteins. *Trends Biochem Sci* 2002; **27**: 527-533 [PMID: 12368089 DOI: 10.1016/S0968-0004(02)02169-2]
- Jaravine VA, Alexandrescu AT, Grzesiek S. Observation of the closing of individual hydrogen bonds during TFE-induced helix formation in a peptide. *Protein Sci* 2001; **10**: 943-950 [PMID: 11316874 DOI: 10.1110/ps.48501]
- Lawrence JR, Johnson WC. Lifson-Roig nucleation for alpha-helices in trifluoroethanol: context has a strong effect on the helical propensity of amino acids. *Biophys Chem* 2002; **101-102**: 375-385 [PMID: 12488015 DOI: 10.1016/S0301-4622(02)00173-4]
- Wright PE, Dyson HJ. Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *J Mol Biol* 1999; **293**: 321-331 [PMID: 10550212 DOI: 10.1006/jmbi.1999.3110]
- Fuxreiter M, Simon I, Friedrich P, Tompa P. Preformed structural elements feature in partner recognition by intrinsically unstructured proteins. *J Mol Biol* 2004; **338**: 1015-1026 [PMID: 15111064 DOI: 10.1016/j.jmb.2004.03.017]
- Dyson HJ, Wright PE. Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; **6**: 197-208 [PMID: 15738986 DOI: 10.1038/nrm1589]
- Duan G, Walther D. The roles of post-translational modifications in the context of protein interaction networks. *PLoS Comput Biol* 2015; **11**: e1004049 [PMID: 25692714 DOI: 10.1371/journal.pcbi.1004049]
- Singh V, Ram M, Kumar R, Prasad R, Roy BK, Singh KK. Phosphorylation: Implications in Cancer. *Protein J* 2017; **36**: 1-6 [PMID: 28108801 DOI: 10.1007/s10930-017-9696-z]
- Peng C, Wong CC. The story of protein arginine methylation: characterization, regulation, and function. *Expert Rev Proteomics* 2017; **14**: 157-170 [PMID: 28043171 DOI: 10.1080/14789450.2017.1275573]
- Ohtake F, Tsuchiya H. The emerging complexity of ubiquitin architecture. *J Biochem* 2017; **161**: 125-133 [PMID: 28011818 DOI: 10.1093/jb/mvw088]
- Nery FC, Passos DO, Garcia VS, Kobarg J. Ki-1/57 interacts with RACK1 and is a substrate for the phosphorylation by phorbol 12-myristate 13-acetate-activated protein kinase C. *J Biol Chem* 2004; **279**: 11444-11455 [PMID: 14699138 DOI: 10.1074/jbc.M306672200]
- Nery FC, Bressan GC, Alborghetti MR, Passos DO, Kuniyoshi TM, Ramos CH, Oyama S, Kobarg J. A

