

ESTUDO DO PAPEL DE RSK NA SINALIZAÇÃO CELULAR EM GLIOBLASTOMA

LUANA CAMPOS SOARES

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de Mestre
em Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientadora: Glaucia Noeli Maroso Hajj

Co-Orientador: Martin Roffé

São Paulo

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Soares, Luana Campos

Estudo do papel de RSK na sinalização celular em glioblastoma /
Luana Campos Soares - São Paulo, 2016.

96p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração:
Oncologia.

Orientadora: Glaucia Noeli Maroso Hajj

Descritores: 1. NEOPLASIAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL.
2. GLIOBLASTOMA/genética. 3. ASTROCITOMA/genética. 4. VIAS DE
SINALIZAÇÃO. 4. PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS

*Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.*

Ricardo Reis , 14-2-1933

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os pacientes com glioblastoma e seus familiares. Que o esforço realizado por nós durante este mestrado contribua de alguma maneira para o melhor entendimento dessa doença, resultando em novas possibilidades e esperanças.

AGRADECIMENTOS

A todos que direta ou indiretamente colaboraram com a minha caminhada até aqui:

Aos orientadores, Dra. Glaucia Hajj e Dr. Martin Roffé, pela oportunidade de participar desse trabalho;

À Dra. Vilma Martins, pela oportunidade de participar do grupo de Biologia Celular e Molecular do CIPE, pelo espaço cedido para realização dos experimentos e pela ajuda de diversas formas;

À Dra. Silvia Rogatto pelo exemplo, carinho e ajuda de diversas formas;

Ao A.C.Camargo Cancer Center, à instituição CIPE, a todos os membros da Pós-Graduação e à Biblioteca;

À Fernanda Lupinacci pela parceria no LBCM, companheirismo, paciência e amizade;

Aos amigos do LBCM, Antuani, Aninha, Danilo, Edson, Felipe, Fer Giudice, Hemano, Hildegardo, Mayra, Michele, Rodrigo, Tiago, Tonielli, em especial à Juliana por ser fonte de alegria no dia-a-dia, ao Marcos pelas risadas, e à Gabriela pelo carinho e pela ajuda imensurável;

Aos amigos do CIPE, em especial à Alexcia, Brenda, Emne, Elizabette, Fabio, Fer Fortes, Grazi, Hellen, Iara, Irina, Isabella, Jennice, Karina, Kelvin, Luisa, Maísa, Maria da Conceição, Mariana, Priscila e Vanessa Dantas, pela grande ajuda e pelos bons momentos vividos;

A todos os funcionários do CIPE por proporcionarem um ambiente de trabalho organizado e alegre;

Aos amigos do LBME e do Departamento de Morfologia da UNESP, Campus de Botucatu, em especial à Dra. Maeli Dal Pai e ao Dr. Robson Carvalho pelos ensinamentos e confiança no meu trabalho;

Aos mestres e à XLV Turma de Biologia da UNESP, por participarem comigo dessa grande jornada de amadurecimento;

Aos meus amigos de sempre, Carol, Stella, Regiane, Natashea, Lucas, Marcelo, Bruna, Cassio, Raquel, Fer Carani e Fanfas, pelo apoio nas horas difíceis, pela paciência e pelo imenso carinho, essenciais durante esse processo;

A toda minha família pelo amor, atenção e cuidado;

A minha mãe Lúcia, por ser minha inspiração, meu exemplo, por não desistir nunca da luta, pelo amor, carinho, atenção. Eu atribuo os méritos deste trabalho a você, assim como irei atribuir todas as minhas conquistas ao seu esforço;

A minha tia Heloisa Galvão e ao Tito, por me receberem na nova cidade com carinho, pelos conselhos e pela ajuda imensurável, não tenho palavras para agradecer;

Aos meus avós Sônia (*in memoriam*) e Paulo, por serem meus exemplos, por me tratarem com muito amor, por terem se dedicado à minha formação e por me incentivarem sempre a ir cada vez mais longe;

A minha irmã Luiza, por estar ao meu lado desde sempre, torcer por mim e me passar muita força;

Ao Bruno Duran, pelo amor, paciência, carinho, cuidado, incentivo e por ser o melhor parceiro que alguém poderia querer durante este processo; ao seu irmão Lucas e aos seus pais, D. Sueli e S. Duran, por me tratarem como filha, pelo carinho, pela preocupação e pela ajuda imensurável;

À FAPESP, pelo apoio financeiro de Março/2014 a Fevereiro/2016.

RESUMO

Soares LC. **Estudo do papel de RSK na sinalização celular em glioblastoma**. São Paulo; 2016. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Os astrocitomas são neoplasias primárias do Sistema Nervoso Central, graduadas de I a IV com base em critérios clínicos e histológicos. O astrocitoma de grau IV, também denominado glioblastoma, é o tipo mais comum e agressivo dos tumores gliais e apresenta baixa resposta a agentes quimioterápicos. Em glioblastomas, mutações e superexpressão dos receptores de fatores de crescimento podem levar à ativação desregulada da via das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK). A via de MAPK é ativadora direta da cinase RSK, que está envolvida com diversos processos celulares. Apesar desta proteína ter sido estudada em diferentes tipos tumorais, sua participação em glioblastomas nunca foi avaliada. Dessa maneira, este trabalho tem como objetivo analisar o envolvimento de RSK em glioblastoma, e observar a participação dessa proteína em processos como proliferação e senescência celular. Inicialmente, observou-se que a regulação dessa proteína ocorre principalmente na tradução ou através de modificações pós-traducionais em linhagens celulares de glioblastoma. Utilizando células nocaute para RSK1 e/ou RSK2 obtidas pela metodologia CRISPR/Cas9, pôde-se constatar o envolvimento desta proteína na proliferação celular. Além disso, a possível relação entre RSK e a senescência celular induzida pela perda de PTEN foi demonstrada em células não transformadas, utilizando siRNA e inibidores químicos de RSK. Pôde-se, também, observar que inibidores de RSK comumente utilizados na literatura possuem efeitos inespecíficos que podem levar a interpretações errôneas sobre as funções de RSK. Adicionalmente, foi demonstrado que o melhor alvo para acessar a atividade de RSK é a proteína TSC2 (Ser1798).

SUMMARY

Soares LC. **[Study of the role of RSK in cell signaling in glioblastoma]**. São Paulo; 2016. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Astrocytomas are primary Central Nervous System tumors graded from I to IV based on histological and clinical criteria. The grade IV astrocytoma, also known as glioblastoma, is the most common and aggressive of glial tumors and presents low response to chemotherapeutic agents. In glioblastomas, mutations and overexpression of growth factor receptors can lead to the upregulated activation of the mitogen-activated protein kinases pathways (MAPK). MAPK pathway is the major activator of the p90 ribosomal S6 kinase (RSK), which is involved in many cellular processes. RSK involvement has been performed in several tumor types; however it has never been studied in glioblastomas. Thus, this work aimed to analyze the involvement of RSK in glioblastoma. Firstly, it was observed that the regulation of this protein occurs mainly at translational level or by post-translational control in glioblastoma cell lines. Using RSK1 and/or RSK2 knockout cells obtained by the CRISPR/Cas9 methodology, it was found the involvement of this protein on cell proliferation. Furthermore, the possible relationship between RSK and cellular senescence induced by PTEN loss has been demonstrated in untransformed cells by using siRNA and chemical RSK inhibitors. Additionally, it also was observed that RSK inhibitors commonly used in the literature have unspecific effects that can lead to wrongful conclusions about the true functions of RSKs. It was also demonstrated that the best target to access the RSK activity is the TSC2 protein (Ser1798).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Formação de glioblastomas primários e secundários.....	5
Figura 2	Principais alterações moleculares em glioblastomas.....	7
Figura 3	Divisão dos glioblastomas de acordo com as alterações genéticas.....	9
Figura 4	Controle da tradução através das vias RAS/ERK1/2 e PI3K/AKT.....	12
Figura 5	Tradução de mRNA dependente de reconhecimento do Cap 5'.....	14
Figura 6	Estrutura das RSKs.....	17
Figura 7	Ativação das RSKs.....	19
Figura 8	Western Blotting de RSK nas diferentes linhagens de glioblastoma.....	23
Figura 9	Expressão de RSK em astrocitomas.....	24
Figura 10	Correlação da fosforilação e expressão de RSK1 e PTEN em casos Grau IV.....	25
Figura 11	Mecanismos moleculares da senescência celular.....	28
Figura 12	Tipos de senescência.....	31
Figura 13	Técnica de CRISPR/Cas9.....	35
Figura 14	Esquema ilustrando o plasmídeo obtido.....	47
Figura 15	Expressão de mRNA das isoformas de RSK em diferentes linhagens..	55
Figura 16	Padronização do inibidor FMK.....	59

Figura 17	Fosforilação de S6K e RPS6 utilizando FMK.....	60
Figura 18	O efeito do inibidor FMK na proliferação em células LN-18.....	61
Figura 19	Tratamento de MCF10A com VO-OHpic.....	64
Figura 20	Avaliação de p21 em MCF10A depletadas de RSK.....	65
Figura 21	Teste da inserção das guias para RSK1 e RSK2 no plasmídeo.....	67
Figura 22	Exemplo de gel de acrilamida para teste quanto ao conteúdo de RSKs.....	68
Figura 23	Western Blotting de células nocaute para RSK1 e/ou RSK2.....	70
Figura 24	Verificação de RSK3 e RSK4 em células nocaute.....	72
Figura 25	Curvas de crescimento das células nocaute para RSK1 e/ou RSK2.....	72

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Sequências dos siRNAs para RSK1 e RSK2.....	39
Quadro 2	Anticorpos utilizados para Western Blotting.....	42
Quadro 3	Genes utilizados para reação de qPCR.....	45
Quadro 4	Porcentagem de colônias obtidas por guia testada.....	69

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2HG	R(-)-2-hidroxi-glutarato
4E-BP1	Do inglês, eIF4E binding protein 1
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µm	Micrômetro
µM	Micromolar
AKT	Do inglês, RAC-alpha serine/threonine-protein kinase
ARF	Do inglês, ADP-ribosylation factor
ATM	Do inglês, Ataxia telangiectasia mutated
ATP	Adenosina trifosfato
ATR	Do inglês, Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein
BrdU	Bromodeoxiuridina
BSA	Albumina sérica bovina
CaMKs	Cinases dependentes de cálcio/calmodulina
CCPC	Células cerebrais propagadoras do câncer
cDNA	DNA complementar ao mRNA
CDK	Inibidor de cinases dependentes de ciclina
CDKN1A	Inibidor de quinase dependente de ciclina 1A, ou p21
CDKN1B	Inibidor de quinase dependente de ciclina 1B
CDKN2A	Inibidor de quinase dependente de ciclina 2A, ou p16-INK4
CDKN2C	Inibidor de quinase dependente de ciclina 2C
CHEK1/2	Do inglês, Cell cycle checkpoint kinase
CIAP	Do inglês, Calf intestinal alkaline phosphatase
CIT	Células iniciadoras tumorais
cm²	Centímetros quadrados
CO₂	Dióxido de carbono
CREB-1	Do inglês, cyclic AMP-responsive element-binding protein 1
CRISPR	Do inglês, clustered regularly interspaced short palindromic repeats
Ct	Do inglês, threshold cycle
DMEM	Do inglês, Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNA-SCARS	DNA com alterações na cromatina que reforçam a senescência
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DTT	Ditiotreitol
E2F	Do inglês, transcription factor E2F
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	Do inglês, epitelial growth factor
EGFR	Do inglês, epitelial growth fator receptor
eIFs	Do inglês, eukaryotic initiation factors
ERK1/2	Do inglês, extracellular signal-regulated kinases 1/2
ETS2	Do inglês, protein C-ets-2
FGF	Do inglês, fibroblast growth factor
FGFR-1	Do inglês, fibroblast growth factor receptor 1
FGFR-3	Do inglês, fibroblast growth factor receptor 3
FLN-A	Do inglês, filamin-A
FOS	Do inglês, G0/G1 switch regulatory protein 7
FRB	Do inglês, FKBP12-rapamycin binding
g	Unidade de força G
GAPDH	Do inglês, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GBM	Glioblastoma Multiforme
G-CIMP	Do inglês, Glioma CpG Island Methylator Phenotype
GDP	Guanosina difosfato
GEF	Do inglês, guanine nucleotide exchange factor
GRB2	Do inglês, growth factor receptor bound protein 2
GSK-3β	Do inglês, glycogen synthase kinase-3 beta
GTP	Guanosina trifosfato
h	Hora(s)
HDR	Reparo dirigida por homologia
HIF1	Do inglês, hypoxia-inducible factor 1
HPRT	Do inglês, hypoxanthine phosphoribosyltransferase
IDH	Do inglês, isocitrate dehydrogenase
INCA	Instituto Nacional do Câncer
KCl	Cloreto de potássio

KH₂PO₄	Dihidrogenofosfato de potássio
LB	Do inglês, Lysogeny Broth
M	Molar
MAP	Proteína ativada por mitógeno
MAP2K	MAP cinase cinase
MAP3K	MAP cinase cinase cinase
MAPK	MAP cinase
MAPK14	MAP cinase 14
MAPK15	MAP cinase 15
MAPK7	MAP cinase 7
MAX	Do inglês, Myc-associated factor X
MDM2	Do inglês, E3 ubiquitin-protein ligase Mdm2
MEK1/2	Do inglês, ERK activator kinase
Met-tRNAⁱ	tRNA iniciador acoplado a uma metionina
mg	Miligrama
MGMT	Do inglês, O-6-methylguanine-DNA methyltransferase
min	Minuto(s)
ml	Mililitro
mLST8	Do inglês, target of rapamycin complex subunit LST8
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
mTOR	Do inglês, mechanistic target of rapamycin
mTORC1	Complexo mTOR 1
mTORC2	Complexo mTOR 2
MYC	Do inglês, Class E basic helix-loop-helix protein 39
MXD1	Do inglês, MAX dimerization protein 1
Na₂HPO₄	Fosfato de sódio dibásico
NaCl	Cloreto de sódio
NB	Cérebro normal
NFKB	Do inglês, nuclear factor NF-kappa-B
ng	Nanograma
NHEJ	Junção de extremidade não-homóloga
NLS	Do inglês, nuclear localization signal

nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
NP40	Do inglês, 4-Nonylphenyl poly(ethylene glycol)
°C	Graus celsius
OIS	Senescência induzida por oncogene
Oligo(dT)	Nucleotídeos desoxi-timina
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Do inglês, Phosphate-buffered saline
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDCD4	Do inglês, programmed cell death 4
PDGF	Do inglês, platelet-derived growth factor
PDGFR	Do inglês, platelet-derived growth factor receptor
PKD1	Do inglês, pyruvate dehydrogenase kinase isoform 1
pH	Potencial hidrogeniônico
PH	Do inglês, pleckstrin homology domain
PI3K	Do inglês, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
PICS	Senescência celular induzida pela perda de PTEN
PIF	Fragmento de interação com PKD1
PIP₂	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PIP₃	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
PMA	Do inglês, phorbol myristate acetate
pmol	Picomol
PTEN	Do inglês, phosphatase and tensin homolog
QPCR	PCR em tempo real
RAF	Do inglês, RAF proto-oncogene ser/thr-protein kinase
RanBP3	Do inglês, ran-binding protein 3
Raptor	Do inglês, regulatory associated protein of mTOR
RAS	Proteína GTPase RAS
RB	Do inglês, retinoblastoma-associated protein
RHEB	Do inglês, Ras homolog enriched in brain
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferência
rpm	Rotações por minuto
RPS6	Do inglês, 40S ribosomal protein S6

RSK	Do inglês, p90 ribosomal S6 kinase
RT	Reação de transcrição reversa
RTKs	Receptores tirosina-cinase
S6K1	Do inglês, ribosomal protein S6 kinase 1
SAHF	Regiões de heterocromatina associadas à senescência
SA-β-Gal	Do inglês, senescence-associated β-galactosidase
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Do inglês, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
SGK1	Do inglês, Serum/glucocorticoid-regulated kinase 1
sgRNA	RNA guia
SH2	Domínio de homologia de SRC 2
SH3	Domínio de homologia de SRC 3
siRNA	Do inglês, small interfering RNA
SNC	Sistema Nervoso Central
SOS	Do inglês, son of sevenless
SRF	Do inglês, serum response factor
SUMO	Do inglês, small ubiquitin-like modifier
T4 PNK	Do inglês, T4 polynucleotide kinase
TALENs	Do inglês, transcription activator–like effector nucleases
TBS-T	Do inglês, Tris Buffered Saline - Tween®
TCGA	Do inglês, The Cancer Genome Atlas
TIF1-alpha	Do inglês, transcription intermediary factor 1-alpha
TP53	Do inglês, tumor protein p53
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
Tris-HCl	Tris(hidroximetil)aminometano cloridrato
tRNA	RNA transportador
TSC	Do inglês, tuberous sclerosis complex
TSC1	Do inglês, tuberous sclerosis 1
TSC2	Do inglês, tuberous sclerosis 2
Ub	Ubiquitina
V	Volts
ZFN	Do inglês, zinc-finger nucleases

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Glioblastoma	2
1.2	As Vias de Sinalização de PI3K/AKT e RAS/ERK1/2.....	10
1.3	O controle do Início de Tradução	13
1.4	A Proteína Cinase RSK.....	16
1.5	Senescência Celular Induzida pela perda de PTEN.....	26
1.6	A Utilização do Sistema CRISPR/Cas9 em Estudos	33
2	OBJETIVOS	36
2.1	Objetivo Geral	36
2.2	Objetivos Específicos	36
3	MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1	Cultura Celular	37
3.1.1	Tratamentos Celulares com Inibidores.....	38
3.1.2	Depleção Utilizando siRNA	39
3.2	Extração e Quantificação de Proteínas	40
3.3	Western Blotting	40
3.4	Extração de RNA com Trizol®.....	42
3.5	Tratamento do RNA com DNASE	44
3.6	Reação de Transcrição Reversa (RT).....	44
3.7	Reação de PCR em Tempo Real (qPCR)	45
3.8	Obtenção de uma Linhagem de Glioblastoma Nocaute para RSK Utilizando a Metodologia CRISPR/Cas9	46
3.8.1	Confecção do Plasmídeo	46
3.8.2	Curva de Sensibilidade para Puromicina.....	51
3.8.3	Transfecção de Células LN-18	51
3.8.4	Isolamento de Células e Obtenção de Colônias.....	52
3.8.5	Curva de Crescimento.....	53

3.8.6	Análise da Proliferação Celular	53
4	RESULTADOS	54
4.1	Expressão de mRNA das Isoformas de RSK	54
4.2	Padronização dos Inibidores BI-D1870 e SL0101	56
4.3	Inibidor Químico FMK.....	58
4.4	Papel das RSKs na Proliferação Celular	61
4.5	Envolvimento de RSK1 na PICS	62
4.6	Células Nocaute para RSK1 e RSK2	66
5	DISCUSSÃO	73
6	CONCLUSÃO	82
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

ANEXOS

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

Anexo 2 Artigo Publicado

1 INTRODUÇÃO

Os tumores do Sistema Nervoso Central (SNC), apesar de possuírem uma incidência relativamente baixa, são de alta malignidade e impõem aos indivíduos acometidos um tempo de sobrevida baixo (VAN MEIR et al. 2010). São considerados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) o 14º tipo tumoral mais frequente em homens e o 15º mais frequente em mulheres, tendo sido esperada para 2015 uma mortalidade de 114.347 homens e 88.849 mulheres (FERLAY et al. 2013). Segundo dados do Ministério da Saúde (2014), a estimativa de incidência de tumores do SNC no Brasil em 2014 foi 5,07 casos novos a cada 100 mil homens e 4,05 a cada 100 mil mulheres.

Esses tumores podem aparecer em várias partes do SNC, sendo a maioria com origem no cérebro, nos nervos cranianos ou nas meninges. As formas mais frequentes desse tipo tumoral são os gliomas, que representam cerca de 40% a 60% dos tumores de SNC, e originam-se a partir da transformação maligna de células da glia. As células da glia, no contexto fisiológico, são responsáveis por fornecer nutrientes, oxigênio e suporte mecânico ao tecido nervoso, promovendo a manutenção do microambiente adequado aos neurônios (JUNQUEIRA e CARNEIRO 2004). Inicialmente, pressupunha-se que os gliomas surgissem a partir de células maduras do cérebro, que, através de mutações, se desdiferenciavam (AGNIHOTRI et al. 2013). No entanto, novos estudos apontam que esse tumor evolui a partir de

células-tronco neurais que sofreram transformação durante o desenvolvimento (STILES e ROWITCH 2008).

Dependendo da célula de origem glial, os gliomas podem ser classificados em astrocitomas (derivados de astrócitos); oligodendrogliomas (derivados de oligodendrócitos); ependimomas (derivados de células ependimárias); ou tumores gliais mistos (derivados de mais de um tipo celular). Os astrocitomas podem ser classificados em graus I a IV, conforme quatro características histológicas: aumento do número de células, mitoses, proliferação endotelial e necrose (LOUIS et al. 2007).

1.1 GLIOBLASTOMA

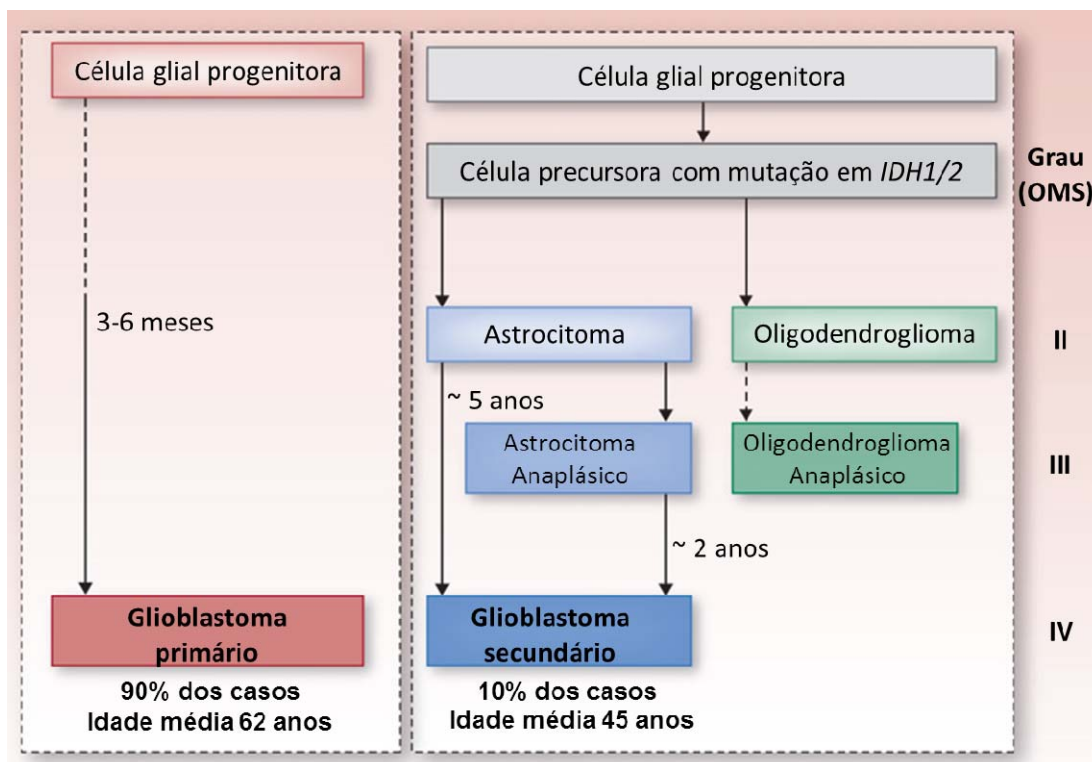
O astrocitoma grau IV, também conhecido como glioblastoma, anteriormente denominado Glioblastoma Multiforme ou GBM, é considerado o mais comum dos gliomas e de pior prognóstico, e caracterizado histologicamente pela presença de áreas de proliferação microvascular, necrose ou ambos. Os glioblastomas são responsáveis por 50%-60% dos tumores astrocitários. Acometem mais homens que mulheres (razão de 1,58:1), são mais comuns na população caucasiana em relação aos afrodescendentes (razão de 2:1) (OSTROM et al. 2013).

A terapia padrão para esses tumores envolve a ressecção cirúrgica (extração do tumor), quando possível, seguida de radioterapia e quimioterapia adjuvante com temozolamida (Temodal) (STUPP et al. 2005). Glioblastomas não podem ser completamente eliminados cirurgicamente

devido à sua natureza infiltrativa. Dessa maneira, a importância da cirurgia em prolongar a sobrevida é modesta, sendo a radioterapia o pilar do tratamento para esses tumores, capaz de aumentar a sobrevida de pacientes para uma média de 13 meses (SCOTT et al. 2011). Apesar do tratamento, quase todos os glioblastomas apresentam recorrência. O tempo médio de progressão, após o tratamento com radioterapia e temozolamida, é de 6,9 meses e a utilidade de radioterapia e da quimioterapia convencional para glioblastomas recidivantes é controversa. Apenas 3%-5% dos pacientes acometidos por glioblastomas sobrevivem por mais de três anos após a cirurgia, e são considerados sobreviventes de longo prazo (KREX et al. 2007).

Os glioblastomas podem ser separados em dois subtipos principais de acordo com a forma de surgimento e evolução do tumor, os quais possuem diferenças biológicas e genéticas (OHGAKI e KLEIHUES 2013). O glioblastoma primário é a forma mais comum da doença (90% dos casos), apresenta característica muito agressiva e ocorre '*de novo*' tipicamente em pacientes com mais de 50 anos de idade. No entanto, 10% do total de casos de glioblastoma têm início em pacientes mais jovens na forma de astrocitomas de baixo grau ou anaplásicos, e se transformam ao longo de um período de vários anos em tumores conhecidos como glioblastomas secundários. Glioblastomas primários e secundários possuem características morfológicas semelhantes, mas podem ser identificados histologicamente através de áreas de astrocitoma de baixo grau. (Figura 1).

Uma alteração importante, que pode ser utilizada para a classificação de glioblastomas como primário ou secundário, foi descrita por PARSONS et al. (2008). Essa alteração consiste na mutação dos genes *IDH1* e *IDH2*, que ocorrem frequentemente em glioblastomas secundários (>80%) e são muito raras em glioblastomas primários (6%) (BALSS et al. 2008; YAN et al. 2009). Essas mutações são comuns em gliomas de baixo grau, assim como podem ocorrer em células precursoras comuns entre glioblastomas secundários e tumores oligodendrogliais (Figura 1). As mutações que ocorrem são pontuais (troca de arginina por uma histidina na posição 132 em *IDH1* e 172 em *IDH2*), e levam à perda de função normal da enzima codificada, isocitrato desidrogenase. A enzima fica incapaz de converter isocitrato em α -cetoglutarato, e inicia a formação de R(-)-2-hidroxi-glutarato (2HG), que pode ser considerado um oncometabólito (DANG et al. 2009). A presença desse oncometabólito causa a inibição da prolil-hidroxilação do fator transcricional HIF-1, resultando em superexpressão de seus genes alvos (ZHAO et al. 2009). Essas alterações contribuem para a adaptação dos tumores ao ambiente anaeróbico, além de estimular o processo de angiogênese, contribuindo para a malignidade do tumor (SASAKI et al. 2012).

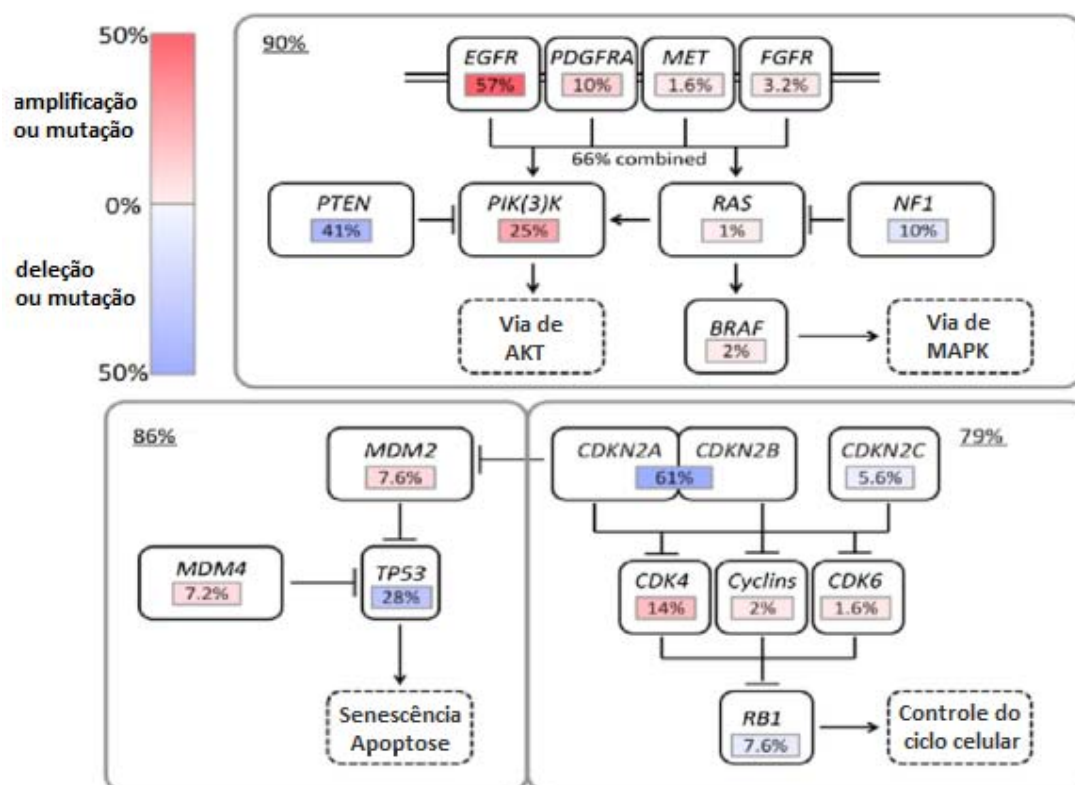


Fonte: Adaptado de OHGAKI e KLEIHUES (2013).

Figura 1 - Formação de glioblastomas primários e secundários. O glioblastoma primário ocorre em 90% dos casos e progride em um intervalo de tempo de 3-6 meses em pacientes com idade média de 62 anos de idade. O glioblastoma secundário ocorre em 10% em pacientes, os quais têm idade média de 45 anos de idade, progredindo de astrocitomas de baixo grau ou anaplásicos durante um intervalo de tempo de vários anos. A mutação em *IDH1* é um evento comum em glioblastomas secundários.

Estudos recentes têm fornecido descobertas interessantes sobre as vias moleculares envolvidas no processo de tumorigênese desse tipo tumoral. As principais alterações moleculares encontradas englobam a ativação da sinalização de síntese proteica e a inativação de sinais pró-apoptóticos (Figura 2). De acordo com o TCGA (2012) ocorrem amplificação e superexpressão dos receptores tirosina-cinase, como o de *EGF* e o de *PDGF*. Também ocorre a deleção de supressores de tumor, como *CDKN2A*, que inibe o ciclo celular, e a fosfatase *PTEN*, regulador negativo de PI3K. Além disso, mutações e superexpressão dos receptores de fatores de

crescimento em glioblastomas podem levar à ativação desregulada de diversas vias de sinalização, como a via das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK) e de PI3K/AKT. As vias de MAPK e PI3K/AKT regulam coordenadamente diversas atividades celulares desde expressão gênica, mitose, metabolismo, motilidade, sobrevivência, apoptose e diferenciação. Outro evento importante em glioblastomas é a inativação dos genes tumor supressor *TP53* e RB, que participam do controle do ciclo celular, e de processos como senescência e apoptose.



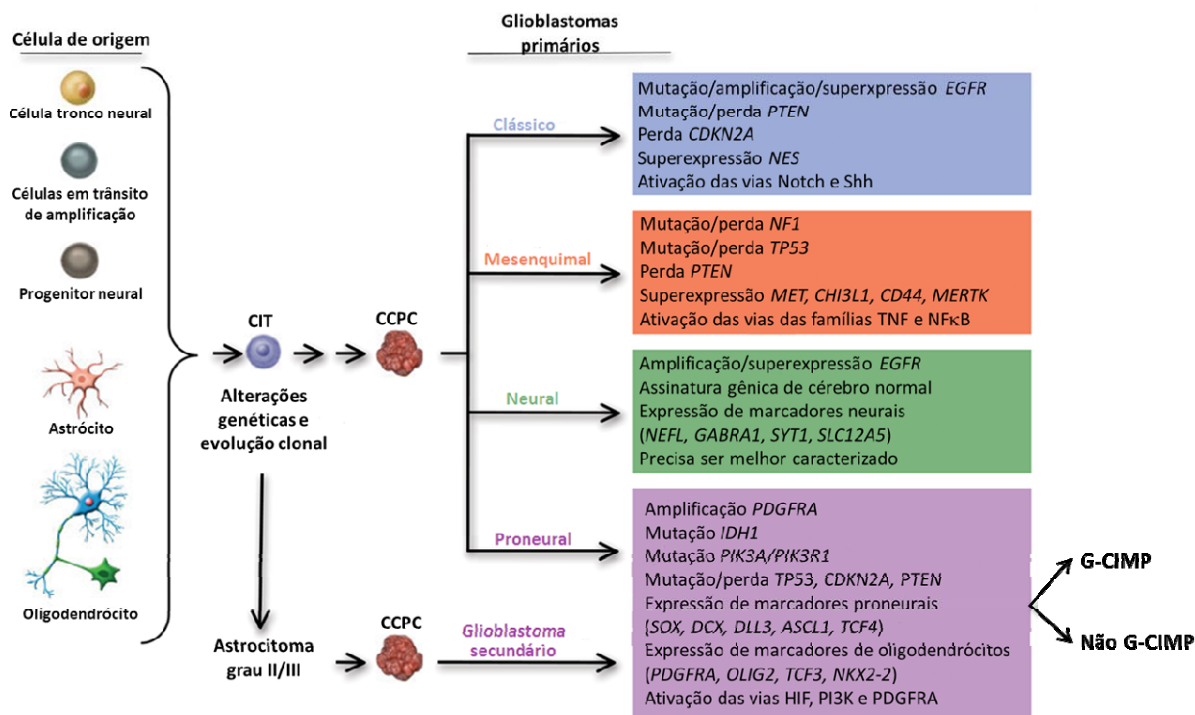
Fonte: Adaptado de The Cancer Genome Atlas Research Network (2012).

Figura 2 - Principais alterações moleculares em glioblastomas. Dentre as principais alterações encontradas em glioblastomas, 90% dos tumores apresentam mutações/amplificações de receptores de membrana que participam das vias de AKT e MAPK, envolvidas com a síntese proteica. Também podem ser encontradas importantes alterações na via de p53 (em 86% dos casos) e RB (em 79% dos casos). Essas vias estão envolvidas com a progressão do ciclo celular, sinalização de senescência e apoptose. Genes com amplificação/mutação estão representados em vermelho enquanto genes com deleção/mutação estão em azul.

Estes estudos levaram à subdivisão dos glioblastomas em subtipos moleculares: clássico, mesenquimal, proneural e neural (VERHAAK et al. 2010) (Figura 3). Os glioblastomas do tipo clássico são altamente proliferativos e costumam responder bem aos tratamentos convencionais para glioblastomas. Esse tipo tumoral apresenta uma elevada expressão de marcadores de células-tronco e precursores tumorais. O glioblastoma do tipo

mesenquimal também é responsivo aos tratamentos clássicos, e recebe esse nome devido a um perfil de expressão semelhante ao de células mesenquimais e células comprometidas com a angiogênese. O terceiro tipo, conhecido como glioblastoma proneural, possui alta expressão de genes que participam do desenvolvimento neural. Esse tipo tumoral aparece em indivíduos mais jovens, e, apesar de ser menos responsivo às terapias clássicas, implica uma sobrevida mais satisfatória quando comparada aos outros três tipos. Glioblastomas proneurais são divididos nos subtipos G-CIMP, com padrão de hipermetilação tipo G-CIMP, associado com melhor prognóstico, e mutações no gene *IDH1*; e subtipo Não G-CIMP, sem as alterações anteriores e presença de amplificação no gene *PDGFR*.

O último tipo, conhecido como glioblastoma neural, é o menos caracterizado e recebe esse nome pela alta expressão de marcadores de tecido cerebral normal, além de apresentar células morfolologicamente mais diferenciadas. Os glioblastomas primários podem ser classificados em qualquer um desses quatro tipos, enquanto os glioblastomas secundários são todos classificados como do tipo pró-neural.



Fonte: Adaptado de VAN MEIR et al. (2010).

Figura 3 - Divisão dos glioblastomas de acordo com as alterações genéticas. Células do tecido nervoso podem sofrer alterações genéticas levando à existência de células iniciadoras tumorais (CIT), que podem sofrer outras alterações genéticas tornando-se células cerebrais propagadoras do câncer (CCPC), ou evoluírem para astrocitomas de menor grau. As CCPCs são as últimas células responsáveis pela formação de glioblastomas. Os glioblastoma primários podem ser divididos de acordo com o perfil de alterações moleculares em Clássicos, Mesenquimais, Neurais ou Proneurais, sendo que o subtipo Proneural pode ser dividido em: tumores com presença do padrão de hipermetilação G-CIMP ou tumores com ausência desse padrão. Os glioblastomas secundários são todos considerados tumores Proneurais.