- spectroscopic analysis of the interaction between the human regulatory proteins RACK1 and Ki-1/57. *Biol Chem* 2006; **387**: 577-582 [PMID: 16740129 DOI: 10.1515/BC.2006.074]
- 22 **Saito A**, Souza EE, Costa FC, Meirelles GV, Gonçalves KA, Santos MT, Bressan GC, McComb ME, Costello CE, Whelan SA, Kobarg J. Human Regulatory Protein Ki-1/57 Is a Target of SUMOylation and Affects PML Nuclear Body Formation. *J Proteome Res* 2017; **16**: 3147-3157 [PMID: 28695742 DOI: 10.1021/acs.jproteome.7b00001]
- 23 **Hansen H**, Bredfeldt G, Havsteen B, Lemke H. Protein kinase activity of the intracellular but not of the membrane-associated form of the Ki-1 antigen (CD30). *Res Immunol* 1990; **141**: 13-31 [PMID: 2161115 DOI: 10.1016/0923-2494(90)90098-J]
- 24 **Bolger GB**. The RNA-binding protein SERBP1 interacts selectively with the signaling protein RACK1. *Cell Signal* 2017; **35**: 256-263 [PMID: 28267599 DOI: 10.1016/j.cellsig.2017.03.001]
- 25 **Sharma G**, Pallesen J, Das S, Grassucci R, Langlois R, Hampton CM, Kelly DF, des Georges A, Frank J. Affinity grid-based cryo-EM of PKC binding to RACK1 on the ribosome. *J Struct Biol* 2013; **181**: 190-194 [PMID: 23228487 DOI: 10.1016/j.jsb.2012.11.006]
- 26 **Passos DO**, Bressan GC, Nery FC, Kobarg J. Ki-1/57 interacts with PRMT1 and is a substrate for arginine methylation. *FEBS J* 2006; **273**: 3946-3961 [PMID: 16879614 DOI: 10.1111/j.1742-4658.2006.05399.x]
- 27 **Lee YJ**, Wei HM, Chen LY, Li C. Localization of SERBP1 in stress granules and nucleoli. *FEBS J* 2014; **281**: 352-364 [PMID: 24205981 DOI: 10.1111/febs.12606]
- 28 **Lee YJ**, Hsieh WY, Chen LY, Li C. Protein arginine methylation of SERBP1 by protein arginine methyltransferase 1 affects cytoplasmic/nuclear distribution. *J Cell Biochem* 2012; **113**: 2721-2728 [PMID: 22442049 DOI: 10.1002/jcb.24151]
- 29 **Srinivasan S**, Shankar SR, Wang Y, Taneja R. SUMOylation of G9a regulates its function as an activator of myoblast proliferation. *Cell Death Dis* 2019; **10**: 250 [PMID: 30867409 DOI: 10.1038/s41419-019-1465-9]
- 30 **Rosonina E**, Akhter A, Dou Y, Babu J, Sri Theivakadacham VS. Regulation of transcription factors by sumoylation. *Transcription* 2017; **8**: 220-231 [PMID: 28379052 DOI: 10.1080/21541264.2017.1311829]
- 31 **Richard P**, Vethantham V, Manley JL. Roles of Sumoylation in mRNA Processing and Metabolism. *Adv Exp Med Biol* 2017; **963**: 15-33 [PMID: 28197904 DOI: 10.1007/978-3-319-50044-7\_2]
- 32 **Nery FC**, Rui E, Kuniyoshi TM, Kobarg J. Evidence for the interaction of the regulatory protein Ki-1/57 with p53 and its interacting proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; **341**: 847-855 [PMID: 16455055 DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.01.036]
- 33 **Lemos TA**, Kobarg J. CGI-55 interacts with nuclear proteins and co-localizes to p80-coilin positive-coiled bodies in the nucleus. *Cell Biochem Biophys* 2006; **44**: 463-474 [PMID: 16679534 DOI: 10.1385/CBB:44:3:463]
- 34 **Bressan GC**, Quaresma AJ, Moraes EC, Manfiolli AO, Passos DO, Gomes MD, Kobarg J. Functional association of human Ki-1/57 with pre-mRNA splicing events. *FEBS J* 2009; **276**: 3770-3783 [PMID: 19523114 DOI: 10.1111/j.1742-4658.2009.07092.x]
- 35 **Morimoto M**, Boerkoel CF. The role of nuclear bodies in gene expression and disease. *Biology (Basel)* 2013; **2**: 976-1033 [PMID: 24040563 DOI: 10.3390/biology2030976]
- 36 **Staněk D**. Cajal bodies and snRNPs - friends with benefits. *RNA Biol* 2017; **14**: 671-679 [PMID: 27627834 DOI: 10.1080/15476286.2016.1231359]
- 37 **Chang HR**, Munkhjargal A, Kim MJ, Park SY, Jung E, Ryu JH, Yang Y, Lim JS, Kim Y. The functional roles of PML nuclear bodies in genome maintenance. *Mutat Res* 2018; **809**: 99-107 [PMID: 28521962 DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2017.05.002]
- 38 **Zhong S**, Müller S, Ronchetti S, Freemont PS, Dejean A, Pandolfi PP. Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation. *Blood* 2000; **95**: 2748-2752 [PMID: 10779416]
- 39 **Seker H**, Rubbi C, Linke SP, Bowman ED, Garfield S, Hansen L, Borden KL, Milner J, Harris CC. UV-C-induced DNA damage leads to p53-dependent nuclear trafficking of PML. *Oncogene* 2003; **22**: 1620-1628 [PMID: 12642865 DOI: 10.1038/sj.onc.1206140]
- 40 **Gonçalves Kde A**, Bressan GC, Saito A, Morello LG, Zanchin NI, Kobarg J. Evidence for the association of the human regulatory protein Ki-1/57 with the translational machinery. *FEBS Lett* 2011; **585**: 2556-2560 [PMID: 21771594 DOI: 10.1016/j.febslet.2011.07.010]
- 41 **Darnell JC**, Fraser CE, Mostovetsky O, Darnell RB. Discrimination of common and unique RNA-binding activities among Fragile X mental retardation protein paralogs. *Hum Mol Genet* 2009; **18**: 3164-3177 [PMID: 19487368 DOI: 10.1093/hmg/ddp255]
- 42 **Kedersha NL**, Gupta M, Li W, Miller I, Anderson P. RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *J Cell Biol* 1999; **147**: 1431-1442 [PMID: 10613902 DOI: 10.1083/jcb.147.7.1431]
- 43 **Wright PE**, Dyson HJ. Intrinsically disordered proteins in cellular signalling and regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2015; **16**: 18-29 [PMID: 25531225 DOI: 10.1038/nrm3920]
- 44 **Flock T**, Weatheritt RJ, Latysheva NS, Babu MM. Controlling entropy to tune the functions of intrinsically disordered regions. *Curr Opin Struct Biol* 2014; **26**: 62-72 [PMID: 24930020 DOI: 10.1016/j.sbi.2014.05.007]
- 45 **Pejaver V**, Hsu WL, Xin F, Dunker AK, Uversky VN, Radivojac P. The structural and functional signatures of proteins that undergo multiple events of post-translational modification. *Protein Sci* 2014; **23**: 1077-1093 [PMID: 24888500 DOI: 10.1002/pro.2494]
- 46 **Bressan GC**, Kobarg J. From protein interaction profile to functional assignment: the human protein Ki-1/57 is associated with pre-mRNA splicing events. *RNA Biol* 2010; **7**: 268-271 [PMID: 20436279 DOI: 10.4161/ma.7.3.11489]
- 47 **Costa FC**, Saito A, Gonçalves KA, Vidigal PM, Meirelles GV, Bressan GC, Kobarg J. Ki-1/57 and CGI-55 ectopic expression impact cellular pathways involved in proliferation and stress response regulation. *Biochim Biophys Acta* 2014; **1843**: 2944-2956 [PMID: 25205453 DOI: 10.1016/j.bbamer.2014.08.016]
- 48 **Yasar Yildiz S**, Kuru P, Toksoy Oner E, Agirbasli M. Functional stability of plasminogen activator inhibitor-1. *ScientificWorldJournal* 2014; **2014**: 858293 [PMID: 25386620 DOI: 10.1155/2014/858293]
- 49 **Li S**, Wei X, He J, Tian X, Yuan S, Sun L. Plasminogen activator inhibitor-1 in cancer research. *Biomed Pharmacother* 2018; **105**: 83-94 [PMID: 29852393 DOI: 10.1016/j.biopha.2018.05.119]
- 50 **Iwaki S**, Yamamura S, Asai M, Sobel BE, Fujii S. Posttranscriptional regulation of expression of plasminogen activator inhibitor type-1 by sphingosine 1-phosphate in HepG2 liver cells. *Biochim Biophys Acta* 2012; **1819**: 1132-1141 [PMID: 22819712 DOI: 10.1016/j.bbagr.2012.07.001]
- 51 **Koensgen D**, Mustea A, Klaman I, Sun P, Zafrakas M, Lichtenegger W, Denkert C, Dahl E, Sehoulji J. Expression analysis and RNA localization of PAI-RBP1 (SERBP1) in epithelial ovarian cancer:



- association with tumor progression. *Gynecol Oncol* 2007; **107**: 266-273 [PMID: 17698176 DOI: 10.1016/j.ygyno.2007.06.023]
- 52 **Intlekofer KA**, Petersen SL. Distribution of mRNAs encoding classical progesterin receptor, progesterone membrane components 1 and 2, serpine mRNA binding protein 1, and progesterin and ADIPOQ receptor family members 7 and 8 in rat forebrain. *Neuroscience* 2011; **172**: 55-65 [PMID: 20977928 DOI: 10.1016/j.neuroscience.2010.10.051]
- 53 **Intlekofer KA**, Petersen SL. 17 $\beta$ -estradiol and progesterone regulate multiple progesterin signaling molecules in the anteroventral periventricular nucleus, ventromedial nucleus and sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in female rats. *Neuroscience* 2011; **176**: 86-92 [PMID: 21185909 DOI: 10.1016/j.neuroscience.2010.12.033]
- 54 **Peluso JJ**, Pappalardo A, Fernandez G, Wu CA. Involvement of an unnamed protein, RDA288, in the mechanism through which progesterone mediates its antiapoptotic action in spontaneously immortalized granulosa cells. *Endocrinology* 2004; **145**: 3014-3022 [PMID: 14988380 DOI: 10.1210/en.2004-0067]
- 55 **Peluso JJ**, Romak J, Liu X. Progesterone receptor membrane component-1 (PGRMC1) is the mediator of progesterone's antiapoptotic action in spontaneously immortalized granulosa cells as revealed by PGRMC1 small interfering ribonucleic acid treatment and functional analysis of PGRMC1 mutations. *Endocrinology* 2008; **149**: 534-543 [PMID: 17991724 DOI: 10.1210/en.2007-1050]
- 56 **Boulton S**, Kyle S, Durkacz BW. Mechanisms of enhancement of cytotoxicity in etoposide and ionising radiation-treated cells by the protein kinase inhibitor wortmannin. *Eur J Cancer* 2000; **36**: 535-541 [PMID: 10717533 DOI: 10.1016/S0959-8049(99)00311-1]
- 57 **Henle ES**, Linn S. Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 1997; **272**: 19095-19098 [PMID: 9235895 DOI: 10.1074/jbc.272.31.19095]
- 58 **Pommier Y**, Redon C, Rao VA, Seiler JA, Sordet O, Takemura H, Antony S, Meng L, Liao Z, Kohlhagen G, Zhang H, Kohn KW. Repair of and checkpoint response to topoisomerase I-mediated DNA damage. *Mutat Res* 2003; **532**: 173-203 [PMID: 14643436 DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2003.08.016]
- 59 **Todd RC**, Lippard SJ. Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds. *Metallomics* 2009; **1**: 280-291 [PMID: 20046924 DOI: 10.1039/b907567d]
- 60 **Zhou BB**, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 2000; **408**: 433-439 [PMID: 11100718 DOI: 10.1038/35044005]
- 61 **Feringa FM**, Raaijmakers JA, Hadders MA, Vaarting C, Macurek L, Heitink L, Krenning L, Medema RH. Persistent repair intermediates induce senescence. *Nat Commun* 2018; **9**: 3923 [PMID: 30254262 DOI: 10.1038/s41467-018-06308-9]
- 62 **Ahn JW**, Kim S, Na W, Baek SJ, Kim JH, Min K, Yeom J, Kwak H, Jeong S, Lee C, Kim SY, Choi CY. SERBP1 affects homologous recombination-mediated DNA repair by regulation of CtIP translation during S phase. *Nucleic Acids Res* 2015; **43**: 6321-6333 [PMID: 26068472 DOI: 10.1093/nar/gkv592]
- 63 **Wang H**, Qiu Z, Liu B, Wu Y, Ren J, Liu Y, Zhao Y, Wang Y, Hao S, Li Z, Peng B, Xu X. PLK1 targets CtIP to promote microhomology-mediated end joining. *Nucleic Acids Res* 2018; **46**: 10724-10739 [PMID: 30202980 DOI: 10.1093/nar/gky810]
- 64 **Cohen SB**, Ma W, Valova VA, Algie M, Harfoot R, Woolley AG, Robinson PJ, Braithwaite AW. Genotoxic stress-induced nuclear localization of oncoprotein YB-1 in the absence of proteolytic processing. *Oncogene* 2010; **29**: 403-410 [PMID: 19838214 DOI: 10.1038/onc.2009.321]
- 65 **Koike K**, Uchiumi T, Ohga T, Toh S, Wada M, Kohno K, Kuwano M. Nuclear translocation of the Y-box binding protein by ultraviolet irradiation. *FEBS Lett* 1997; **417**: 390-394 [PMID: 9409758 DOI: 10.1016/S0014-5793(97)01296-9]
- 66 **Chattopadhyay R**, Das S, Maiti AK, Boldogh I, Xie J, Hazra TK, Kohno K, Mitra S, Bhakat KK. Regulatory role of human AP-endonuclease (APE1/Ref-1) in YB-1-mediated activation of the multidrug resistance gene MDR1. *Mol Cell Biol* 2008; **28**: 7066-7080 [PMID: 18809583 DOI: 10.1128/MCB.00244-08]
- 67 **Kim HL**, Koedrith P, Lee SM, Kim YJ, Seo YR. Base excision DNA repair defect in thioredoxin-1 (Trx1)-deficient cells. *Mutat Res* 2013; **751-752**: 1-7 [PMID: 24459704 DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2013.10.002]
- 68 **Prasad R**, Williams JG, Hou EW, Wilson SH. Pol  $\beta$  associated complex and base excision repair factors in mouse fibroblasts. *Nucleic Acids Res* 2012; **40**: 11571-11582 [PMID: 23042675 DOI: 10.1093/nar/gks898]
- 69 **Gong L**, Gong H, Pan X, Chang C, Ou Z, Ye S, Yin L, Yang L, Tao T, Zhang Z, Liu C, Lane DP, Peng J, Chen J. p53 isoform  $\Delta$ 113p53/ $\Delta$ 133p53 promotes DNA double-strand break repair to protect cell from death and senescence in response to DNA damage. *Cell Res* 2015; **25**: 351-369 [PMID: 25698579 DOI: 10.1038/cr.2015.22]
- 70 **Tang J**, Agrawal T, Cheng Q, Qu L, Brewer MD, Chen J, Yang X. Phosphorylation of Daxx by ATM contributes to DNA damage-induced p53 activation. *PLoS One* 2013; **8**: e55813 [PMID: 23405218 DOI: 10.1371/journal.pone.0055813]
- 71 **Suchánková J**, Legartová S, Sehnalová P, Kozubek S, Valente S, Labella D, Mai A, Eckerich C, Fackelmayer FO, Sorokin DV, Bartova E. PRMT1 arginine methyltransferase accumulates in cytoplasmic bodies that respond to selective inhibition and DNA damage. *Eur J Histochem* 2014; **58**: 2389 [PMID: 24998928 DOI: 10.4081/ejh.2014.2389]
- 72 **Liu S**, Fan Z, Geng Z, Zhang H, Ye Q, Jiao S, Xu X. PIAS3 promotes homology-directed repair and distal non-homologous end joining. *Oncol Lett* 2013; **6**: 1045-1048 [PMID: 24137461 DOI: 10.3892/ol.2013.1472]
- 73 **Morris JR**, Boutell C, Keppler M, Densham R, Weekes D, Alamshah A, Butler L, Galanty Y, Pangon L, Kiuichi T, Ng T, Solomon E. The SUMO modification pathway is involved in the BRCA1 response to genotoxic stress. *Nature* 2009; **462**: 886-890 [PMID: 20016594 DOI: 10.1038/nature08593]
- 74 **Joilin G**, Leigh PN, Newbury SF, Hafezparast M. An Overview of MicroRNAs as Biomarkers of ALS. *Front Neurol* 2019; **10**: 186 [PMID: 30899244 DOI: 10.3389/fneur.2019.00186]
- 75 **Vislovukh A**, Vargas TR, Poleskaya A, Groisman I. Role of 3'-untranslated region translational control in cancer development, diagnostics and treatment. *World J Biol Chem* 2014; **5**: 40-57 [PMID: 24600513 DOI: 10.4331/wjbc.v5.i1.40]
- 76 **Pardini B**, Calin GA. MicroRNAs and Long Non-Coding RNAs and Their Hormone-Like Activities in Cancer. *Cancers (Basel)* 2019; **11** [PMID: 30884898 DOI: 10.3390/cancers11030378]
- 77 **Kadamkode V**, Banerjee G. Micro RNA: an epigenetic regulator of type 2 diabetes. *Microna* 2014; **3**: 86-97 [PMID: 25412860 DOI: 10.2174/2211536603666141118232514]
- 78 **Lv J**, Zhang Z, Pan L, Zhang Y. MicroRNA-34/449 family and viral infections. *Virus Res* 2019; **260**: 1-6

- [PMID: 30412711 DOI: 10.1016/j.virusres.2018.11.001]
- 79 **Moghaddam AS**, Afshari JT, Esmaceli SA, Saburi E, Joneidi Z, Momtazi-Borojeni AA. Cardioprotective microRNAs: Lessons from stem cell-derived exosomal microRNAs to treat cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 2019; **285**: 1-9 [PMID: 30939341 DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2019.03.016]
- 80 **Kao GS**, Tu YK, Sung PH, Wang FS, Lu YD, Wu CT, Lin RLC, Yip HK, Lee MS. MicroRNA-mediated interacting circuits predict hypoxia and inhibited osteogenesis of stem cells, and dysregulated angiogenesis are involved in osteonecrosis of the femoral head. *Int Orthop* 2018; **42**: 1605-1614 [PMID: 29700584 DOI: 10.1007/s00264-018-3895-x]
- 81 **Wang T**, Xu L, Jia R, Wei J. MiR-218 suppresses the metastasis and EMT of HCC cells via targeting SERBP1. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2017; **49**: 383-391 [PMID: 28369267 DOI: 10.1093/abbs/gmx017]
- 82 **Lu YF**, Zhang L, Wayne MM, Fu WM, Zhang JF. MiR-218 mediates tumorigenesis and metastasis: Perspectives and implications. *Exp Cell Res* 2015; **334**: 173-182 [PMID: 25857406 DOI: 10.1016/j.yexcr.2015.03.027]
- 83 **Zhao L**, Kong H, Sun H, Chen Z, Chen B, Zhou M. LncRNA-PVT1 promotes pancreatic cancer cells proliferation and migration through acting as a molecular sponge to regulate miR-448. *J Cell Physiol* 2018; **233**: 4044-4055 [PMID: 28657147 DOI: 10.1002/jcp.26072]
- 84 **Chik F**, Szyf M, Rabbani SA. Role of epigenetics in cancer initiation and progression. *Adv Exp Med Biol* 2011; **720**: 91-104 [PMID: 21901621 DOI: 10.1007/978-1-4614-0254-1\_8]
- 85 **Imran A**, Qamar HY, Ali Q, Naem H, Riaz M, Amin S, Kanwal N, Ali F, Sabar MF, Nasir IA. Role of Molecular Biology in Cancer Treatment: A Review Article. *Iran J Public Health* 2017; **46**: 1475-1485 [PMID: 29167765]
- 86 **Climente-González H**, Porta-Pardo E, Godzik A, Eyraes E. The Functional Impact of Alternative Splicing in Cancer. *Cell Rep* 2017; **20**: 2215-2226 [PMID: 28854369 DOI: 10.1016/j.celrep.2017.08.012]
- 87 **Ohtomo N**, Tomiya T, Tanoue Y, Inoue Y, Nishikawa T, Ikeda H, Seyama Y, Kokudo N, Shibahara J, Fukayama M, Koike K, Shirataki H, Fujiwara K. Expression of  $\alpha$ -taxilin in hepatocellular carcinoma correlates with growth activity and malignant potential of the tumor. *Int J Oncol* 2010; **37**: 1417-1423 [PMID: 21042709]
- 88 **Mashidori T**, Shirataki H, Kamai T, Nakamura F, Yoshida K. Increased  $\alpha$ -taxilin protein expression is associated with the metastatic and invasive potential of renal cell cancer. *Biomed Res* 2011; **32**: 103-110 [PMID: 21551945 DOI: 10.2220/biomedres.32.103]
- 89 **Pan Z**, Erkan M, Streit S, Friess H, Kleeff J. Silencing of GRP94 expression promotes apoptosis in pancreatic cancer cells. *Int J Oncol* 2009; **35**: 823-828 [PMID: 19724918 DOI: 10.3892/ijo.00000395]
- 90 **Zhao F**, Vilardi A, Neely RJ, Choi JK. Promotion of cell cycle progression by basic helix-loop-helix E2A. *Mol Cell Biol* 2001; **21**: 6346-6357 [PMID: 11509675 DOI: 10.1128/MCB.21.18.6346-6357.2001]
- 91 **Wang X**, McGowan CH, Zhao M, He L, Downey JS, Fearn C, Wang Y, Huang S, Han J. Involvement of the MKK6-p38 $\gamma$  cascade in gamma-radiation-induced cell cycle arrest. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 4543-4552 [PMID: 10848581 DOI: 10.1128/MCB.20.13.4543-4552.2000]
- 92 **Liang Y**, Yu W, Li Y, Yu L, Zhang Q, Wang F, Yang Z, Du J, Huang Q, Yao X, Zhu X. Nudel modulates kinetochore association and function of cytoplasmic dynein in M phase. *Mol Biol Cell* 2007; **18**: 2656-2666 [PMID: 17494871 DOI: 10.1091/mbc.e06-04-0345]
- 93 **Sütterlin C**, Polishchuk R, Pecot M, Malhotra V. The Golgi-associated protein GRASP65 regulates spindle dynamics and is essential for cell division. *Mol Biol Cell* 2005; **16**: 3211-3222 [PMID: 15888544 DOI: 10.1091/mbc.e04-12-1065]
- 94 **Ando M**, Saito Y, Xu G, Bui NQ, Medetgul-Ernar K, Pu M, Fisch K, Ren S, Sakai A, Fukusumi T, Liu C, Haft S, Pang J, Mark A, Gaykalova DA, Guo T, Favorov AV, Yegnasubramanian S, Fertig EJ, Ha P, Tamayo P, Yamasoba T, Ideker T, Messer K, Califano JA. Chromatin dysregulation and DNA methylation at transcription start sites associated with transcriptional repression in cancers. *Nat Commun* 2019; **10**: 2188 [PMID: 31097695 DOI: 10.1038/s41467-019-09937-w]
- 95 **Kaur J**, Daoud A, Eblen ST. Targeting Chromatin Remodeling for Cancer Therapy. *Curr Mol Pharmacol* 2019; **12**: 215-229 [PMID: 30767757 DOI: 10.2174/1874467212666190215112915]
- 96 **Sadikovic B**, Al-Romaih K, Squire JA, Zielenska M. Cause and consequences of genetic and epigenetic alterations in human cancer. *Curr Genomics* 2008; **9**: 394-408 [PMID: 19506729 DOI: 10.2174/138920208785699580]
- 97 **Shankar S**, Kumar D, Srivastava RK. Epigenetic modifications by dietary phytochemicals: implications for personalized nutrition. *Pharmacol Ther* 2013; **138**: 1-17 [PMID: 23159372 DOI: 10.1016/j.pharmthera.2012.11.002]
- 98 **Patra S**, Panigrahi DP, Praharaj PP, Bhol CS, Mahapatra KK, Mishra SR, Behera BP, Jena M, Bhutia SK. Dysregulation of histone deacetylases in carcinogenesis and tumor progression: a possible link to apoptosis and autophagy. *Cell Mol Life Sci* 2019; **76**: 3263-3282 [PMID: 30982077 DOI: 10.1007/s00018-019-03098-1]
- 99 **Mohammad HP**, Barbash O, Creasy CL. Targeting epigenetic modifications in cancer therapy: erasing the roadmap to cancer. *Nat Med* 2019; **25**: 403-418 [PMID: 30842676 DOI: 10.1038/s41591-019-0376-8]
- 100 **Hake SB**, Garcia BA, Duncan EM, Kauer M, Dellaire G, Shabanowitz J, Bazett-Jones DP, Allis CD, Hunt DF. Expression patterns and post-translational modifications associated with mammalian histone H3 variants. *J Biol Chem* 2006; **281**: 559-568 [PMID: 16267050 DOI: 10.1074/jbc.M509266200]
- 101 **Lee YY**, Yu YB, Gunawardena HP, Xie L, Chen X. BCLAF1 is a radiation-induced H2AX-interacting partner involved in  $\gamma$ H2AX-mediated regulation of apoptosis and DNA repair. *Cell Death Dis* 2012; **3**: e359 [PMID: 22833098 DOI: 10.1038/cddis.2012.76]
- 102 **Salomoni P**. The PML-Interacting Protein DAXX: Histone Loading Gets into the Picture. *Front Oncol* 2013; **3**: 152 [PMID: 23760585 DOI: 10.3389/fonc.2013.00152]
- 103 **Sudharsan R**, Azuma Y. The SUMO ligase PIAS1 regulates UV-induced apoptosis by recruiting Daxx to SUMOylated foci. *J Cell Sci* 2012; **125**: 5819-5829 [PMID: 22976298 DOI: 10.1242/jcs.110825]
- 104 **Cho S**, Park JS, Kang YK. Dual functions of histone-lysine N-methyltransferase Setdb1 protein at promyelocytic leukemia-nuclear body (PML-NB): maintaining PML-NB structure and regulating the expression of its associated genes. *J Biol Chem* 2011; **286**: 41115-41124 [PMID: 21921037 DOI: 10.1074/jbc.M111.248534]
- 105 **Collazo E**, Couture JF, Bulfer S, Trievel RC. A coupled fluorescent assay for histone methyltransferases. *Anal Biochem* 2005; **342**: 86-92 [PMID: 15958184 DOI: 10.1016/j.ab.2005.04.007]
- 106 **Chaib H**, Prébet T, Vey N, Collette Y. [Histone methyltransferases: a new class of therapeutic targets in cancer treatment?]. *Med Sci (Paris)* 2011; **27**: 725-732 [PMID: 21880260 DOI: 10.1016/j.ms.2011.05.007]