Apesar de as alterações genéticas e moleculares que acometem os glioblastomas estarem cada vez mais bem descritas, os tratamentos disponíveis são insuficientes e apenas aumentam a sobrevida dos pacientes em alguns meses. Dessa maneira, é necessária uma maior compreensão sobre as vias alteradas e a relação entre elas.

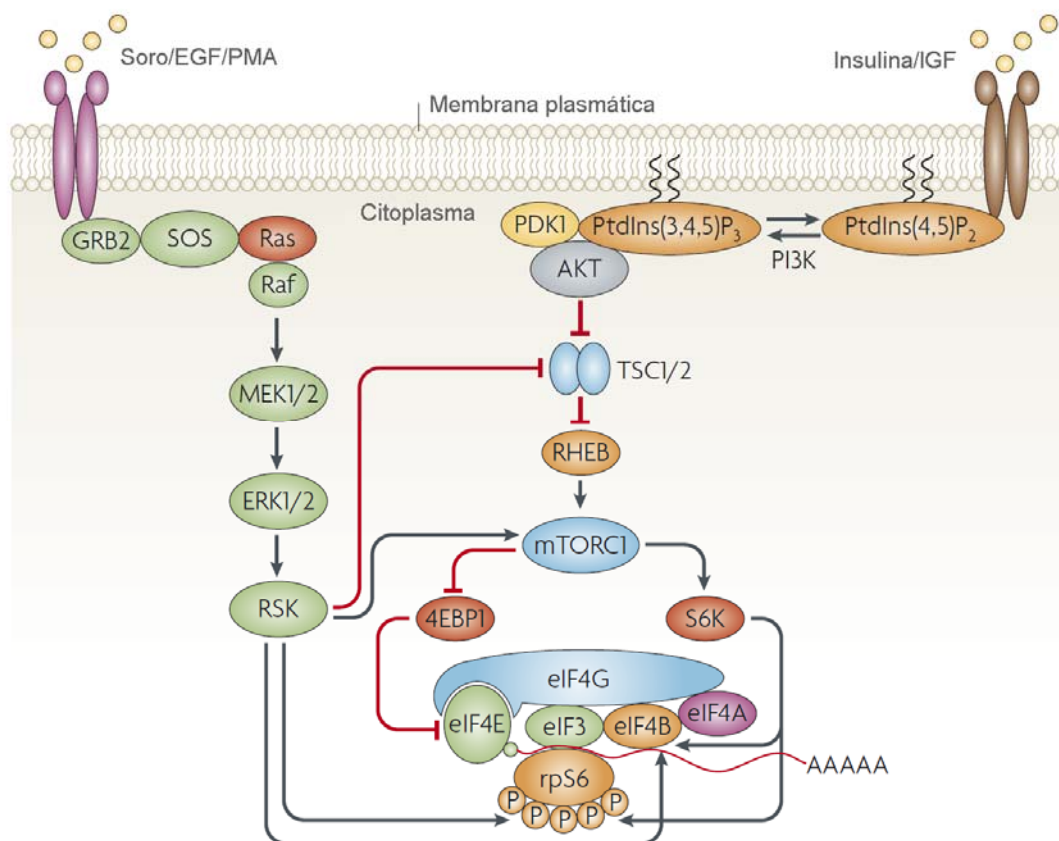
1.2 AS VIAS DE SINALIZAÇÃO DE PI3K/AKT E RAS/ERK1/2

Dentre as vias de sinalização celular que podem estar desreguladas em glioblastomas, o TCGA descreve importantes alterações nos componentes das vias de PI3K/AKT e RAS/ERK1/2. Essas duas vias estão intrinsecamente relacionadas, pois compartilham alvos em comum e participam dos mesmos processos celulares (Figura 4). Um dos processos celulares diretamente regulados por essas vias de sinalização é o controle da síntese de proteínas. A síntese de novas proteínas é um processo essencial para a proliferação, migração e até a morte celular e, portanto, as vias de controle da tradução podem exercer um papel-chave na tumorigênese.

A via de sinalização de PI3K/AKT tem início com a ligação de insulina ou outros fatores de crescimento em receptores tirosina-cinase (RTKs), permitindo a dimerização e auto-fosforilação desses receptores. Uma vez ativados, ocorre a fosforilação de PI3K, que fosforila fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) ligado à membrana para produzir fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP₃). PIP₃, por sua vez, serve como um sinal para a ancoragem na membrana de proteínas contendo o domínio PH, tais como AKT e PDK1. PDK1 ativa AKT fosforilando seu resíduo Thr308, enquanto a fosfatase de lipídeos PTEN defosforila PIP₃, impedindo a ativação de AKT (VIVANCO e SAWYERS 2002). Após sua ativação, AKT fosforila a proteína TSC2 no sítio Thr1462, a qual junto com a proteína TSC1, formam o *tuberous sclerosis complex* (TSC). A proteína TSC2 inibe a atividade da GTPase RHEB,

através da hidrólise de GTP. Assim, a fosforilação de TSC2 por AKT inibe sua atividade, evitando a inibição de RHEB. RHEB, por sua vez, influencia fortemente a atividade de mTOR, sendo necessária a inativação de TSC2 para a ativação de mTOR (FINGAR e BLENIS 2004).

A via de RAS/ERK1/2 é ativada por fatores de crescimento, como EGF, PDGF e FGF, que se ligam a RTKs específicos na membrana plasmática. A autofosforilação dos RTKs fornece sítios para a ligação da proteína GRB2 através do seu domínio de homologia a SRC 2 (SH2). Através do seu domínio de homologia a SRC 3 (SH3), GRB2 se liga a uma proteína *guanine nucleotide exchange factor* (GEF) conhecida como SOS. Quando o complexo GRB2-SOS está ligado ao RTK, ocorre a ativação de SOS, que, por sua vez, ativa a proteína GTPase RAS, através da troca de GDP por GTP. A proteína GTPase RAS fosforila e ativa a proteína MAP cinase cinase cinase (MAP3K) conhecida como RAF. RAF atua fosforilando e ativando uma MAP cinase cinase (MAP2K) conhecida como MEK1/2. Em seguida, MEK1/2 fosforila e ativa MAP cinase (MAPK) ERK1/2, resultando na fosforilação de múltiplos alvos no citoplasma e no núcleo (ROUX e BLENIS 2004).



Fonte: Adaptado de ANJUM e BLENIS (2008).

Figura 4 - Controle da tradução através das vias RAS/ERK1/2 e PI3K/AKT.

A via de PI3K/AKT tem início com a ativação de RTKs presentes na membrana plasmática, que quando ativados por hormônios ou fatores de crescimento, fosforilam e ativam a proteína cinase PI3K. PI3K é responsável pela fosforilação de PIP₂ em PIP₃, o que resulta na ativação de AKT. AKT regula a tradução por fosforilar e inativar a função do complexo TSC, um heterodímero de TSC1 e TSC2, que regula negativamente a proteína RHEB. A atividade de RHEB é essencial para a ativação da via, pois essa proteína associa-se a mTORC1 promovendo sua ativação e consequente sinalização para os alvos S6K1 e 4EBP1, essenciais para o início da tradução. A via de sinalização de RAS/ERK1/2 também tem início com RTKs cuja ativação resulta na ativação da cinase MEK1/2, que por sua vez fosforila e ativa ERK1/2, que participa da ativação da maquinaria de tradução através de um mecanismo dependente de RSK.

A via de RAS/ERK1/2 pode atuar no crescimento celular e na proliferação, através de diversos mecanismos. Uma vez ativada, ERK1/2 pode deslocar-se ao núcleo e promover a fosforilação e ativação de diversos

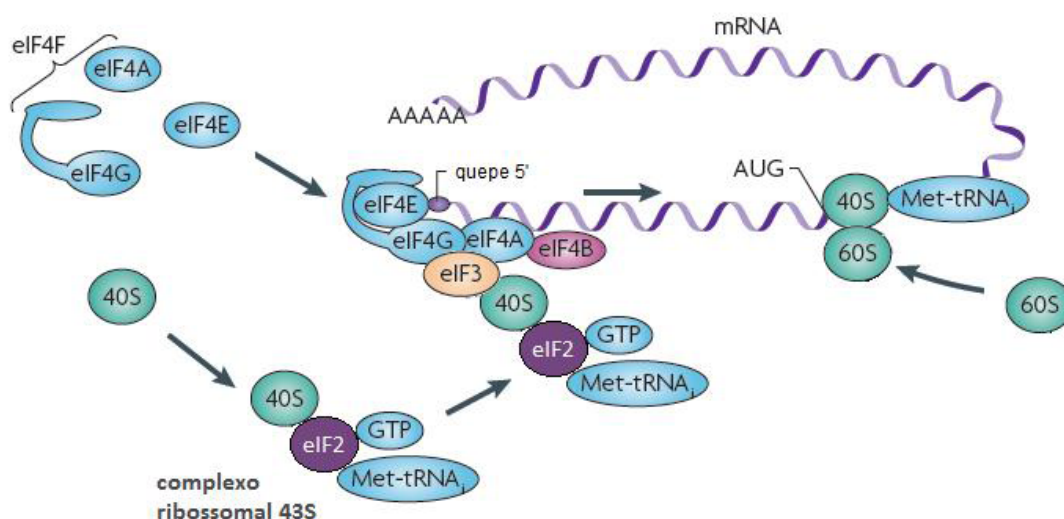
fatores transcricionais que controlam o ciclo celular, tais como MYC e FOS (CHEN et al. 1993; SEARS et al. 2000). Além disso, no citoplasma ERK1/2 controla a tradução de mRNAs, através da fosforilação da cinase RSK. Essa cinase tem sido muito estudada, e os alvos e processos celulares nos quais está envolvida estão cada vez mais elucidados. Sabe-se que possui um papel muito importante em diversos processos envolvidos com a tumorigênese.

1.3 O CONTROLE DO INÍCIO DE TRADUÇÃO

Grande parte do controle da síntese proteica ocorre na etapa inicial da tradução do RNA mensageiro (mRNA), e envolve fosforilações reversíveis de fatores de início de tradução (em eucariotos são chamados de *eukaryotic initiation factors* – eIFs) (SILVERA et al. 2010). Mudanças nas taxas de expressão e de fosforilação de eIFs estão envolvidas com a transformação de vários tipos celulares (CALKHOVEN et al. 2002).

Durante o início da tradução, o RNA transportador (tRNA) iniciador acoplado a uma metionina (Met-tRNA_i) é posicionado sobre a subunidade ribossomal pequena (40S) junto com o fator de iniciação eIF2 em sua forma ativa, ou seja, ligado a um GTP. A união entre esses componentes forma o complexo de início de tradução 43S, que é recrutado à extremidade 5' do mRNA. A ligação desse complexo ao mRNA ocorre por intermédio do complexo eIF4F, formado por três componentes: eIF4E, eIF4A e eIF4G. eIF4E, frequentemente encontrado superexpresso em tumores (DE

BENEDETTI e RHOADS 1990; CAMPBELL et al. 2015), é capaz de reconhecer e se ligar ao Cap 5' do mRNA e está relacionado com a malignidade em glioblastomas (TEJADA et al. 2009). eIF4A é uma helicase dependente de ATP, cuja atividade é linearizar o mRNA durante a varredura da região não traduzida até o códon de início da tradução (códon AUG). Sua atividade é estimulada pela proteína ligante de RNA eIF4B, que não é um membro formal do complexo eIF4F. A superexpressão de eIF4A já foi descrita em diversos cânceres, como carcinoma hepatocelular (SHUDA et al. 2000) e melanoma (EBERLE et al. 1997). eIF4G é responsável por unir todos esses fatores de início da tradução em um único complexo (FUKUCHI-SHIMOGORI et al. 2000). Após varredura do mRNA até o códon de início da tradução, a subunidade ribossomal 40S se unirá com a 60S para a formação do ribossomo completo (Figura 5).



Fonte: Adaptado de SILVERA et al. (2010).

Figura 5 - Tradução de mRNA dependente de reconhecimento do Cap 5'. O complexo ribossomal 43S é recrutado à extremidade 5' do mRNA e sua ligação ao mRNA é intermediada pelo eIF3 e pelo complexo eIF4F.

Uma das mais importantes proteínas que regulam o início de tradução é o mTOR, uma cinase que possui sítio de ligação para rapamicina no domínio FRB (SABATINI et al. 1994). mTOR é um componente essencial de dois complexos multiproteicos que exercem funções biológicas distintas: o complexo mTOR 1 (mTORC1) e o complexo mTOR 2 (mTORC2) (KIM et al. 2002; SARBASSOV et al. 2004). Enquanto mTORC2 participa da organização do citoesqueleto e da ativação de AKT, através da fosforilação do resíduo Ser473, mTORC1 está diretamente relacionado com a regulação do crescimento e da proliferação celular através do controle traducional. O complexo mTORC1 é formado pelas proteínas mTOR, Raptor e mLST8. Esse complexo é altamente inibido pela ligação da rapamicina ao domínio FRB de mTOR.

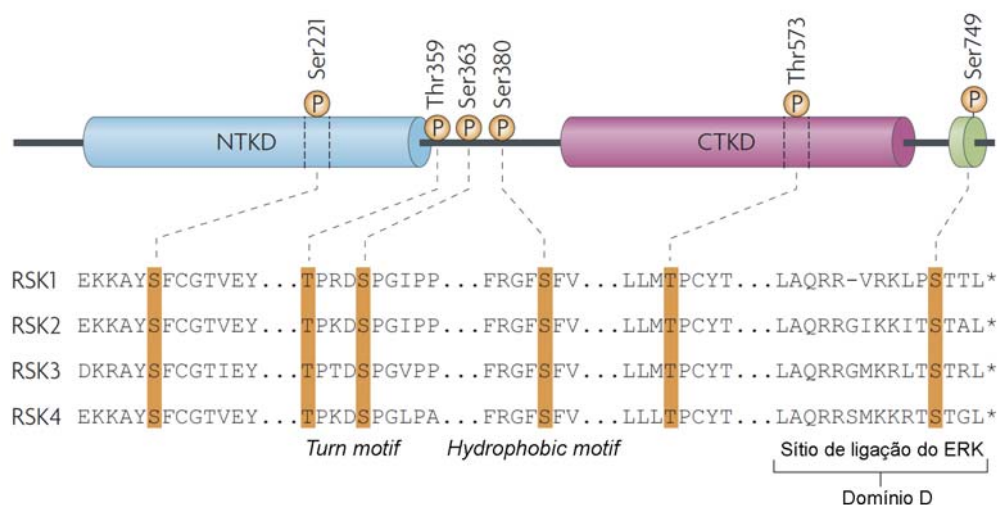
mTORC1 atua em resposta a estímulos por fatores de crescimento, hormônios, neurotransmissores e quimiocinas, que ativam as vias de PI3K/AKT e RAS/ERK1/2 (EFEYAN e SABATINI 2013). Essas vias ativam mTORC1 pela inibição do complexo TSC1/2 (Figura 4). O complexo mTORC1 regula a síntese proteica de duas maneiras principais. A primeira delas é através da fosforilação de 4E-BP1, uma proteína que se liga à eIF4E e impede a formação completa do complexo eIF4F. A fosforilação da proteína 4E-BP1 promove sua inativação, aumentando a disponibilidade de eIF4E e, conseqüentemente, aumentando a taxa de síntese proteica (GINGRAS et al. 2001; HAY e SONENBERG 2004). A segunda maneira de atuação de mTORC1 é através da fosforilação de S6K1 no resíduo Thr389. S6K fosforila a proteína da subunidade ribossomal 40S RPS6 em diversos

resíduos (ROUX et al. 2007), facilitando a montagem do complexo de início da tradução. Adicionalmente, S6K1 fosforila eIF4B, aumentando a atividade de helicase de eIF4A (DENNIS et al. 2012). S6K1 também fosforila e inibe PDCD4, um regulador negativo de eIF4A (YANG et al. 2004).

1.4 A PROTEÍNA CINASE RSK

Um dos principais alvos da via de sinalização de RAS/ERK1/2 é a família de proteínas RSK. A família de proteínas RSK é composta por quatro isoformas (RSK1 – 4), que compartilham um alto grau de homologia (75%-80% de identidade de aminoácidos) (ANJUM e BLENIS 2008).

A principal característica dessa família de proteínas é a presença de dois domínios cinase funcionais, separados por uma região de ligação: o domínio N-terminal e o domínio C-terminal (FISHER e BLENIS 1996). (Figura 6). O domínio N-terminal é homólogo à família de cinases AGC e é responsável pela fosforilação de substratos. O domínio C-terminal, por sua vez, compartilha homologia com as cinases dependentes de cálcio/calmodulina (CaMKs), e está envolvido com autofosforilação. Na região de ligação existem também duas sequências que compartilham homologia com as cinases da família AGC, conhecidas como *turn motif* e *hydrofobic motif*. Além disso, na região C-terminal da proteína existe um sítio de ligação para ERK conhecido como domínio D, que apresenta uma sequência de aminoácidos específica (Leu-Arg-Gln-Arg-Arg) (ROUX et al. 2003).



Fonte: Adaptado de ANJUM e BLENIS (2008).

Figura 6 - Estrutura das RSKs. A principal característica da proteína RSK é a presença de dois domínios cinase funcionais, domínios N-terminal e C-terminal, separados por uma região de ligação que contém as sequências *turn motif* e *hydrophobic motif*. Existe uma sequência conhecida como domínio D na qual ocorre a ligação da cinase ERK. As quatro isoformas dessa proteína compartilham alto grau de homologia.

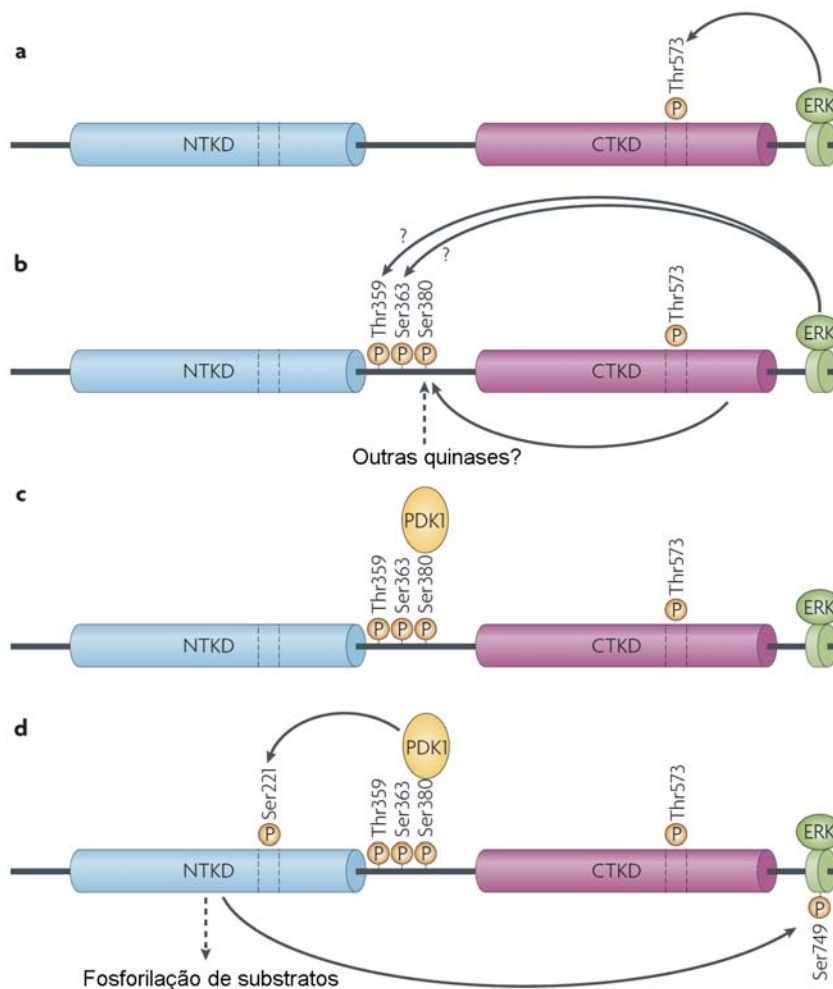
As RSKs, quando inativas, estão co-localizadas com o seu ativador, a cinase ERK, tanto no citoplasma quanto no núcleo. As RSKs podem ser ativadas no núcleo, citoplasma e membrana plasmática, e estudos mostram que, após ativação, o transporte de frações da proteína para o interior do núcleo correlaciona-se com a transcrição de diversos genes (CHEN et al. 1992). O mecanismo de transporte nuclear dessas proteínas ainda é incerto, uma vez que as RSKs não apresentam a sequência relativa ao sinal de localização nuclear NLS. A isoforma RSK3 apresenta uma sequência similar à NLS, mas não se sabe se essa sequência preserva a função (ZHAO et al. 1995).

Em relação à localização tecidual, as RSKs podem ser encontradas em todos os tecidos, com maior ou menor quantidade das isoformas, o que

sugere que elas possuam funções distintas. Em humanos, *RSK1* é expresso predominantemente no rim, pulmão e pâncreas, enquanto *RSK2* e *RSK3* são altamente expressos no músculo esquelético e cardíaco, e no pâncreas (ZENIOU et al. 2002). *RSK4*, por sua vez, possui baixa expressão em quase todos os tecidos e pode estar envolvida com sinalização independente de fator de crescimento (DUMMLER et al. 2005).

As RSKs são ativadas diretamente pelas ERKs em resposta a fatores de crescimento, hormônios, neurotransmissores, quimiocinas, entre outros (DALBY et al. 1998). A completa ativação da proteína depende de uma sequência de fosforilação e auto-fosforilações. Uma vez ativada, a cinase ERK1/2 se liga ao domínio D de RSK, promovendo a fosforilação dessa proteína no resíduo Thr573 do domínio C-terminal (Figura 7). Essa fosforilação ativa o domínio C-terminal que, por sua vez, é responsável pela autofosforilação na Ser380 do *hydrofobic motif* da região de ligação. Além disso, nessa região ocorre a fosforilação da Ser363 e Thr359 por um mecanismo ainda não muito compreendido, mas que pode ser pela própria ERK1/2. A região *hydrofobic motif* fosforilada fornece um sítio de ligação para a cinase PDK1 que, uma vez ligada, irá fosforilar e ativar o domínio N-terminal. Apesar da fosforilação de PDK1 por PI3K ser necessária para a ativação de AKT, esse processo não é necessário para que PDK1 ative RSK. Acredita-se que a própria região de ligação de PDK1 em RSK (conhecida como fragmento de interação com PDK1 – PIF) seja responsável por recrutar e também ativar PDK1 (FRODIN et al. 2000). O domínio N-terminal ativado é responsável pela fosforilação dos alvos de RSK, além de

uma autofosforilação no resíduo Ser749 do domínio D para a liberação de ERK1/2.



Fonte: Adaptado de ANJUM e BLENIS (2008).

Figura 7 - Ativação das RSKs. O processo de ativação de RSKs depende de uma sequência de fosforilações e auto-fosforilações, resultando na ativação do domínio N-terminal. Inicialmente, a cinase ERK se liga ao domínio D de RSK, e é responsável por fosforilar e ativar o domínio C-terminal. Uma vez ativo, esse domínio promove uma autofosforilação no *hydrofobic motif*, processo necessário para ancoragem de PDK1 em RSK. Uma vez ancorado e ativo, PDK1 fosforila e ativa o domínio N-terminal de RSK, responsável pela fosforilação dos substratos dessa proteína.

As RSKs fosforilam muitos alvos citosólicos e nucleares e estão envolvidas na regulação de diversos processos celulares relacionados à

tumorigênese, como a proliferação, sobrevivência e motilidade celular, expressão gênica e síntese de proteínas (ANJUM e BLENIS 2008). As proteínas-alvo de RSK possuem uma sequência consenso de aminoácidos (Arg-X-Arg-X-X-pSer/Thr), que também é compartilhada pelos alvos de outras cinases como AKT e S6K.

As RSKs podem controlar a expressão gênica através da fosforilação de diversos fatores transcricionais envolvidos com a progressão do ciclo celular e proliferação, como CREB-1; SRF; MAPK15; NFkB; TIF1-alpha; entre outros (ANJUM e BLENIS 2008). As RSKs também podem promover a progressão do ciclo celular através da fosforilação e inibição de CDKN1B, o qual atua como inibidor de cinases dependentes de ciclina (CDKs). As RSKs também controlam processos como a motilidade celular através da fosforilação de FLN-A, uma proteína do citoesqueleto que se associa à membrana plasmática promovendo a ligação desta com filamento de actina. Através da fosforilação de RanBP3, as RSKs também participam do processo de transporte de substâncias entre núcleo e citoplasma.

As RSKs atuam na tradução de mRNAs de várias maneiras. Através da fosforilação do cofator transcricional TIF1-alpha as RSKs aumentam biossíntese de ribossomos (ZHAO et al. 2003). As RSKs também atuam na formação do complexo de início da tradução de mRNAs, através da fosforilação e ativação de dois principais alvos: RPS6, no resíduo Ser235/236, e eIF4B, no resíduo Ser422 (SHAHBAZIAN et al. 2006). Além disso, RSKs fosforilam GSK-3 β na Ser9, inibindo a atividade cinase dessa

proteína e liberando eIF2B para o complexo de início da tradução (SUTHERLAND et al. 1993).

Outros alvos importantes de RSKs são componentes da cascata de mTOR, como TSC2 (Ser1798), o que resulta em um aumento da sinalização da via (ROUX et al. 2004). CARRIÈRE et al. (2008) demonstraram que RSK também fosforila Raptor, um componente do complexo mTORC1.

A expressão e ativação diferenciada de RSKs foram descritas em muitas doenças humanas, incluindo o câncer. As RSK1 e RSK2 são expressas em diversas variedades de tumores, incluindo mama (SMITH et al. 2005); próstata (CLARK et al. 2005); mielomas múltiplos (KANG et al. 2007); linfoma de células T (KANG et al. 2009), e melanoma (MIRMOHAMMADSADEGH et al. 2007), assim como tumores de cabeça e pescoço (KANG et al. 2010). Vários estudos realçam o papel de RSK na transformação celular e na tumorigênese. Em particular, RSK2 é essencial para a transformação celular induzida por RAS (CHO et al. 2007) ou FGFR-1 (XIAN et al. 2009) constitutivamente ativados, estimulando a proliferação celular e o crescimento independente de ancoragem. Coerente com isso, RSK1 e RSK2 foram recentemente identificadas como principais agentes de transição epitélio-mesênquima induzida por RAS/ERK1/2 (DOEHN et al. 2009). Além disso, RSK2 promove a transformação hematopoiética induzida por FGFR-3 em modelos de leucemia murina (KANG et al. 2009), e também foi descrita com um papel-chave na formação de osteosarcomas dependentes de FOS (DAVID et al. 2005).

Ao contrário do que se poderia esperar, considerando que as RSKs já

foram investigadas em muitos aspectos da tumorigênese, o papel destas proteínas em tumores cerebrais nunca foi muito bem explorado. Dados prévios do laboratório demonstraram que a expressão proteica das RSKs é bastante variável entre diferentes linhagens de glioblastoma. Enquanto a expressão proteica de RSK2 é constante entre as células diferentes, a expressão de RSK1 varia entre as linhagens, como observado na Figura 8A e B. Nenhuma linhagem apresenta expressão proteica significativa das isoformas RSK3 e RSK4 (Figura 8C). A expressão de RSK1 é também bastante variável em tumores humanos, como observado por dados anteriores do laboratório (Figura 9). Utilizando um *tissue microarray* contendo 195 amostras de astrocitomas de diversos graus, é possível observar que a expressão de RSK1 é aumentada em glioblastomas, no entanto, existe uma alta variabilidade entre os casos.

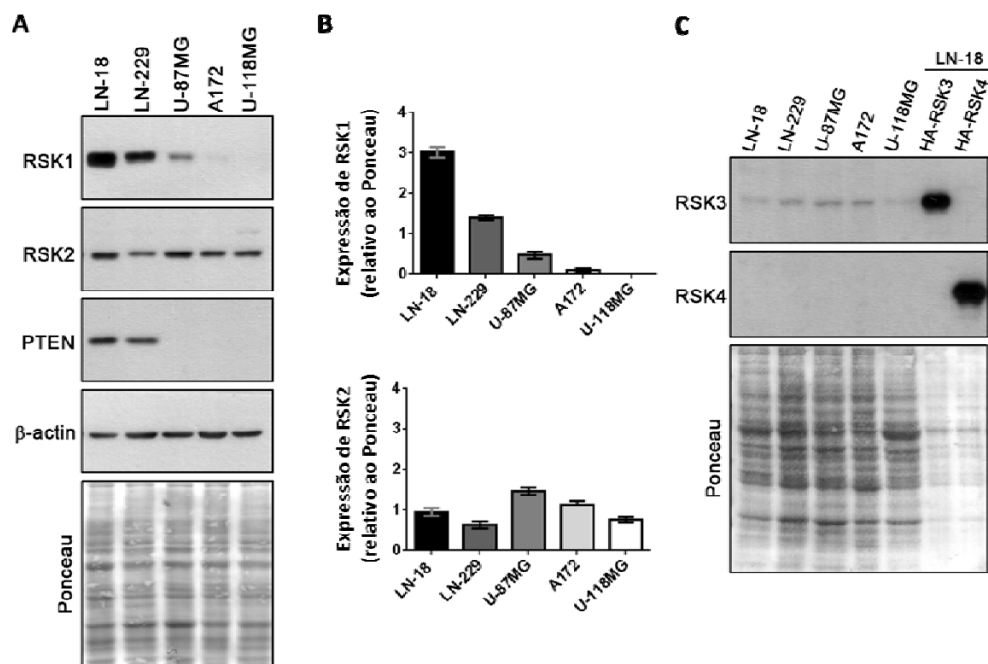
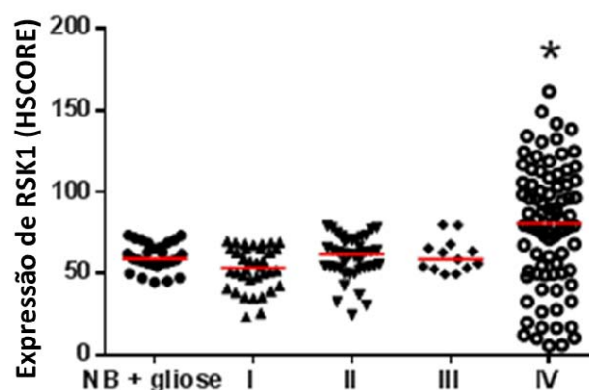


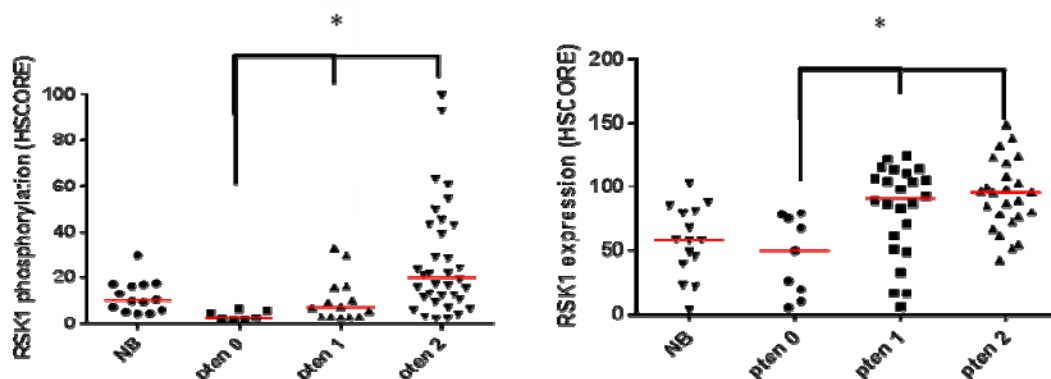
Figura 8 - Western Blotting de RSK nas diferentes linhagens de glioblastoma. **(A)** Expressão proteica de RSK1 e RSK2 e sua relação com PTEN. A β -actina foi utilizada como controle de carregamento. **(B)** Gráfico da expressão de RSK1 e RSK2 em linhagens de glioblastoma. **(C)** A expressão proteica de RSK3 e RSK4 é praticamente inexistente em todas as linhagens. HA-RSK3: controle positivo de RSK3; HA-RSK4: controle positivo de RSK4. Os gráficos são resultado da quantificação densitométrica de pelo menos 3 experimentos individuais. Realizado **previamente por pesquisadores do laboratório (Dr. Martin Roffé e Fernanda Lupinacci)**.



Fonte: MACHADO (2014).

Figura 9 - Expressão de RSK em astrocitomas. *Tissue microarrays* contendo amostras de astrocitomas de diversos graus foram submetidos a reações de imunohistoquímica contra RSK. Após a reação, a quantificação foi realizada automaticamente pelo software ScanScope e o HSCORE foi calculado. Cada caso foi marcado com um ponto e em vermelho está indicada a mediana. A diferença entre os diversos graus tumorais foi calculada através do teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas. NB: Cérebro normal (n=13); Gliose (n=16); Grau I (n=37); Grau II (n=49); Grau III (n=15); Grau IV (n=86). Grau IV estatisticamente diferente de NB+gliose, grau I e grau II, $p < 0,05$.

Adicionalmente, foi observada uma correlação entre os níveis de RSK1 e a presença de PTEN em linhagens celulares de glioblastoma (Figura 8A), sendo que as linhagens com deleção homozigótica de PTEN, células U-87MG, A172 e U-118MG, apresentaram menores níveis de RSK1, e as linhagens com PTEN selvagem, células LN-18 e LN-229, apresentaram maiores níveis de RSK1. Essa correlação foi observada também pelo nosso grupo em tumores humanos através de imunohistoquímica. Tumores com maior expressão proteica de PTEN apresentam maior ativação e expressão proteica de RSK1, enquanto tumores com menor expressão de PTEN apresentam menor expressão e ativação de RSK1 (Figura 10).



Fonte: MACHADO (2014).

Figura 10 - Correlação da fosforilação e expressão de RSK1 e PTEN em casos Grau IV. *Tissue microarrays* contendo amostras de astrocitomas de grau IV foram submetidos a reações de imunohistoquímica contra P(Ser380)-RSK1, RSK1 e PTEN. Após a reação, a quantificação foi realizada automaticamente pelo software ScanScope e o HSCORE foi calculado para a fosforilação e expressão de RSK1. A expressão de PTEN foi estimada manualmente utilizando uma escala de intensidade onde 2 representa marcação de células tumorais semelhante à observada no endotélio adjacente, 1 representa marcação de células tumorais mais fraca que o endotélio adjacente e 0 representa ausência total de marcação. Cada caso foi marcado com um ponto e em vermelho está indicada a mediana. A diferença entre os diversos graus tumorais foi calculada através do teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas, $p < 0,05$. NB: cérebro normal.

Uma vez que a via de RAS/ERK é comumente alterada em glioblastomas, a proteína RSK representa um potencial alvo terapêutico para glioblastomas, sendo que atualmente existem diversas drogas que podem ser utilizadas para inibir essa proteína. A primeira droga descrita, SL0101 (SMITH et al. 2007), foi purificada de extratos da planta *Forsteronia refracta*, da família Apocynaceae e é um inibidor reversível que atua através da ligação à região de interação com o ATP no domínio N-terminal. Outra droga ATP competitiva conhecida como BI-D1870 foi desenvolvida por SAPKOTA et al. (2007) e também atua na porção N-terminal. O inibidor mais recentemente descrito é o FMK, cuja ação é irreversível e ocorre através de

ligação covalente com o domínio C-terminal (COHEN et al. 2005). Esses inibidores têm sido comumente utilizados em estudos, no entanto existe grande contradição na literatura quanto à especificidade destes inibidores. Acredita-se que essa variabilidade seja devido a efeitos inespecíficos sobre a via de mTOR (ROFFÉ et al. 2015).

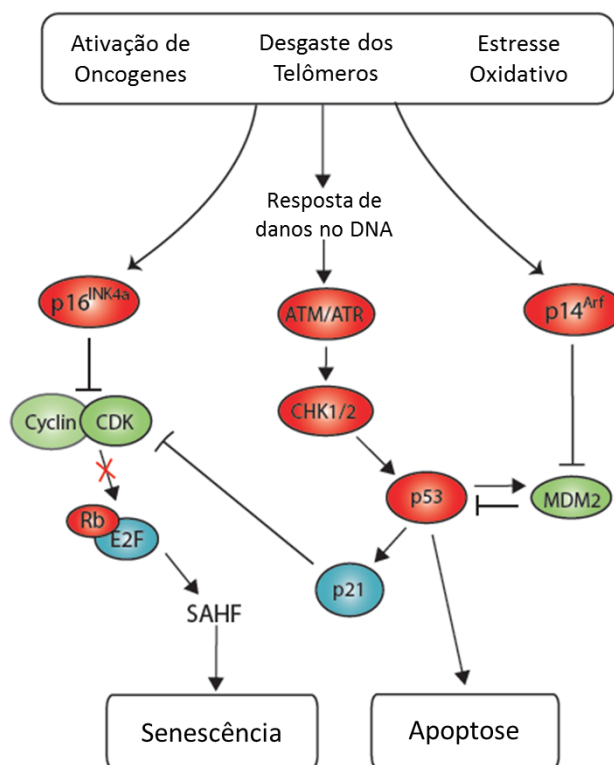
1.5 SENESCÊNCIA CELULAR INDUZIDA PELA PERDA DE PTEN

A proteína RSK está envolvida com diversos processos celulares, muitos deles culminando com a tumorigênese. Além dos processos já descritos, foi cogitado pelo nosso grupo o envolvimento dessa proteína no processo de senescência celular induzida pela perda de PTEN (PICS), uma vez que foi observada uma relação interessante entre RSK1 e PTEN, tanto em linhagens celulares quanto em glioblastomas humanos.