- 10.1051/medsci/2011278014]
- 107 **Li J**, Zhu S, Ke XX, Cui H. Role of several histone lysine methyltransferases in tumor development. *Biomed Rep* 2016; **4**: 293-299 [PMID: 26998265 DOI: 10.3892/br.2016.574]
- 108 **Jones PA**, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 2007; **128**: 683-692 [PMID: 17320506 DOI: 10.1016/j.cell.2007.01.029]
- 109 **Tsankova N**, Renthal W, Kumar A, Nestler EJ. Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* 2007; **8**: 355-367 [PMID: 17453016 DOI: 10.1038/nrn2132]
- 110 **Wilson CB**, Rowell E, Sekimata M. Epigenetic control of T-helper-cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 2009; **9**: 91-105 [PMID: 19151746 DOI: 10.1038/nri2487]
- 111 **Deb M**, Kar S, Sengupta D, Shilpi A, Parbin S, Rath SK, Londhe VA, Patra SK. Chromatin dynamics: H3K4 methylation and H3 variant replacement during development and in cancer. *Cell Mol Life Sci* 2014; **71**: 3439-3463 [PMID: 24676717 DOI: 10.1007/s00018-014-1605-4]
- 112 **Kobarg J**, Schnitger S, Fonatsch C, Lemke H, Bowen MA, Buck F, Hansen HP. Characterization, mapping and partial cDNA sequence of the 57-kD intracellular Ki-1 antigen. *Exp Clin Immunogenet* 1997; **14**: 273-280 [PMID: 9523163]
- 113 **Gray-McGuire C**, Guda K, Adrianto I, Lin CP, Natale L, Potter JD, Newcomb P, Poole EM, Ulrich CM, Lindor N, Goode EL, Fridley BL, Jenkins R, Le Marchand L, Casey G, Haile R, Hopper J, Jenkins M, Young J, Buchanan D, Gallinger S, Adams M, Lewis S, Willis J, Elston R, Markowitz SD, Wiesner GL. Confirmation of linkage to and localization of familial colon cancer risk haplotype on chromosome 9q22. *Cancer Res* 2010; **70**: 5409-5418 [PMID: 20551049 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0188]
- 114 **Kobarg CB**, Kobarg J, Crosara-Alberto DP, Theizen TH, Franchini KG. MEF2C DNA-binding activity is inhibited through its interaction with the regulatory protein Ki-1/57. *FEBS Lett* 2005; **579**: 2615-2622 [PMID: 15862299 DOI: 10.1016/j.febslet.2005.03.078]
- 115 **Aziz MH**, Hafeez BB, Sand JM, Pierce DB, Aziz SW, Dreckschmidt NE, Verma AK. Protein kinase Cvarepsilon mediates Stat3Ser727 phosphorylation, Stat3-regulated gene expression, and cell invasion in various human cancer cell lines through integration with MAPK cascade (RAF-1, MEK1/2, and ERK1/2). *Oncogene* 2010; **29**: 3100-3109 [PMID: 20228845 DOI: 10.1038/onc.2010.63]
- 116 **Cheng Y**, LeGall T, Oldfield CJ, Mueller JP, Van YY, Romero P, Cortese MS, Uversky VN, Dunker AK. Rational drug design via intrinsically disordered protein. *Trends Biotechnol* 2006; **24**: 435-442 [PMID: 16876893 DOI: 10.1016/j.tibtech.2006.07.005]
- 117 **Iakoucheva LM**, Brown CJ, Lawson JD, Obradović Z, Dunker AK. Intrinsic disorder in cell-signaling and cancer-associated proteins. *J Mol Biol* 2002; **323**: 573-584 [PMID: 12381310 DOI: 10.1016/S0022-2836(02)00969-5]
- 118 **Tompa P**, Fuxreiter M. Fuzzy complexes: polymorphism and structural disorder in protein-protein interactions. *Trends Biochem Sci* 2008; **33**: 2-8 [PMID: 18054235 DOI: 10.1016/j.tibs.2007.10.003]
- 119 **Levine AJ**, Hu W, Feng Z. The P53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death Differ* 2006; **13**: 1027-1036 [PMID: 16557269 DOI: 10.1038/sj.cdd.4401910]
- 120 **Yue X**, Zhao Y, Xu Y, Zheng M, Feng Z, Hu W. Mutant p53 in Cancer: Accumulation, Gain-of-Function, and Therapy. *J Mol Biol* 2017; **429**: 1595-1606 [PMID: 28390900 DOI: 10.1016/j.jmb.2017.03.030]
- 121 **Ozaki T**, Nakagawara A. Role of p53 in Cell Death and Human Cancers. *Cancers (Basel)* 2011; **3**: 994-1013 [PMID: 24212651 DOI: 10.3390/cancers3010994]
- 122 **Fogal V**, Gostissa M, Sandy P, Zacchi P, Sternsdorf T, Jensen K, Pandolfi PP, Will H, Schneider C, Del Sal G. Regulation of p53 activity in nuclear bodies by a specific PML isoform. *EMBO J* 2000; **19**: 6185-6195 [PMID: 11080164 DOI: 10.1093/emboj/19.22.6185]
- 123 **Matera AG**, Wang Z. A day in the life of the spliceosome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; **15**: 108-121 [PMID: 24452469 DOI: 10.1038/nrm3742]
- 124 **Coltri PP**, Dos Santos MGP, da Silva GHG. Splicing and cancer: Challenges and opportunities. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2019; **10**: e1527 [PMID: 30773852 DOI: 10.1002/wrna.1527]
- 125 **Dvinge H**, Kim E, Abdel-Wahab O, Bradley RK. RNA splicing factors as oncoproteins and tumour suppressors. *Nat Rev Cancer* 2016; **16**: 413-430 [PMID: 27282250 DOI: 10.1038/nrc.2016.51]
- 126 **Paronetto MP**, Passacantilli I, Sette C. Alternative splicing and cell survival: from tissue homeostasis to disease. *Cell Death Differ* 2016; **23**: 1919-1929 [PMID: 27689872 DOI: 10.1038/cdd.2016.91]
- 127 **Di C**, Syafrizayanti, Zhang Q, Chen Y, Wang Y, Zhang X, Liu Y, Sun C, Zhang H, Hoheisel JD. Function, clinical application, and strategies of Pre-mRNA splicing in cancer. *Cell Death Differ* 2019; **26**: 1181-1194 [PMID: 30464224 DOI: 10.1038/s41418-018-0231-3]
- 128 **Bressan GC**, Moraes EC, Manfiolli AO, Kuniyoshi TM, Passos DO, Gomes MD, Kobarg J. Arginine methylation analysis of the splicing-associated SR protein SFRS9/SRP30C. *Cell Mol Biol Lett* 2009; **14**: 657-669 [PMID: 19557313 DOI: 10.2478/s11658-009-0024-2]
- 129 **Fu Y**, Huang B, Shi Z, Han J, Wang Y, Huangfu J, Wu W. SRSF1 and SRSF9 RNA binding proteins promote Wnt signalling-mediated tumorigenesis by enhancing  $\beta$ -catenin biosynthesis. *EMBO Mol Med* 2013; **5**: 737-750 [PMID: 23592547 DOI: 10.1002/emmm.201202218]
- 130 **Lai CH**, Huang YC, Lee JC, Tseng JT, Chang KC, Chen YJ, Ding NJ, Huang PH, Chang WC, Lin BW, Chen RY, Wang YC, Lai YC, Hung LY. Translational upregulation of Aurora-A by hnRNP Q1 contributes to cell proliferation and tumorigenesis in colorectal cancer. *Cell Death Dis* 2017; **8**: e2555 [PMID: 28079881 DOI: 10.1038/cddis.2016.479]
- 131 **Perrotti D**, Neviani P. From mRNA metabolism to cancer therapy: chronic myelogenous leukemia shows the way. *Clin Cancer Res* 2007; **13**: 1638-1642 [PMID: 17363515 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2320]
- 132 **Kiledjian M**, Dreyfuss G. Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box. *EMBO J* 1992; **11**: 2655-2664 [PMID: 1628625 DOI: 10.1002/j.1460-2075.1992.tb05331.x]
- 133 **Yoshino H**, Enokida H, Chiyomaru T, Tatarano S, Hidaka H, Yamasaki T, Gotannda T, Tachiwada T, Nohata N, Yamane T, Seki N, Nakagawa M. Tumor suppressive microRNA-1 mediated novel apoptosis pathways through direct inhibition of splicing factor serine/arginine-rich 9 (SRSF9/SRP30c) in bladder cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; **417**: 588-593 [PMID: 22178073 DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.12.011]
- 134 **Han N**, Li W, Zhang M. The function of the RNA-binding protein hnRNP in cancer metastasis. *J Cancer Res Ther* 2013; **9** Suppl: S129-S134 [PMID: 24516048 DOI: 10.4103/0973-1482.122506]
- 135 **Cammás A**, Pileur F, Bonnal S, Lewis SM, Lévêque N, Holcik M, Vagner S. Cytoplasmic relocalization of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 controls translation initiation of specific mRNAs. *Mol Biol Cell* 2007; **18**: 5048-5059 [PMID: 17898077 DOI: 10.1091/mbc.e07-06-0603]