O processo de senescência celular pode ser definido como a inibição irreversível da proliferação celular (HAYFLICK e MOORHEAD 1965). Esse processo é considerado oposto à transformação neoplásica, sendo, no entanto, ambos os efeitos ativados por vias similares, as vias de estímulo ao crescimento e proliferação celular (BLAGOSKLONNY e HALL 2009). Pode-se considerar que o processo de senescência possui duas etapas - parada do ciclo celular e geroconversão.

A primeira etapa, ou parada do ciclo celular, é responsável por iniciar em o processo de quiescência celular, o qual é considerado um processo reversível. Essa etapa possui como componentes centrais as vias dos

supressores de tumor p53 e da proteína RB (BEN-PORATH e WEINBERG 2005). Múltiplos sinais de estresse celular podem ativar p53, como desgaste dos telômeros, estresse oxidativo e ativação de oncogenes (Figura 11) (LANIGAN et al. 2011). As cinases ATM, ATR e CHEK1/2 podem ativar p53 em resposta a danos no DNA. Além disso, p53 também pode ser ativado pela proteína ARF, que se liga à proteína MDM2 e previne a degradação de p53 por ubiquitinação. A estabilização e acúmulo de p53 permite a ativação de genes como *CDKN1A*, também conhecido como p21, o que induzirá a senescência celular ou a apoptose, dependendo do contexto celular. p21 é uma proteína inibidora de cinases dependentes de ciclina, que age através da ligação e consequente inibição da atividade de diversas enzimas CDKs essenciais para a progressão do ciclo celular (XIONG et al. 1993). Outro inibidor de cinases dependentes de ciclinas envolvido com o processo de senescência celular é o supressor de tumor *CDKN2A*, também conhecido como p16-INK4, o qual é superexpresso em condições de estresse celular. Tanto p16-INK4a quanto p21 agem prevenindo a fosforilação e inativação da proteína RB, permitindo a associação repressiva entre RB e os ativadores transcricionais pró-proliferativos E2F, impedindo assim a progressão do ciclo celular e, consequentemente, contribuindo para o processo de senescência celular.



Fonte: Adaptado de LANIGAN et al. (2011).

Figura 11 - Mecanismos moleculares da senescência celular. Estímulos como ativação de oncogenes, desgaste dos telômeros e estresse oxidativo podem desencadear respostas que levam à senescência. Essas respostas envolvem inativação de diversas proteínas que participam do ciclo celular, como ciclinas e CDKs. Inibidores de CDKs, como p21 e INK4, também participam desse processo. Além disso, tumor-supressores, como p53 e RB são essenciais para eventos que levam à senescência celular.

A segunda etapa da senescência, ou geroconversão, é o processo de crescimento celular que ocorre sem ser sucedido pela divisão celular em células quiescentes. Esse processo é essencial para a conversão do estado reversível de quiescência em senescência irreversível (BLAGOSKLONNY 2012). Enquanto na primeira etapa, a parada do ciclo celular ocorre com a participação de inibidores proteínicos envolvidas com o ciclo celular, a geroconversão é comandada por vias de sinalização de síntese proteica e

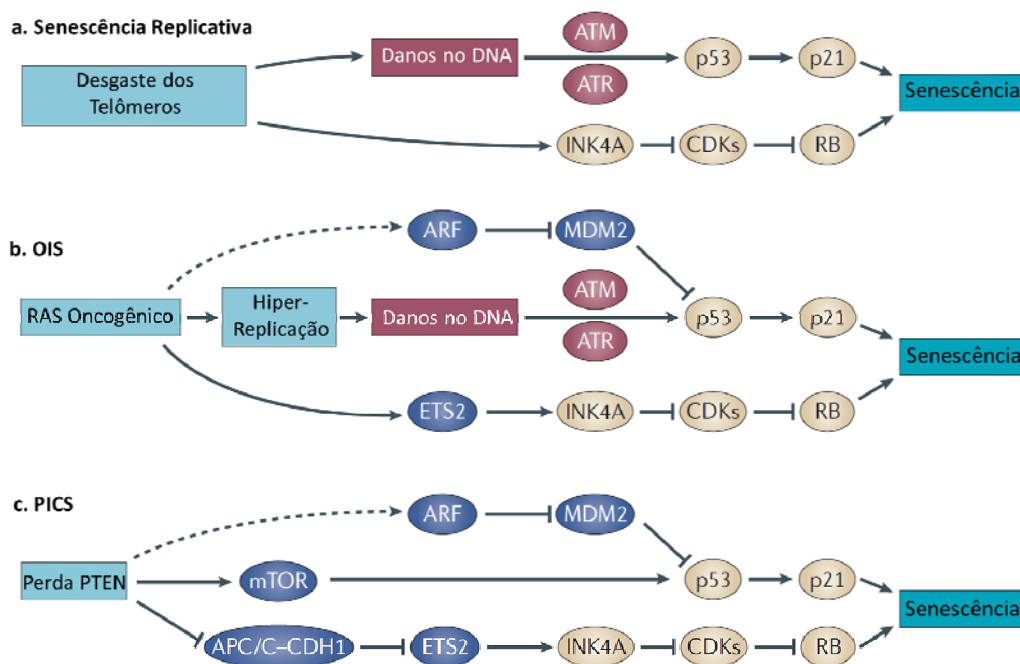
crescimento, como a via de mTOR (BLAGOSKLONNY 2014). Em condições normais, o excesso de estímulo de crescimento é percebido pela célula, a qual iniciará uma resposta de segurança que resultará na senescência celular ou na morte celular programada por apoptose, impedindo a formação tumoral. Esse mecanismo é superado pelas células neoplásicas durante a tumorigênese (COSME-BLANCO et al. 2007; CHEN et al. 2009).

Além de mTOR, outras proteínas de vias do crescimento como RAS, RAF, MEK1/2, PI3K e AKT também podem estar envolvidas com o processo de geroconversão, podendo ser considerados oncogênicas e gerogênicas, dependendo do contexto celular. Dessa maneira, o envolvimento de RSK com o processo de senescência pode ocorrer de maneira semelhante a mTOR. LEONTIEVA e BLAGOSKLONNY (2014) observaram que a via de RAS/ERK1/2 pode promover a senescência tanto por induzir a parada do ciclo celular quanto por promover a geroconversão.

Apesar das células senescentes não proliferarem, elas continuam metabolicamente ativas e comumente adquirem uma morfologia alterada, caracterizada por um formato irregular, maior tamanho e pela presença de grande quantidade de vacúolos (NISHIO et al. 2001; LI et al. 2012). A senescência celular pode ser avaliada pela atividade da enzima *senescence-associated β -galactosidase* (SA- β -Gal), uma hidrolase responsável pela hidrólise de β -galactosídeos em monossacarídeos apenas em células senescentes (DIMRI et al. 1995). Outra característica das células senescentes é a presença no núcleo de regiões de heterocromatina associadas à senescência (SAHF) e de segmentos de DNA com alterações

na cromatina que reforçam a senescência (DNA-SCARS) (FUNAYAMA e ISHIKAWA 2007; RODIER et al. 2011).

Existem diferentes tipos de senescência celular ocasionados por diferentes estímulos que ativam efetores em comum, principalmente p53 e p21 (Figura 12). A senescência celular pode ser dividida em três tipos: senescência replicativa, causada pela erosão dos telômeros (HARLEY et al. 1990); senescência induzida por oncogene (OIS) (SERRANO et al. 1997); e senescência celular induzida pela perda de PTEN (ALIMONTI et al. 2010). A senescência do tipo PICS difere dos outros tipos, pois não é derivada de hiper-replicação e de danos no DNA, sendo mediada, principalmente, por mecanismos traducionais controlados por mTOR. Além disso, ocorre a regulação positiva de p16-INK4a, através do acúmulo de ETS2 (SONG et al. 2011).



Fonte: Adaptado de NARDELLA et al. (2011).

Figura 12 - Tipos de senescência. Diferentes sinais podem induzir a senescência através de efetores em comum, como p53/p21 e RB. **(A)** Senescência replicativa, causada pela erosão dos telômeros; **(B)** Senescência causada por oncogene ou OIS; **(C)** Senescência causada pela perda de *PTEN* ou PICS, que não necessita de hiper-replicação e danos no DNA.

Uma vez que a senescência celular foi originalmente descrita *in vitro*, o processo de senescência *in vivo* ainda não é bem compreendido. Atualmente, uma série de trabalhos tem mostrado a relevância da inibição desse processo para a tumorigênese em camundongos e em humanos (CAMPISI e D'ADDA DI FAGAGNA 2007). Atualmente, a recuperação da senescência em células tumorais tem sido cogitada como possível terapia contra o câncer (NARDELLA et al. 2011).

Esse tipo de terapia sempre foi um obstáculo, principalmente pelo fato de que a senescência do tipo OIS é precedida por eventos de danos no DNA, os quais se acumulam nas células, favorecendo o tumor ao invés de

se opor a ele. Além disso, a hiper-replicação é um evento necessário para desencadear esse processo, e as células tumorais quiescentes não seriam combatidas através desse tratamento. A terapia visando à indução de senescência do tipo PICS não esbarra nesse problema, uma vez que, embora a hiper-replicação e a presença de danos no DNA potencializem seu efeito, não são necessários para induzi-lo (ALIMONTI et al. 2010).

Como mencionado anteriormente, o gene *PTEN* codifica uma fosfatase responsável pela conversão de PIP_3 em PIP_2 , inibindo a cascata de sinalização de PI3K/AKT. Uma vez que a deleção do gene que codifica a fosfatase PTEN é um evento de grande importância para a formação de diversos tumores, parece controverso que a inibição dessa proteína esteja envolvida com o processo de senescência. CHEN et al. (2009) descreveram que a perda de um alelo de *PTEN* promove a proliferação e progressão tumoral, porém, a perda homozigótica desse gene desencadeia uma resposta de senescência mediada por p53. A inibição de PTEN através da utilização de um inibidor conhecido como VO-OHPic iniciou o processo de senescência celular em células heterozigóticas para *Pten* e em modelos xenográficos de tumor de próstata com perda heterozigótica para *Pten*, causando a inibição da progressão tumoral *in vivo* (ALIMONTI et al. 2010).

Em glioblastomas, a deleção homozigótica de *PTEN* ocorre em 41% dos casos (The Cancer Genome Atlas Research Network 2012). Dessa maneira, foi levantada a possibilidade de que outros agentes necessários para a senescência estejam mutados ou tenham função prejudicada nesses tumores. De fato, linhagens celulares de glioblastoma que possuem deleção

homozigótica de *PTEN* podem apresentar deleção homozigótica de *CDKN2A*, *TP53* e *CDKN2C*, todos necessários para o processo de senescência. Interessantemente, foi observado por alunos do laboratório, que todas as linhagens de glioblastomas com deleção homozigótica de *PTEN* também possuem menor expressão proteica da proteína RSK1. Além disso, em tumores humanos foi observada uma forte correlação entre a ausência da expressão proteica de *PTEN* e de RSK1. Esse fato é interessante, uma vez que, LEONTIEVA e BLAGOSKLONNY (2014) já descreveram que, dependendo do contexto celular, a via de sinalização de RAS/ERK1/2 pode induzir o processo de senescência celular. No entanto, o envolvimento direto de RSKs nesse processo nunca foi avaliado.

1.6 A UTILIZAÇÃO DO SISTEMA CRISPR/CAS9 EM ESTUDOS

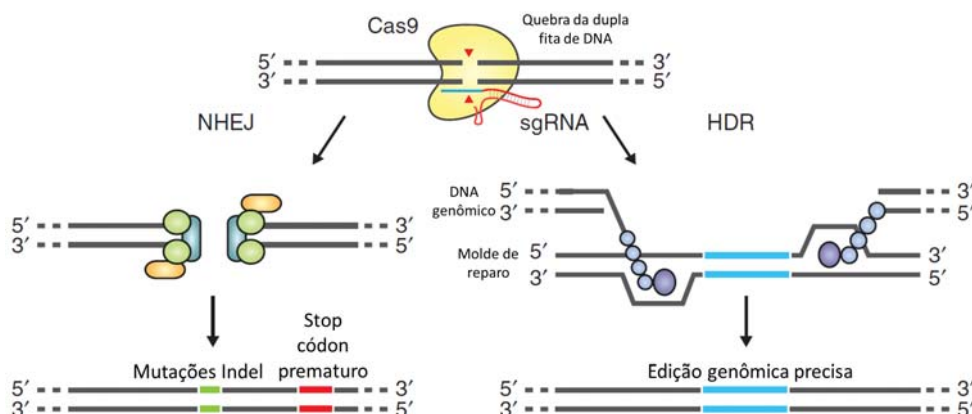
A capacidade de promover o silenciamento gênico em sistemas biológicos é uma importante ferramenta de pesquisa, com alto potencial de aplicação em diversas áreas da saúde. Técnicas de depleção, como o silenciamento por RNA de interferência (RNAi) ou, até mesmo, a inibição farmacológica de proteínas e vias de sinalização geram um efeito de curta duração. Para análises de silenciamento de longa duração é possível a realização de edição genômica do tipo nocaute. Existem diversas técnicas de edição genômica que promovem uma quebra na dupla fita de DNA com a utilização de endonucleases, como as *zinc-finger nucleases* (ZFN) (URNOV

et al. 2010), as *transcription activator-like effector nucleases* (TALENs) (MILLER et al. 2011) e o sistema CRISPR/Cas9.

O sistema CRISPR/Cas9 é o método mais recente descrito, sendo considerado mais eficiente e de realização mais simples que as técnicas anteriormente citadas (RAN et al. 2013). Esse sistema é parte do sistema imune inato de bactérias, sendo formado por uma região de sequências repetidas de DNA, a qual é conhecida como *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* ou CRISPR (DEVEAU et al. 2010), e por uma endonuclease denominada Cas9.

O sistema CRISPR/Cas9 de bactérias foi adaptado para utilização em laboratório com o intuito de promover em células o silenciamento de genes de interesse (Figura 13). A edição genômica ocorre através da ação da endonuclease Cas9 guiada por uma sequência de RNA complementar ao gene de interesse. Os componentes necessários para a realização dessa técnica podem ser inseridos na célula através de uma transfecção com plasmídeos. Após a Cas9 realizar a dupla quebra do DNA de interesse de maneira eficiente, ocorrerá a ativação do sistema de reparo natural da célula eucariótica, conhecido como junção de extremidade não-homóloga (NHEJ), o que eventualmente irá promover a adição ou deleção de bases nitrogenadas, ocasionando uma mudança na fase de leitura da proteína ou criando um código de parada prematuro (RAN et al. 2013). Essa técnica também pode ser utilizada para promover a inserção de mutações de uma maneira controlada. Nesse caso, o sistema de reparo mobilizado é o reparo dirigido por homologia (HDR), no qual é necessária a inserção de um

oligonucleotídeo contendo a sequência de interesse e extremidades complementares às bordas do DNA genômico clivado pela Cas9, conhecido como molde de reparo (CONG et al. 2013).



Fonte: Adaptado de RAN et al. (2013).

Figura 13 - Técnica de CRISPR/Cas9. Após a quebra da dupla fita de DNA, causada pela endonuclease Cas9, dois sistemas de reparo de DNA podem ser mobilizados, o sistema NEHJ de junção de extremidade não-homologas, ou o sistema HDR de reparo dirigido por homologia. O reparo do DNA eventualmente levará à inserções ou deleções de bases, o que poderá causar mudança no código de leitura ou códigos de parada prematuro, levando à perda da função da proteína. A ativação do sistema HDR é mais utilizada para edições genômicas precisas.

Neste trabalho, foi realizado o nocaute de RSK1 e RSK2 em células de glioblastoma, através da utilização da técnica de CRISPR/Cas9. Essas células foram essenciais para realização de análises que proporcionaram um melhor entendimento da ação das RSKs nesse tipo tumoral. Além disso, a utilização dessas células não se restringe apenas a este trabalho, ficando disponíveis ao grupo para a realização de estudos posteriores e novas investigações.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o envolvimento da proteína RSK em glioblastoma.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Avaliar regulação da expressão da proteína RSK1 - 4 em glioblastoma;
- 2 Padronizar inibidores químicos de RSK em linhagens de glioblastoma;
- 3 Verificar em linhagens de células não transformadas, com o uso de VO-OHpic (inibidor químico de PTEN), se o RSK1 está relacionado à senescência celular induzida pela perda de PTEN;
- 4 Observar em linhagens de células não transformadas, através da inibição de RSK1, se o RSK1 é necessário para promoção de senescência celular;
- 5 Obter linhagens de glioblastoma nocaute para RSK e caracterizá-las molecular e funcionalmente.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CULTURA CELULAR

Para estudos de senescência foi necessária a utilização de uma linhagem celular não transformada, uma vez que células tumorais perdem a capacidade de iniciar esse processo. Dessa maneira, as células não transformadas de mama da linhagem MCF10A (ATCC® CRL-10317™) foram mantidas em meio DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific) acrescido de 5% de soro de cavalo (Thermo Fisher Scientific), 20ng/ml EGF (Sigma Aldrich), 100ng/ml toxina colérica (Sigma Aldrich), 0.01mg/ml insulina (Sigma Aldrich) e 500ng/ml hidrocortisona (Sigma Aldrich) (NEVE et al. 2009). Uma vez que glioblastomas possuem diferentes alterações moleculares, foram utilizadas 5 linhagens celulares de glioblastoma com perfil de alterações diferentes. As linhagens LN-18 (ATCC® CRL-2610™), LN-229 (ATCC® CRL-2611™), U-87MG (ATCC® HTB-14™), U-118MG (ATCC® HTB-15™) e A172 (ATCC® CRL-1620™) foram mantidas em meio DMEM High Glucose (Thermo Fisher Scientific), acrescido de 10% de soro fetal bovino (Thermo Fisher Scientific). Os meios de cultura utilizados receberam adição de 40µg/ml de Garamicina (Hipolabor Farmacêutica). As células foram mantidas em estufa úmida (Thermo Fisher Scientific), a 37°C e 5% de CO₂, em garrafas de cultura celular da marca Corning de 25cm², 75cm² ou 162cm². As células foram repicadas sempre que a confluência ultrapassou os 80%, e

para isso foi usado PBS [NaCl (Merck) 0,14M; KCl (Merck) 0,27mM; Na₂HPO₄ (Merck) 10mM; KH₂PO₄ (Merck) 0,2mM] ou PBS + EDTA (Invitrogen) 0,38mM para lavar as células, e tripsina 0,2% para soltar as células da garrafa. Para a realização dos experimentos, as células foram semeadas em placas Corning de 35mm na densidade de 100.000 cel/placa, em placas de 60mm na densidade de 150.000 cel/placa ou em placas de 96 micropoços na densidade de 3.000 cel/micropoço. Quando necessário, as células foram carenciadas, ou seja, foram cultivadas em meio sem adição de soro fetal bovino.

3.1.1 Tratamentos Celulares com Inibidores

Todas as drogas utilizadas foram diluídas em DMSO (Sigma Aldrich). Células LN-18 foram plaqueadas em placas 60mm e carenciadas por 48h. Após esse período, as células foram pré-tratadas com diferentes concentrações do inibidor FMK (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M) (Axon Medchem), ou com BI-D1870 (1 μ M e 10 μ M) (Enzo), por 30min, 45min, 90min ou 150min e, em seguida, foram tratadas com PMA (Sigma Aldrich) por 15min.

Para promover a senescência induzida pela perda de PTEN, foi utilizado o inibidor de PTEN, VO-OHpic (Sigma Aldrich), na concentração de 2 μ M por 24h, 48h e 72h nas células MCF10A em placas de 35mm. As células-controle foram tratadas com veículo (DMSO) pelo mesmo período de tempo. Células MCF10A também foram pré-tratadas com os inibidores FMK (10 μ M), BI-D1870 (10 μ M), SL0101 (50 μ M), Rapamicina (100nM) (Sigma

Aldrich) e U0126 (10 μ M) (Sigma Aldrich) por 30min, em seguida, foram tratadas com VO-OHpic (2 μ M) por 48h.

3.1.2 Depleção Utilizando siRNA

Células MCF10A em placas de 35mm foram transfectadas com 4,5 μ l de Lipofectamina® (Thermo Fisher Scientific), de acordo com instruções do fabricante. Foi utilizado um total 200pmol de siRNA para RSK1 mais 200pmol de siRNA para RSK2 (Thermo Fisher Scientific) (Quadro 1), ou a quantidade equivalente de oligonucleotídeos controle (scrambled) em um volume final de 1,5ml de meio Opti-MEM® (Thermo Fisher Scientific). Após 6h, o meio foi trocado pelo meio de crescimento utilizado pela célula. Após 24h adicionais, as células foram lisadas e as proteínas foram utilizadas para Western Blotting das proteínas RSK1, RSK2, p21 e ERK1/2.

Quadro 1 - Sequências dos siRNAs para RSK1 e RSK2

Set a	Sequência (5' - 3')	Quantidade (pmol)
siRSK1_1496	GCUGUCAAGGUCAUUGAUA	200
siRSK2_1112	GCAUUCACCUAGUGCUAA	200
scrambledRSK1_1496	GCUAACUGGUACGUGUAUA	200
scrambledRSK2_1112	GCACCCAUCGAGUCUUUAA	200

Set b	Sequência (5' - 3')	Quantidade (pmol)
siRSK1_1819	CCUGCGCAUCUGUGACUUU	100
siRSK1_1965	GCAUUCUGCUGUACACCAU	100
siRSK2_105	GGAGGAGAUUAACCCACAA	100
siRSK2_1855	GCAAUUGGUCCUGAUGAUA	100
scrambledRSK1_1819	CCUUACGUGUCCAGCGUUU	100
scrambledRSK1_1965	GCAUCCGGUUAUACCUUCAU	100
scrambledRSK2_105	GGAUAGACAAUACCGGCAA	100
scrambledRSK2_1855	GCAGUUGCCGUUAGAAAUA	100

3.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

As células foram lisadas com tampão de lise [Tris (Invitrogen) pH 8,0 50mM; NaCl 150mM; EDTA 1mM; NP40 (Sigma Aldrich) 1%; deoxicolato de sódio (Sigma Aldrich) 0,5%; Inibidor de fosfatase (Thermo Fisher Scientific) 10%; Inibidor de protease (Roche) 10%]. Os lisados foram centrifugados a 14.000rpm por 15min em centrífuga 5427R (Eppendorf) e o sobrenadante transferido para novos microtubos de 1,7ml (Corning). As amostras foram quantificadas pelo método de Bradford (Bio-Rad) em uma placa de 96 micropoços, utilizando a albumina sérica bovina (BSA) como padrão (Sigma Aldrich). A absorbância das amostras foi lida em comprimento de onda de 595nm no leitor de microplaca iMarkTM (Bio-Rad). Ao final, foi adicionado tampão redutor às amostras [Tris-HCL pH 6.9 62,5mM; SDS (Merck) 2,5%; Glicerol (Merck) 8,7%; EDTA 0,5mM; β -mercaptoetanol (Merck) 2,5%; traços de azul de bromofenol (Merck)].

3.3 WESTERN BLOTTING

As amostras foram fracionadas por eletroforese em gel SDS-PAGE utilizando fonte PowerPacTM HC High-Current Power Supply (Bio-Rad) com voltagem controlada (65V por 20min e 125V por aproximadamente 90min), utilizando tampão de corrida [Tris 25mM, Glicina (Sigma Aldrich) 191mM, SDS 0,1%]. A porcentagem do gel de poli-acrilamida variou de 7% a 14% dependendo da proteína a ser analisada. Para localização da proteína no gel

foi utilizado um marcador de peso molecular (Bio-Rad). Após a corrida foi feita a transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose 0,45µm (GE Healthcare), utilizando voltagem controlada (100V por 1h) e tampão de transferência [Tris 25mM, Glicina 191mM, SDS 0,1%; Metanol (Sigma Aldrich) 20%].

Após a transferência, a membrana foi bloqueada por 1h com 5% de leite em pó desnatado diluído em TBS-T [NaCl 150mM; Tris 50mM pH 7,4; Tween® (Sigma Aldrich) 0,1%]. Foi colocado o anticorpo primário de escolha *overnight* à 4°C diluídos em solução 5% BSA em TBS-T (Quadro 2). As membranas foram lavadas com TBS-T e foi colocado o anticorpo secundário acoplado à peroxidase [anti-Mouse (GE Healthcare); anti-Rabbit (GE Healthcare)] por 1 hora à temperatura ambiente na diluição de 1:2500 na solução de bloqueio. A membrana foi novamente lavada em TBS-T e revelada com kit de quimioluminescência (Thermo Fisher Scientific) em filme fotográfico (GE Healthcare).

A quantificação densitométrica dos filmes foi realizada pelo *software* ImageJ, e os gráficos gerados expressam a quantidade de proteína relativizada por um controle de carregamento.

Quadro 2 - Anticorpos utilizados para Western Blotting

Proteína	Marca	Catálogo	Diluição	Secundário
P(Ser380)RSK1	Cell Signaling	9341	1:1000	Rabbit
RSK1	Santa Cruz	sc-231	1:1000	Rabbit
RSK2	Novus Biologicals	NBP1-85552	1:1000	Rabbit
RSK3	Santa Cruz	sc-1431	1:500	Goat
RSK4	Santa Cruz	sc-100424	1:500	Mouse
P(Thr202/Y204)ERK1/2	Cell Signaling	#9101	1:1000	Rabbit
ERK1/2	Cell Signaling	#9102	1:2000	Rabbit
P(Ser1798)TSC2	Santa Cruz	sc-293149	1:500	Mouse
TSC2	Santa Cruz	sc-893	1:1000	Rabbit
P(Thr308)AKT	Cell Signaling	#2965	1:1000	Rabbit
P(Ser473)AKT	Cell Signaling	#9271S	1:1000	Rabbit
AKT	Cell Signaling	#9272	1:1000	Rabbit
P(Ser235/236)RPS6	Cell Signaling	#4856	1:1000	Rabbit
RPS6	Santa Cruz	sc-74459	1:2000	Mouse
P(Thr389)S6K	Cell Signaling	#9234	1:1000	Rabbit
S6K	Cell Signaling	#2708	1:1000	Rabbit
PTEN	Cell Signaling	#9188	1:1000	Rabbit
P21	Cell Signaling	#2947	1:1000	Rabbit
β -actina	Sigma Aldrich	A5441	1:5000	Mouse

3.4 EXTRAÇÃO DE RNA COM TRIZOL®

Placas de 60mm com as diferentes linhagens de glioblastoma foram carenciadas por 2 dias. Foram adicionados 500 μ l de TRIzol® (Thermo Fisher Scientific) por placa, e as amostras foram colocadas em microtubo de 1,7ml para homogeneização através da inversão do microtubo várias vezes. O material insolúvel resultante da homogeneização foi retirado por centrifugação a 12.000g por 10min a 4°C. Essa solução foi coletada e transferida para novo microtubo de 1,7mL e incubada durante cinco minutos à temperatura ambiente para permitir a completa dissociação dos complexos núcleo-proteicos. Após esse período, foi acrescentado clorofórmio (Merck) na quantidade de 0,2mL por mL de TRIzol® utilizado, homogeneizando

vigorosamente e incubando novamente, desta vez, por 3min à temperatura ambiente. Após essa segunda incubação o material foi centrifugado a 12.000g por 15min a 4°C.

Para a precipitação do RNA, a fase aquosa formada foi separada em um novo microtubo contendo 0,5ml de isopropanol (Sigma Aldrich) por mL de TRIzol® e incubada por 10min à temperatura ambiente. Após esse período, o material foi novamente centrifugado a 12.000g por 10min a 4°C. O RNA sedimentado foi lavado com 1mL de etanol (Sigma Aldrich) 75% gelado por mL de TRIzol® utilizado inicialmente e centrifugado a 7.500g por 5min a 4°C. O sobrenadante foi removido cuidadosamente e, após a retirada do excesso de líquido do fundo do tubo, o pellet foi seco à temperatura ambiente durante cerca de 30min. O RNA total foi dissolvido em água ultrapura (Sigma Aldrich), e armazenado a -80°C. O RNA foi quantificado pela absorbância de 260nm usando espectrofotômetro NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific), com fator de correção próprio para o RNA (40). Foi também determinada a razão entre as medidas espectrofotométricas A260/A280 e A260/A230nm (razão entre a quantidade de RNA e contaminantes, aceitável quando as duas razões forem maiores que 1.8, o que fornece uma estimativa da qualidade da extração).

3.5 TRATAMENTO DO RNA COM DNASE

Conforme as instruções do protocolo DNase I - Amplification Grade (Thermo Fisher Scientific), 1µg do RNA total destinado à reação de transcrição reversa foi transferido para microtubo estéril, onde foram acrescentados 1,5µL de tampão DNase, 1µL da enzima DNase I e água ultrapura na quantidade suficiente para completar 15µL de solução. Essa solução permaneceu à temperatura ambiente durante 15min e, em seguida, foi acrescida de 1µL de EDTA (25mM) e incubada a 65°C por 10min.

3.6 REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT)

A transcrição reversa do RNA total obtido foi realizada seguindo recomendações do protocolo SuperScript® III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific). Foi adicionado 1,6µl de *Random Primers* (50ng/µl) a todo o volume da reação anterior, além de 1,6µl de dNTP (10mM) e 1,6µl de oligo(dT)20 (50µM). Essa reação ficou por 5min a 65°C e, em seguida, foram adicionados 6,4µl de tampão de transcriptase reversa (5X First-Strand Buffer), 1,6 de DTT (0,1M), 1,6µl da enzima SuperScrip® III RT (200 U/µl) e 1µl água ultrapura. Posteriormente, a mistura foi incubada a 25°C por 5min, seguido de um período de 60min a 55°C e finalmente, um período de 15min a 70°C. Ao final, a amostra foi diluída em água ultrapura até a concentração de 10ng/µl. Foi feito um *pool* de mesma concentração contendo cDNA de todas as células estudadas.

3.7 REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL (QPCR)

Foram adicionados de 2µl da reação de RT de cada amostra a uma mistura contendo 5µl de SYBR® Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific), 0,2µl de primers *foward* e *reverse* (10µM) (Quadro 3) e o volume foi completado para 10,5µl com água ultrapura. A placa foi lida em Termociclador 7500 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific). Foram feitas duplicatas experimentais e biológicas para cada linhagem.

Para análise dos dados, foram obtidos, para cada amostra e gene, os valores de Ct em log2 (o ciclo em que o sinal de fluorescência atinge a linha do *threshold*). A partir desse valor, foram obtidos o ΔCt (Ct da célula de interesse – Ct do pool) e o $\Delta\Delta Ct$ (ΔCt da célula de interesse – ΔCt de genes endógenos). O valor da expressão de mRNAs de cada amostra pôde, então, ser calculado a partir da fórmula $2^{\Delta\Delta Ct}$. Os genes endógenos utilizados foram HPRT e GAPDH.

Quadro 3 - Genes utilizados para reação de qPCR

Gene	Número de acesso	Sequência do primer (5' – 3')
RSK1	NM_002953.3	(F) GCCCTGTTCAAGCGGAATC (R) GTGGAGTAGAAGACATGCCG
RSK2	NM_004586.2	(F) TTTCAACACACAGCAAAGGACC (R) GAGCACAAGAGCAGCAGTCA
RSK3	NM_021135.4	(F) AAGCGCCATCCCTTCTTTGT (R) TGCCCACTGCTGGTTTGAA
RSK4	NM_014496.4	(F) GGGATATGATGCTGCTTGTGA (R) AAATGGAGTGTAGCCAGCCAA
GAPDH	NM_002046	(F) TGCACCACCAACTGCTTAG (R) GAGGCAGGGATGATGTTT
HPRT	NM_000194.2	(F) TCATTATGCTGAGGATTTGGAAAG (R) GGCCTCCCATCTCCTTCATC

F: Primer forward - R: Primer reverse

3.8 OBTENÇÃO DE UMA LINHAGEM DE GLIOBLASTOMA NOCAUTE PARA RSK UTILIZANDO A METODOLOGIA CRISPR/CAS9

3.8.1 Confecção do Plasmídeo

Para a realização dessa técnica, foi adquirido o plasmídeo *pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0* (Addgene ID: 62988), o qual contém a endonuclease Cas9 e genes de resistência a puromicina e ampicilina (Figura 14). Para guiar a endonuclease Cas9 ao sítio de interesse no genoma da célula são necessários RNAs guias (sgRNA), que são inseridos no plasmídeo original. Para isso, foram desenhados oligonucleotídeos de DNA que codificam os sgRNAs através de uma ferramenta disponível na Internet (<http://tools.genome-engineering.org>), os quais foram inseridos no plasmídeo após corte com enzima de restrição BbsI (Thermo Fisher Scientific). Essa sequência guia permite que a endonuclease Cas9 clive o gene alvo iniciando um processo de reparo de DNA do tipo NHEJ.

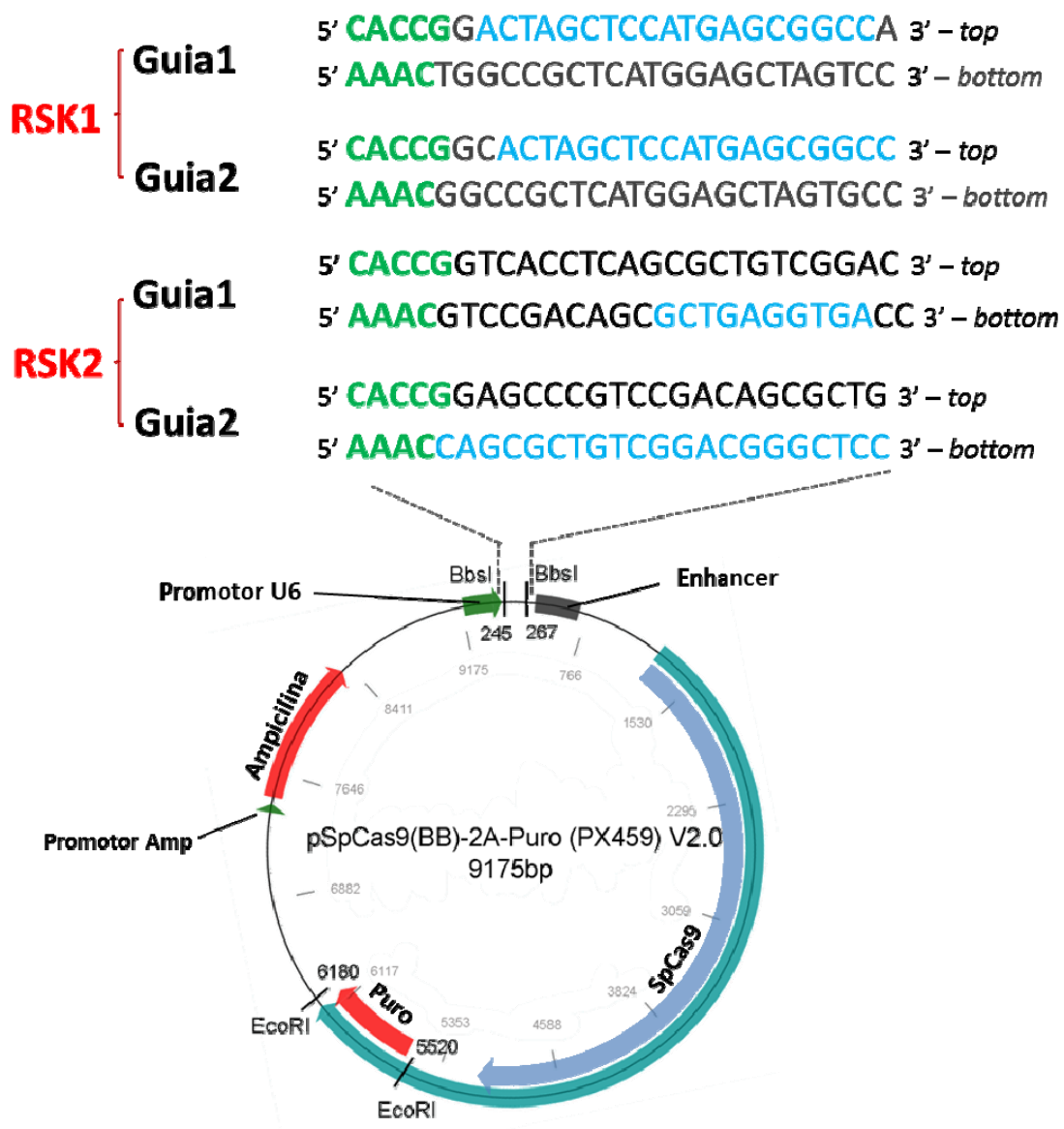


Figura 14 - Esquema ilustrando o plasmídeo obtido (*pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0*). Estão indicados os principais genes e os locais de corte das enzimas de restrição EcoRI (5520-6180) e BbsI (245-267). As sequências *top* e *bottom* foram aneladas e os oligonucleotídeos dupla fita foram inseridos no local indicado após digestão do plasmídeo com BbsI. Nas guias, os nucleotídeos em azul estão indicando a sequência complementar ao DNA de interesse, e em verde a sequência necessária para inserção no sítio específico. Promotor Amp: promotor reconhecido por procariotos; Promotor U6: promotor reconhecido por eucariotos; Enhancer: acentuador; SpCas9: gene que codifica a enzima Cas9; Puro: gene que confere resistência à puromicina; Ampicilina: gene que confere resistência à ampicilina.