- 136 **Revil T**, Pelletier J, Toutant J, Cloutier A, Chabot B. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K represses the production of pro-apoptotic Bcl-xS splice isoform. *J Biol Chem* 2009; **284**: 21458-21467 [PMID: 19520842 DOI: 10.1074/jbc.M109.019711]
- 137 **Xiao Z**, Ko HL, Goh EH, Wang B, Ren EC. hnRNP K suppresses apoptosis independent of p53 status by maintaining high levels of endogenous caspase inhibitors. *Carcinogenesis* 2013; **34**: 1458-1467 [PMID: 23455382 DOI: 10.1093/carcin/bgt085]
- 138 **Venables JP**, Koh CS, Froehlich U, Lapointe E, Couture S, Inkel L, Bramard A, Paquet ER, Watier V, Durand M, Lucier JF, Gervais-Bird J, Tremblay K, Prinos P, Klinck R, Elela SA, Chabot B. Multiple and specific mRNA processing targets for the major human hnRNP proteins. *Mol Cell Biol* 2008; **28**: 6033-6043 [PMID: 18644864 DOI: 10.1128/MCB.00726-08]
- 139 **Haley B**, Paunesku T, Protić M, Woloschak GE. Response of heterogeneous ribonuclear proteins (hnRNP) to ionising radiation and their involvement in DNA damage repair. *Int J Radiat Biol* 2009; **85**: 643-655 [PMID: 19579069 DOI: 10.1080/09553000903009548]
- 140 **Sueoka E**, Sueoka N, Iwanaga K, Sato A, Suga K, Hayashi S, Nagasawa K, Nakachi K. Detection of plasma hnRNP B1 mRNA, a new cancer biomarker, in lung cancer patients by quantitative real-time polymerase chain reaction. *Lung Cancer* 2005; **48**: 77-83 [PMID: 15777973 DOI: 10.1016/j.lungcan.2004.10.007]
- 141 **Bouchal P**, Dvorakova M, Scherl A, Garbis SD, Nenutil R, Vojtesek B. Intact protein profiling in breast cancer biomarker discovery: protein identification issue and the solutions based on 3D protein separation, bottom-up and top-down mass spectrometry. *Proteomics* 2013; **13**: 1053-1058 [PMID: 23303686 DOI: 10.1002/pmic.201200121]
- 142 **Vu LP**, Prieto C, Amin EM, Chhangawala S, Krivtsov A, Calvo-Vidal MN, Chou T, Chow A, Minuesa G, Park SM, Barlowe TS, Taggart J, Tivnan P, Deering RP, Chu LP, Kwon JA, Meydan C, Perales-Paton J, Arshi A, Gönen M, Famulare C, Patel M, Paietta E, Tallman MS, Lu Y, Glass J, Garret-Bakelman FE, Melnick A, Levine R, Al-Shahrour F, Järås M, Hacohen N, Hwang A, Garippa R, Lengner CJ, Armstrong SA, Cerchietti L, Cowley GS, Root D, Doench J, Leslie C, Ebert BL, Kharas MG. Functional screen of MSI2 interactors identifies an essential role for SYNCRIP in myeloid leukemia stem cells. *Nat Genet* 2017; **49**: 866-875 [PMID: 28436985 DOI: 10.1038/ng.3854]
- 143 **Schaner ME**, Ross DT, Ciaravino G, Sorlie T, Troyanskaya O, Diehn M, Wang YC, Duran GE, Sikic TL, Caldeira S, Skomedal H, Tu IP, Hernandez-Boussard T, Johnson SW, O'Dwyer PJ, Fero MJ, Kristensen GB, Borresen-Dale AL, Hastie T, Tibshirani R, van de Rijn M, Teng NN, Longacre TA, Botstein D, Brown PO, Sikic BI. Gene expression patterns in ovarian carcinomas. *Mol Biol Cell* 2003; **14**: 4376-4386 [PMID: 12960427 DOI: 10.1091/mbc.e03-05-0279]
- 144 **Serce NB**, Boesl A, Klamann I, von Serényi S, Noetzel E, Press MF, Dimmler A, Hartmann A, Schouli J, Knuechel R, Beckmann MW, Fasching PA, Dahl E. Overexpression of SERBP1 (Plasminogen activator inhibitor 1 RNA binding protein) in human breast cancer is correlated with favourable prognosis. *BMC Cancer* 2012; **12**: 597 [PMID: 23236990 DOI: 10.1186/1471-2407-12-597]
- 145 **Guo K**, Zheng S, Xu Y, Xu A, Chen B, Wen Y. Loss of miR-26a-5p promotes proliferation, migration, and invasion in prostate cancer through negatively regulating SERBP1. *Tumour Biol* 2016; **37**: 12843-12854 [PMID: 27449037 DOI: 10.1007/s13277-016-5158-z]
- 146 **Hlavaty J**, Ertl R, Miller I, Gabriel C. Expression of Progesterone Receptor Membrane Component 1 (PGRMC1), Progesterin and AdipoQ Receptor 7 (PAQPR7), and Plasminogen Activator Inhibitor 1 RNA-Binding Protein (PAIRBP1) in Glioma Spheroids In Vitro. *Biomed Res Int* 2016; **2016**: 8065830 [PMID: 27340667 DOI: 10.1155/2016/8065830]
- 147 **Sun W**, Guo C, Meng X, Yu Y, Jin Y, Tong D, Geng J, Huang Q, Qi J, Liu A, Guan R, Xu L, Sun D, Ji W, Liu P, Liu F, Sun H, Ji G, Fu S, Bai J. Differential expression of PAI-RBP1, C1orf142, and COTL1 in non-small cell lung cancer cell lines with different tumor metastatic potential. *J Invest Med* 2012; **60**: 689-694 [DOI: 10.2310/JIM.0b013e31824963b6]
- 148 **Lange CA**, Sartorius CA, Abdel-Hafiz H, Spillman MA, Horwitz KB, Jacobsen BM. Progesterone receptor action: translating studies in breast cancer models to clinical insights. *Adv Exp Med Biol* 2008; **630**: 94-111 [PMID: 18637487 DOI: 10.1007/978-0-387-78818-0\_7]
- 149 **Zhang L**, Kanda Y, Roberts DJ, Ecker JL, Losel R, Wehling M, Peluso JJ, Pru JK. Expression of progesterone receptor membrane component 1 and its partner serpine 1 mRNA binding protein in uterine and placental tissues of the mouse and human. *Mol Cell Endocrinol* 2008; **287**: 81-89 [PMID: 18440126 DOI: 10.1016/j.mce.2008.02.012]
- 150 **Heaton JH**, Dlakic WM, Gelehrter TD. Posttranscriptional regulation of PAI-1 gene expression. *Thromb Haemost* 2003; **89**: 959-966 [PMID: 12783107 DOI: 10.1055/s-0037-1613396]
- 151 **Harbeck N**, Thomssen C. [u-Plasminogen activator (urinary plasminogen activator, urokinase) (uPA) and its PAI-1 type 1 inhibitor are not only prognostically but also predictively significant and support clinical decisions on therapy in primary carcinoma of the breast]. *Zentralbl Gynakol* 2003; **125**: 362-367 [PMID: 14569518 DOI: 10.1055/s-2003-43036]
- 152 **Kuhn W**, Schmalefeldt B, Reuning U, Pache L, Berger U, Ulm K, Harbeck N, Späthe K, Dettmar P, Höfler H, Jänicke F, Schmitt M, Graeff H. Prognostic significance of urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 for survival in advanced ovarian carcinoma stage FIGO IIIc. *Br J Cancer* 1999; **79**: 1746-1751 [PMID: 10206287 DOI: 10.1038/sj.bjc.6690278]
- 153 **Tecimer C**, Doering DL, Goldsmith LJ, Meyer JS, Abdulhay G, Wittliff JL. Clinical relevance of urokinase-type plasminogen activator, its receptor and inhibitor type 1 in ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2000; **10**: 372-381 [PMID: 11240701 DOI: 10.1046/j.1525-1438.2000.010005372.x]
- 154 **Schmalefeldt B**, Prechtel D, Härting K, Späthe K, Rutke S, Konik E, Fridman R, Berger U, Schmitt M, Kuhn W, Lengyel E. Increased expression of matrix metalloproteinases (MMP)-2, MMP-9, and the urokinase-type plasminogen activator is associated with progression from benign to advanced ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2001; **7**: 2396-2404 [PMID: 11489818]
- 155 **Borgfeldt C**, Hansson SR, Gustavsson B, Måsbäck A, Casslén B. Dedifferentiation of serous ovarian cancer from cystic to solid tumors is associated with increased expression of mRNA for urokinase plasminogen activator (uPA), its receptor (uPAR) and its inhibitor (PAI-1). *Int J Cancer* 2001; **92**: 497-502 [PMID: 11304683 DOI: 10.1002/ijc.1215]
- 156 **Hoffmann G**, Pollow K, Weikel W, Strittmatter HJ, Bach J, Schaffrath M, Knapstein P, Melchert F, Pollow B. Urokinase and plasminogen activator-inhibitor (PAI-1) status in primary ovarian carcinomas and ovarian metastases compared to benign ovarian tumors as a function of histopathological parameters. *Clin Chem Lab Med* 1999; **37**: 47-54 [PMID: 10094378 DOI: 10.1151/CCLM.1999.007]
- 157 **van der Burg ME**, Henzen-Logmans SC, Berns EM, van Putten WL, Klijn JG, Foekens JA. Expression of



- urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1 in benign, borderline, malignant primary and metastatic ovarian tumors. *Int J Cancer* 1996; **69**: 475-479 [PMID: 8980250 DOI: 10.1002/(SICI)1097-0215(19961220)69:6<475::AID-IJC10>3.0.CO;2-0]
- 158 **Henderson MJ**, Russell AJ, Hird S, Muñoz M, Clancy JL, Lehrbach GM, Calanni ST, Jans DA, Sutherland RL, Watts CK. EDD, the human hyperplastic discs protein, has a role in progesterone receptor coactivation and potential involvement in DNA damage response. *J Biol Chem* 2002; **277**: 26468-26478 [PMID: 12011095 DOI: 10.1074/jbc.M203527200]
- 159 **Fogli A**, Gauthier-Barichard F, Schiffmann R, Vanderhoof VH, Bakalov VK, Nelson LM, Boespflug-Tanguy O. Screening for known mutations in EIF2B genes in a large panel of patients with premature ovarian failure. *BMC Womens Health* 2004; **4**: 8 [PMID: 15507143 DOI: 10.1186/1472-6874-4-8]
- 160 **Choi Y**, Rosewell KL, Brännström M, Akin JW, Curry TE, Jo M. FOS, a Critical Downstream Mediator of PGR and EGF Signaling Necessary for Ovulatory Prostaglandins in the Human Ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 2018; **103**: 4241-4252 [PMID: 30124866 DOI: 10.1210/jc.2017-02532]
- 161 **Mansouri MR**, Schuster J, Badhai J, Stattin EL, Lösel R, Wehling M, Carlsson B, Hovatta O, Karlström PO, Golovleva I, Toniolo D, Bione S, Peluso J, Dahl N. Alterations in the expression, structure and function of progesterone receptor membrane component-1 (PGRMC1) in premature ovarian failure. *Hum Mol Genet* 2008; **17**: 3776-3783 [PMID: 18782852 DOI: 10.1093/hmg/ddn274]
- 162 **Peluso JJ**, Griffin D, Liu X, Horne M. Progesterone receptor membrane component-1 (PGRMC1) and PGRMC-2 interact to suppress entry into the cell cycle in spontaneously immortalized rat granulosa cells. *Biol Reprod* 2014; **91**: 104 [PMID: 25253729 DOI: 10.1095/biolreprod.114.122986]
- 163 **Yilmaz BD**, Bulun SE. Endometriosis and nuclear receptors. *Hum Reprod Update* 2019; **25**: 473-485 [PMID: 30809650 DOI: 10.1093/hmupd/dmz005]
- 164 **Alkhalaf M**, El-Mowafy AM, Abou-Zeid LA. Progesterone inhibition of MDM2 p90 protein in MCF-7 human breast cancer cell line is dependent on p53 levels. *J Mol Genet Med* 2005; **1**: 33-37 [PMID: 19565011 DOI: 10.4172/1747-0862.1000008]
- 165 **Chen Y**, Wu F, Saito E, Lin Y, Song M, Luu HN, Gupta PC, Sawada N, Tamakoshi A, Shu XO, Koh WP, Xiang YB, Tomata Y, Sugiyama K, Park SK, Matsuo K, Nagata C, Sugawara Y, Qiao YL, You SL, Wang R, Shin MH, Pan WH, Pednekar MS, Tsugane S, Cai H, Yuan JM, Gao YT, Tsuji I, Kanemura S, Ito H, Wada K, Ahn YO, Yoo KY, Ahsan H, Chia KS, Boffetta P, Zheng W, Inoue M, Kang D, Potter JD. Association between type 2 diabetes and risk of cancer mortality: a pooled analysis of over 771,000 individuals in the Asia Cohort Consortium. *Diabetologia* 2017; **60**: 1022-1032 [PMID: 28265721 DOI: 10.1007/s00125-017-4229-z]
- 166 **Michlig S**, Harris M, Loffing J, Rossier BC, Firsov D. Progesterone down-regulates the open probability of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel via a Nedd4-2-dependent mechanism. *J Biol Chem* 2005; **280**: 38264-38270 [PMID: 16172119 DOI: 10.1074/jbc.M506308200]
- 167 **Boyan BD**, Schwartz Z. Rapid vitamin D-dependent PKC signaling shares features with estrogen-dependent PKC signaling in cartilage and bone. *Steroids* 2004; **69**: 591-597 [PMID: 15288775 DOI: 10.1016/j.steroids.2004.05.008]
- 168 **Wickramasekera NT**, Das GM. Tumor suppressor p53 and estrogen receptors in nuclear-mitochondrial communication. *Mitochondrion* 2014; **16**: 26-37 [PMID: 24177747 DOI: 10.1016/j.mito.2013.10.002]