Etapa 1: Preparo das guias

Foram feitas duas guias para cada isoforma: RSK1 guia 1, RSK1 guia 2, RSK2 guia 1, RSK2 guia 2, cujas sequências podem ser observadas na Figura 14. Todas as guias têm como alvo a porção N-terminal de RSK1/2, com exceção de RSK2 guia 1, cujo alvo é a porção C-terminal da proteína.

A primeira etapa da construção visa ao preparo dos oligonucleotídeos que codificam as guias para inserção no plasmídeo. Foi feito o anelamento entre dois oligonucleotídeos complementares (*top* + *bottom*) para a formação de uma sequência dupla-fita, que foi a seguir fosforilada pela enzima *T4 polynucleotide kinase* (Thermo Fisher Scientific). Para isso, foi adicionado 1µl do oligonucleotídeo *top* (100µM) e 1µl do oligonucleotídeo *bottom* (100µM), além de 1µl do tampão da enzima T4 10X DNA ligase (Thermo Fisher Scientific), e 1µl da enzima T4 PNK em um volume final de 10µl. A solução foi incubada a 37°C por 30min, 95°C por 5min e foi mantida a temperatura ambiente até que a etapa 2 fosse concluída. Essa solução foi diluída 1:200 em água Milli-Q® (Merck).

Etapa 2: Preparo do plasmídeo

O plasmídeo foi cortado com a enzima de restrição BbsI (245-267). Para isso, 0,8ng do DNA do plasmídeo foram adicionados a 5µl do tampão NEB 2.1 (New England Biolabs) e 1,8µl da enzima BbsI, e o volume foi completado para 50µl com água Milli-Q®. Essa solução foi incubada por 1h e 30min a 37°C. Para impedir que o plasmídeo se religue sem incorporar a guia e ocorra a formação de plasmídeos vazios resistentes à ampicilina, foi

feito um tratamento com a fosfatase alcalina CIAP (Thermo Fisher Scientific), por 30min a 37°C. Após esse passo, os plasmídeos foram purificados com o kit Gel/PCR DNA Extraction Kit (Real Genomics) e eluídos em 30µl de água Milli-Q®.

Etapa 3: Ligação dos plasmídeos com as guias

As guias foram inseridas no plasmídeo cortado no sítio específico, da seguinte maneira: 2µl de oligonucleotídeos diluídos da etapa 1 foram adicionados a 5µl de plasmídeo provenientes da etapa 2, além de 2µl de tampão T4 ligase 10X (Thermo Fisher Scientific) e 1µl da enzima T4 ligase (Thermo Fisher Scientific). O volume foi completado para 20µl com água Milli-Q® e a solução foi incubada a 25°C por 30min.

Etapa 4: Transformação de bactérias para verificação do plasmídeo

Bactérias (*E. coli*, cepa JM109) quimicamente competentes foram utilizadas para amplificação do plasmídeo. O plasmídeo contendo a guia, proveniente da etapa 3, foi colocado em 200µl de bactéria e essa solução foi submetida a um choque térmico:

- 20min em gelo;
- 2min a 42°C;
- 5min em gelo.

Foi adicionado 1ml de meio LB (1% de triptona, 0.5% de extrato de levedura, 1% de NaCl e pH 7.0), sem ampicilina e a solução foi centrifugada por 2min a 8000rpm. O sobrenadante foi descartado e as bactérias foram

plaqueadas em meio LB + ágar [com 50µg/ml de ampicilina (Affymetrix)], e ficaram *overnight* na estufa à 37°C.

Foram selecionadas duas colônias de bactérias transformadas, as quais foram capturadas e colocadas em 2ml meio LB (com 50µg/ml de ampicilina) *overnight* à 37°C no Shaker (Gemini BV) com rotação de 200rpm. Das bactérias que cresceram, foi realizada a extração do DNA plasmidial utilizando o kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante. Os plasmídeos foram cortados através de digestão com enzima de restrição, da seguinte maneira: 200ng do DNA extraído foram adicionados a 0,2µl de BSA (10mg/ml) e 0,2µl da enzima de restrição EcoRI (Thermo Fisher Scientific) ou BbsI, além de 2µl do tampão específico para cada enzima. O volume foi completado para 20µl com água Milli-Q® e a solução foi incubada a 37°C por 1h.

Após a digestão, os plasmídeos cortados e não cortados foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Esperava-se que ocorresse a perda do sítio de corte para a enzima BbsI, enquanto o corte com EcoRI deveria liberar a região que codifica a resistência para puromicina. Uma colônia foi selecionada aleatoriamente para multiplicação dos plasmídeos.

Etapas 5: Purificação do plasmídeo para transfecção de células

Foi feito um pré-inóculo com o raspado da placa de cultura de bactéria das colônias selecionadas em 2ml de meio LB (com 50µg/ml

ampicilina) e incubado a 37°C no Shaker por 6h com agitação (200rpm). Após esse período foi feito o inóculo em 100ml de LB (com 50µg/ml ampicilina) e incubado a 37°C *overnight* no Shaker com agitação (200rpm). A extração de DNA foi feita de acordo com protocolo do kit HiSpeed Plasmid Midi Kit (Qiagen).

3.8.2 Curva de Sensibilidade para Puromicina

Foram feitas curvas de puromicina nas células LN-18 para determinar a concentração ideal dessa droga para seleção das células transfectadas. A concentração ideal é aquela que promove a sobrevivência das células transfectadas, e a morte das células que não foram transfectadas. Para isso, foram semeadas placas de 6 poços (Corning) com células não transfectadas e células transfectadas com o plasmídeo vazio (sem os oligonucleotídeos das guias). Essas células foram tratadas com diferentes concentrações de puromicina (Thermo Fisher Scientific) (0,25µg/ml, 0,5µg/ml, 0,75µg/ml, 1µg/ml e 1,5µg/ml) durante 4 dias, sendo o meio trocado a cada 2 dias. Através dessa curva foi possível determinar a concentração de 1,2µg/ml para ser utilizada na seleção das células transfectadas.

3.8.3 Transfecção de Células LN-18

Foram semeadas 8 placas de 60mm de células LN-18 para transfecção com os plasmídeos confeccionados. A transfecção foi feita utilizando Lipofectamina® (5µl em 3ml de meio Opti-MEM®) e 4µg de DNA no total por placa. As seguintes condições foram feitas:

- (1.) Sem plasmídeo (controle para seleção de puromicina);
- (2.) Plasmídeo vazio (controle: vetor sem a guia - 4 μ g);
- (3.) RSK1 G1 (RSK1 guia 1 - 4 μ g);
- (4.) RSK2 G1 (RSK2 guia 1 - 4 μ g);
- (5.) RSK1 G1 (RSK1 guia 1 - 2 μ g) + RSK2 G1 (RSK2 guia 1 - 2 μ g);
- (6.) RSK1 G2 (RSK1 guia 2 - 4 μ g);
- (7.) RSK2 G2 (RSK2 guia 2 - 4 μ g);
- (8.) RSK1 G2 (RSK1 guia 2 - 2 μ g) + RSK2 G2 (RSK2 guia 2 - 2 μ g).

A transfecção foi feita por 6h, e, após esse período, o meio Opti-MEM® foi trocado pelo meio normal da célula e, 48h depois, as células foram tratadas com 1,2 μ g/ml de puromicina, durante 6 dias, e nesse intervalo de tempo, o meio com puromicina foi trocado a cada 2 dias. O tempo de tratamento foi determinado de acordo com a placa controle, sendo finalizado assim que todas as células dessa placa morressem.

3.8.4 Isolamento de Células e Obtenção de Colônias

Após a seleção com puromicina, 500 células de cada condição foram plaqueadas em uma placa de 100mm, que foi deixada em estufa 37°C até que colônias derivadas de uma única célula apresentassem mais que 30 células (aproximadamente 10 dias). Essas colônias foram então capturadas com uma pipeta e transferidas para uma placa de 24 micropoços. Assim que cada colônia atingiu 80% de confluência, foram passadas para placas cada vez maiores até atingirem quantidade suficiente para realização de um extrato de proteínas utilizado para acessar o conteúdo de RSK desses

clones. As colônias que obtiveram êxito na deleção de RSK foram utilizadas para confecção de um *pool* de clones que foram então utilizados para os experimentos.

3.8.5 Curva de Crescimento

Para a análise do crescimento das células nocaute para RSK1 e RSK2, foram semeadas placas de 35mm com 2.000 cel/placa para que ao final não houvesse confluência das células prejudicando a interpretação dos resultados. Durante seis dias consecutivos uma placa de cada condição era tratada com tripsina para que as células soltassem, e então as células foram contadas em Câmara de Neubauer (Optik Labor). A quantificação foi baseada em cinco experimentos, e em cada experimento foram semeadas duas placas de cada condição, e cada placa foi contada três vezes.

3.8.6 Análise da Proliferação Celular

Células LN-18 foram plaqueadas em placas de 96 micropoços e carenciadas por 48h. Após esse período, as células foram pré-tratadas com FMK na concentração de 10 μ M por 30min, e incubadas por 16h com EGF (50ng/ml) ou soro fetal bovino (10%). As células então foram incubadas com BrdU por 5h para que ocorresse a incorporação; e para a detecção foi utilizado o BrdU Cell Proliferation Assay Kit (Cell Signaling). A absorbância foi lida no leitor de microplaca em comprimento de onda 450nm. Foi feita a quantificação de quatro experimentos individuais, nos quais foram feitas, também, duplicatas experimentais para cada condição.

4 RESULTADOS

4.1 EXPRESSÃO DE MRNA DAS ISOFORMAS DE RSK

A primeira etapa de trabalho com as RSKs em glioblastomas foi a verificação do padrão de expressão das diferentes isoformas em linhagens celulares. Uma vez que dados prévios do laboratório demonstraram que a expressão proteica das RSKs é bastante variável (Figura 8 e 9), foi verificado se esta expressão diferencial é devida a um controle transcricional ou traducional. Para isso, foi feita a avaliação da expressão do mRNA das RSKs, através da técnica de qPCR.

Na Figura 15A estão representados os resultados de expressão de mRNAs de RSK1. Foi observado que as linhagens que possuem deleção homozigótica de PTEN (U-87MG, A172 e U-118MG) apresentaram ligeira diminuição da expressão de mRNAs de RSK1 em relação às linhagens com PTEN selvagem (LN-18 e LN-229), o que é similar ao padrão de expressão proteica de RSK1. No entanto, as outras isoformas de RSK apresentaram um perfil de expressão de mRNAs diferente do perfil de expressão proteica. A expressão de mRNAs de RSK2 é maior em células A172, em comparação com as outras linhagens (Figura 15B), o que não é observado na expressão proteica. A expressão de mRNAs de RSK3 é maior em células A172 e U-118MG em comparação com as outras linhagens (Figura 15C), e a expressão de mRNAs de RSK4 é maior em células LN-18 e U-87MG em

comparação com as outras linhagens (Figura 15D). A expressão proteica de RSK3 e 4 é praticamente inexistente.

Os resultados de expressão de mRNAs das isoformas de RSK mostraram que existe baixa correlação entre a expressão de mRNAs e proteica das RSKs nas linhagens de glioblastoma, indicando a regulação dessa proteína pode ocorrer principalmente na tradução ou através de modificações pós-traducionais.

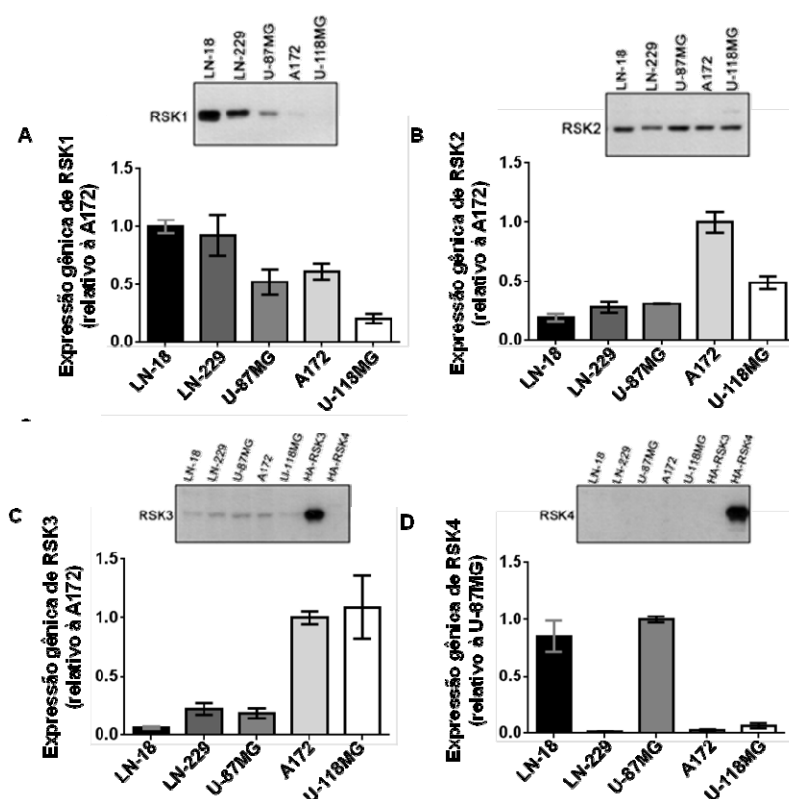


Figura 15 - Expressão de mRNA das isoformas de RSK em diferentes linhagens. (A) Expressão de mRNAs de RSK1; (B) Expressão de mRNAs de RSK2; (C) Expressão de mRNAs de RSK3; (D) Expressão de mRNAs de RSK4. Os gráficos são resultado do cálculo de 4 experimentos individuais. As imagens acima de cada gráfico são provenientes de Western Blotting para comparação da expressão de mRNAs com expressão proteica previamente realizada. Os géis de RSK3 e RSK4 possuem controles positivos.

4.2 PADRONIZAÇÃO DOS INIBIDORES BI-D1870 E SL0101

Uma parte importante desse mestrado foi realizada na tentativa de padronizar inibidores químicos de RSK. Esses resultados foram publicados em um artigo científico (Anexo 2).

Inicialmente, foram escolhidos dois inibidores amplamente utilizados na literatura para os ensaios, SL0101 e BI-D1870. No entanto, foi observado que os inibidores possuíam efeitos discrepantes. Dessa maneira, foi feita uma investigação mais detalhada dos inibidores citados, o que resultou na publicação de um artigo científico (ROFFÉ et al. 2015 - Anexo 2).

Neste artigo, primeiramente foi feita uma comparação entre os efeitos de BI-D1870 e SL0101 sobre a fosforilação de RPS6 e S6K em linhagens de glioblastoma (Figura 2 de ROFFÉ et al. 2015 - Anexo 2). Foi observado que enquanto SL0101 inibiu a fosforilação de ambas as proteínas, BI-D1870 promoveu forte ativação de S6K. Além disso, células pré-tratadas com inibidor de MEK, U0126, e tratadas com os inibidores estudados apresentaram a mesma resposta (Figura 3 de ROFFÉ et al. 2015 - Anexo 2), indicando que esse efeito dos inibidores é independente de ERK1/2 e de RSK.

Para analisar se a fosforilação de TSC2 por RSK possui efeito sobre a ativação de S6K, foi utilizado siRNA para RSK1 e 2 e as células foram tratadas com PMA para estimular a via RAS/ERK1/2 (Figura 4 de ROFFÉ et al. 2015 - Anexo 2). Foi observado que a depleção de RSK diminuiu a fosforilação de TSC2 na Ser1798, porém não afetou a fosforilação de S6K

na Thr389 e diminuiu levemente a fosforilação de RPS6 na Ser235/236. Esse dado indica que apenas a fosforilação de TSC2 na Ser1798 reflete de maneira consistente os níveis de RSK.

Os efeitos inespecíficos e opostos dos inibidores SL0101 e BI-D1870 foram confirmados em ensaios de proliferação. Para isso, células foram pré-tratadas com os inibidores estudados na presença ou ausência de rapamicina, e tratadas com EGF. As concentrações dos inibidores de RSK utilizadas foram as que inibiram RSK em proporções equivalentes; informação esta obtida através de alvos de RSK como GSK3 β ou RPS6 na presença de rapamicina (Figura 6 de ROFFÉ et al. 2015 - Anexo 2). A utilização de SL0101 inibiu a proliferação de maneira mais potente que BI-D1870 (Figura 9 de ROFFÉ et al. 2015 - Anexo 2); um efeito que pode ser considerado inespecífico. Além disso, a utilização de rapamicina potencializou o efeito de BI-D1870, no entanto não alterou o efeito de SL0101. Esse resultado aponta para a inibição não específica de mTORC1 pelo inibidor SL0101.

Juntos, esses resultados levaram à elaboração de um modelo sobre os efeitos não específicos dos inibidores estudados (Figura 10 de ROFFÉ et al. 2015 - Anexo 2). Enquanto BI-D1870 ativa S6K por mecanismos ainda não conhecidos, SL0101 inibe mTORC1 por mecanismos também desconhecidos. Esses efeitos não específicos podem levar ao mascaramento das funções de RSK, e à confusão sobre as funções dependentes de RSK ou mTORC1. Dessa maneira, as funções previamente

descritas para RSK que foram baseadas nesses inibidores devem ser reavaliadas.

4.3 INIBIDOR QUÍMICO FMK

Uma vez que os estudos iniciais de padronização de inibidores químicos para RSKs evidenciaram que os dois inibidores escolhidos, BI-D1870 e SL0101, possuem efeitos inespecíficos na via de PI3K/AKT, ficou evidenciada a necessidade da padronização de outro inibidor que pudesse ser utilizado nos experimentos.

FMK é um inibidor químico irreversível que se liga à porção C-terminal de RSK, impedindo sua autofosforilação, processo necessário para a completa ativação da proteína. Assim, analisaram-se a fosforilação de RSK no resíduo Ser380 (proveniente da autofosforilação) e a fosforilação de TSC2 no resíduo Ser1798, em concentrações crescentes de FMK em células LN-18.

Foi possível perceber a diminuição da fosforilação de RSK1 e de seu alvo, com o aumento da concentração da droga (Figura 16). Foi estabelecido que a concentração de 10 μ M é suficiente para inibição da ação de RSK1.