## Recibo digital

Esse recibo confirma que o seu documento foi recebido por **Turnitin**. Abaixo você encontrará a informação do recibo referente ao seu envio.

A primeira página do seu documento está exibida abaixo.

Autor do material: Carolina Colleti  
Título do Trabalho: 1222  
Título do envio: dissertacao  
Nome do arquivo: Disserta\_o\_VersaoFINAL.docx  
Tamanho de arquivo: 11.92M  
Contagem de páginas: 72  
Contagem de palavras: 16,776  
Contagem de caracteres: 92,423  
Data de envio: 16-abr-2020 09:44AM (UTC-0300)  
Identificação do Envio: 1299087741



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

CAROLINA COLLETTI

HABP4 e o câncer de cólon: caracterização do papel da HABP4 em células tumorais e em modelo animal

*HABP4 and colon cancer: characterization of the HABP4 role in tumor cells and animal model*

CAMPINAS  
2020

# dissertacao

## RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE

<b>23%</b> ÍNDICE DE SEMELHANÇA	<b>22%</b> FONTES DA INTERNET	<b>18%</b> PUBLICAÇÕES	<b>12%</b> DOCUMENTOS DOS ALUNOS
------------------------------------	----------------------------------	---------------------------	-------------------------------------

## FONTES PRIMÁRIAS

<b>1</b>	<b>repositorio.unicamp.br</b> Fonte da Internet	<b>5%</b>
<b>2</b>	<b>www.locus.ufv.br</b> Fonte da Internet	<b>1%</b>
<b>3</b>	<b>rupress.org</b> Fonte da Internet	<b>1%</b>
<b>4</b>	<b>www.wjgnet.com</b> Fonte da Internet	<b>1%</b>
<b>5</b>	<b>d-nb.info</b> Fonte da Internet	<b>1%</b>
<b>6</b>	<b>repositorio.unesp.br</b> Fonte da Internet	<b>&lt;1%</b>
<b>7</b>	<b>studylibfr.com</b> Fonte da Internet	<b>&lt;1%</b>
<b>8</b>	<b>archive-ouverte.unige.ch</b> Fonte da Internet	<b>&lt;1%</b>
<b>9</b>	<b>www.ebi.ac.uk</b> Fonte da Internet	<b>&lt;1%</b>