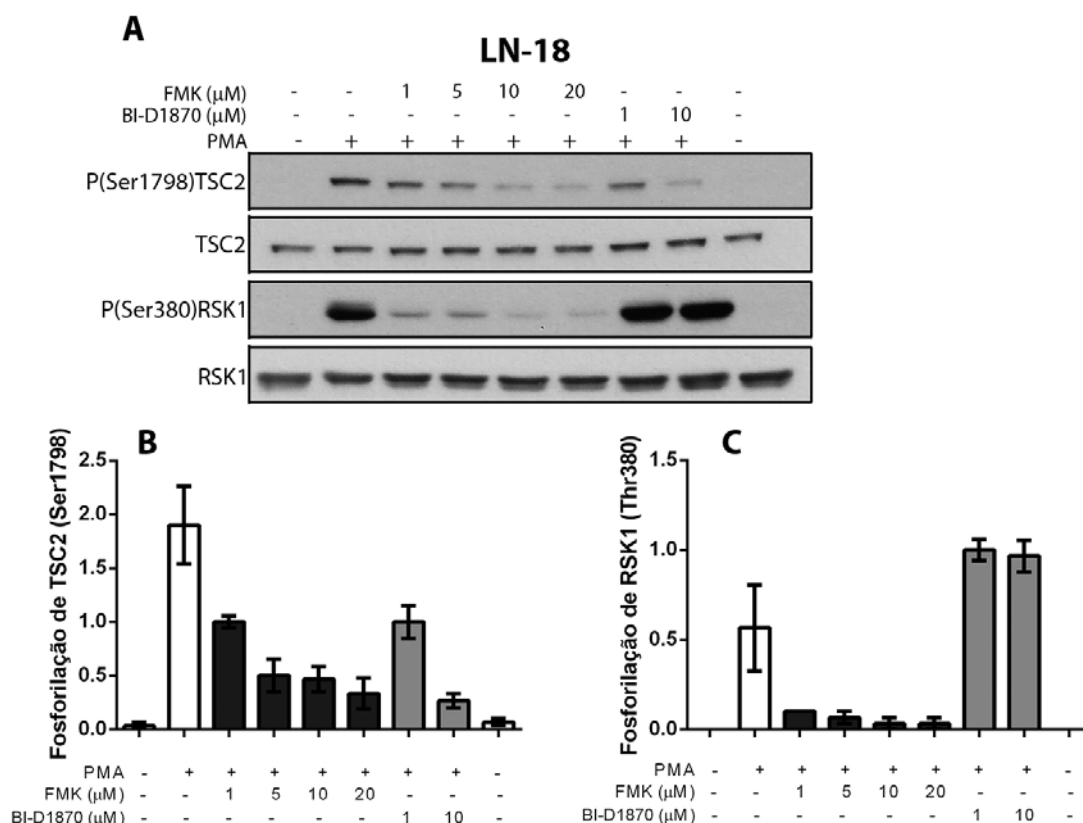


Figura 16 - Padronização do inibidor FMK. **(A)** Western Blotting de células LN-18 após pré-tratamento com FMK em diferentes concentrações (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M ou 20 μ M) por 30min e tratamento de PMA, 100ng/ml, por 15min; **(B)** Gráfico da fosforilação de TSC2 na Ser1798; **(C)** Gráfico da fosforilação de RSK1 na Thr380. Os gráficos são resultado da quantificação densitométrica de 4 experimentos individuais.

Para avaliar os efeitos de FMK na via de PI3K/AKT, foi feita uma análise da fosforilação de S6K e RPS6, utilizando-se 5 μ M ou 10 μ M do inibidor estudado em diferentes tempos de tratamento (Figura 17). Pôde-se notar que houve diminuição na fosforilação de RPS6 utilizando 10 μ M de FMK. Além disso, observamos que não houve diferença na fosforilação de S6K nesse resíduo, indicando a maior especificidade desse inibidor.

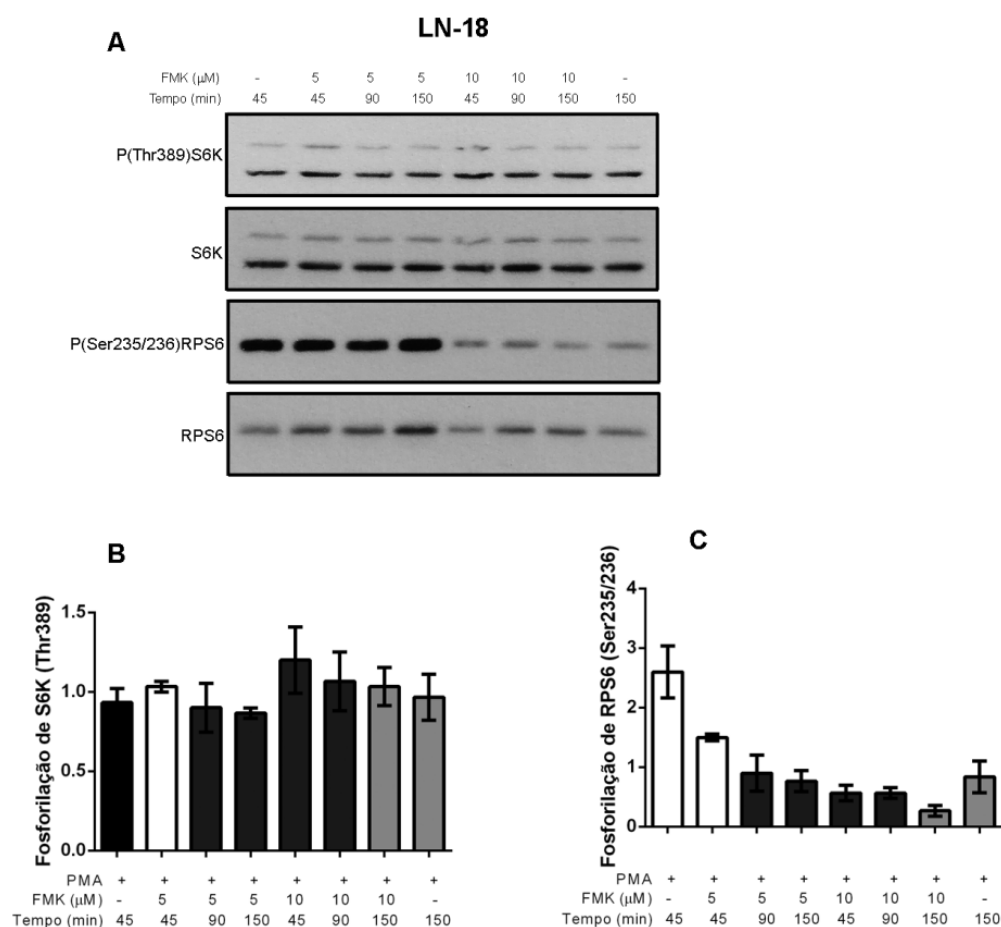


Figura 17 - Fosforilação de S6K e RPS6 utilizando FMK. (A) Western Blotting de células LN-18 após pré-tratamento com FMK em diferentes concentrações (5 μ M ou 10 μ M) por 45min, 90min ou 150min e tratamento de PMA, 100ng/ml, por 15min; (B) Gráfico da fosforilação de S6K na Thr389; (C) Gráfico da fosforilação de RPS6 na Ser235/236. Os gráficos são resultado da quantificação densitométrica de 3 experimentos individuais.

4.4 PAPEL DAS RSKS NA PROLIFERAÇÃO CELULAR

Utilizando a concentração de FMK determinada ($10\mu\text{M}$), o efeito da inibição de RSK na proliferação celular foi estudado através de ensaio de incorporação de BrdU (Figura 18). Não foi observada nenhuma diferença entre as células-controle (DMSO) e as tratadas com FMK em nenhuma condição, o que leva à conclusão de que a inibição de RSK por essa droga não é suficiente para inibir a proliferação de células de glioblastoma. Este experimento argumenta contra a participação das RSKs no controle da proliferação celular.

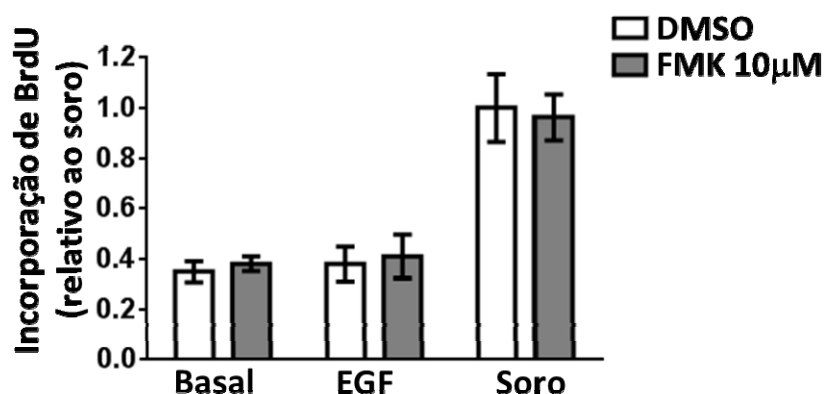


Figura 18 - O efeito do inibidor FMK na proliferação em células LN-18. Células LN-18 foram carenciadas e pré-tratadas com FMK $10\mu\text{M}$, por 30min e tratadas com EGF 50ng/ml, ou soro fetal bovino 10%, por 16h. As células foram então encubadas com BrdU por 5h e sua incorporação foi medida em leitor de microplaca no comprimento de onda 450nm. As médias são referentes a 4 experimentos individuais.

4.5 ENVOLVIMENTO DE RSK1 NA PICS

Uma vez se observou uma correlação entre níveis de RSK1 e PTEN em glioblastomas, e que o envolvimento da sinalização de RAS/ERK1/2 com o processo de senescência celular já foi previamente descrito (LEONTIEVA e BLAGOSKLONNY 2014), prosseguiu-se com a análise do envolvimento de RSK1 na senescência celular do tipo PICS.

Como células transformadas perdem a capacidade de entrar em senescência, os experimentos foram realizados em uma linhagem celular não tumoral disponível em nosso laboratório, a MCF10A (célula normal de mama). Utilizando o inibidor de PTEN, conhecido como VO-OHpic, foram realizadas curvas de tempo para analisar a expressão e atividade das proteínas RSK1, ERK1/2 e AKT e do indicador de senescência p21 (Figura 19A).

A proteína p21 é uma inibidora de cinases dependentes de ciclina, que age através da inibição da atividade de cinases dependentes de ciclina essenciais para a progressão do ciclo celular, e, portanto, é possivelmente um indicador de senescência. Inicialmente, observou-se que há um aumento de p21 ao longo do tempo de tratamento com VO-OHpic, o que não ocorre em células tratadas com veículo (DMSO), o que pode ser relacionado ao aumento de senescência di tipo PICS (Figura 19D). Além disso, observou-se claramente que a ativação de ERK1/2 e de RSK1 acompanha a expressão de p21, indicando que RSK1 pode estar envolvida com esse processo de senescência (Figura 19B e C). Ou seja, em células não tumorais, a perda da

função de PTEN - através do inibidor - induz à expressão de RSK1. Também se nota um aumento da ativação de AKT no início do tratamento com VO-OHpic, às 24h, como já esperado, uma vez que o PTEN atua como regulador negativo da via do PI3K/AKT. No entanto, essa ativação diminui ao longo do tempo, enquanto ocorre o aumento de p21 (Figura 19E).

Com o intuito de observar se a ausência de RSK1 é capaz de diminuir os níveis de p21 após inibição de PTEN foram feitos dois experimentos de depleção de RSK em células MCF-10A, utilizando inibidores químicos (Figura 20A e B) ou siRNA (Figura 20C). O inibidor de mTORC1, Rapamicina, diminuiu os níveis de p21 tanto na presença quanto na ausência de VO-OHpic. Além disso, de maneira muito interessante, os inibidores químicos FMK e U0126 diminuíram os níveis de p21 apenas após a inibição de PTEN, o que pode indicar o envolvimento de RSK com esse tipo específico de senescência. Os inibidores BI-D1798 e SL0101 tiveram efeitos opostos, o que já era esperado uma vez que esse inibidores atuam inespecificamente sobre a via de mTOR de maneira antagônica. Já o siRNA diminuiu consideravelmente os níveis de p21 mesmo que a depleção de RSK1/2 causada não tenha sido completa. Esses resultados indicam que RSK pode estar envolvida com o processo de senescência celular induzida pela perda de PTEN.

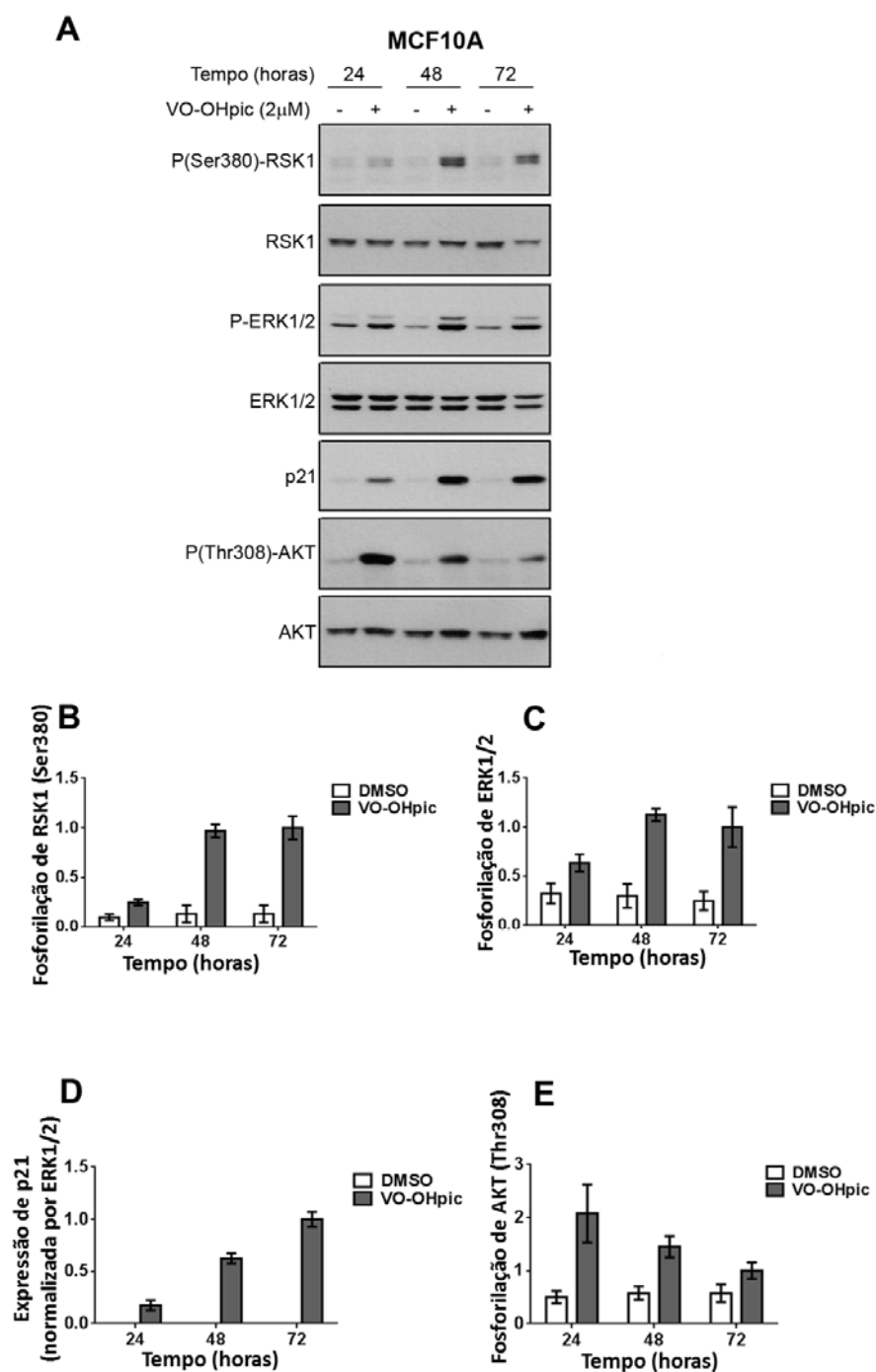


Figura 19 - Tratamento de MCF10A com VO-OHpic. **(A)** Western Blotting de células MCF10A após tratamento com VO-OHpic (2 μ M) por 24h, 48h e 72h; **(B)** Gráfico da fosforilação de RSK1 na Ser380; **(C)** Gráfico da fosforilação de ERK1/2 na Thr202/Y204; **(D)** Gráfico da expressão de p21 normalizada por ERK1/2; **(E)** Gráfico da fosforilação de AKT na Thr308. Os gráficos são resultado da quantificação densitométrica de 4 experimentos individuais.

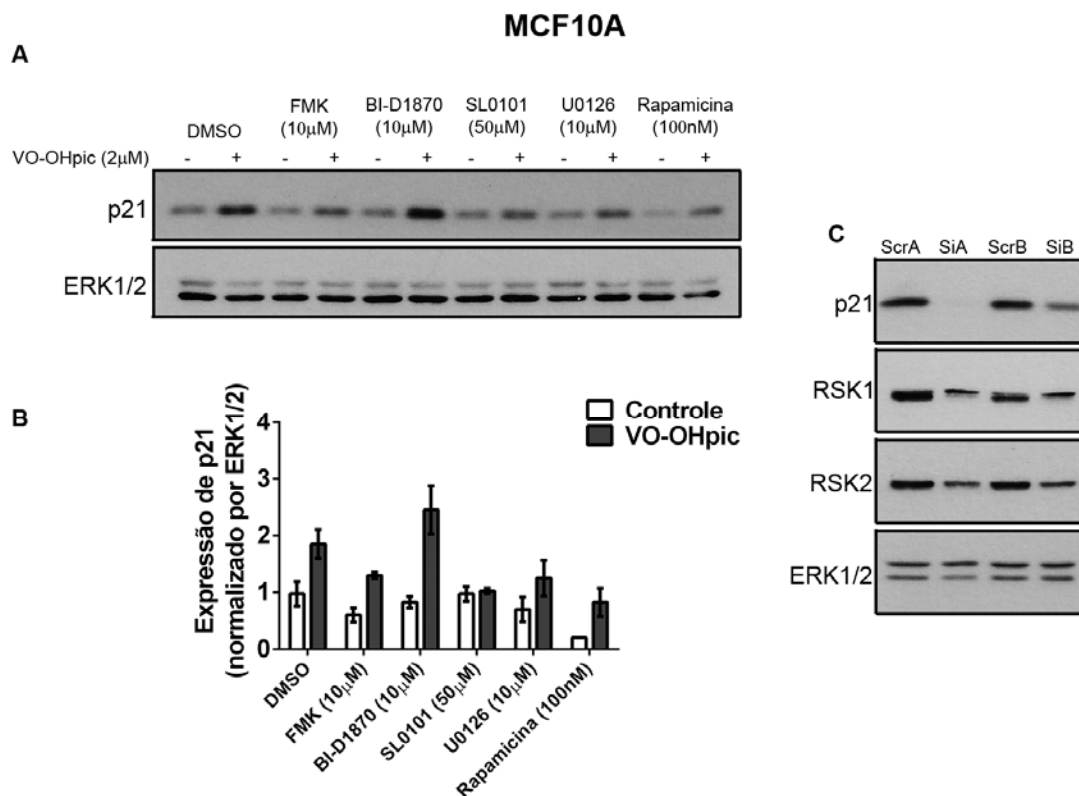


Figura 20 - Avaliação de p21 em MCF10A depletadas de RSK. **(A)** Western Blotting de células MCF10A após pré-tratamento com FMK (10 μ M), BI-D1870 (10 μ M), SL0101 (50 μ M), U0126 (10 μ M) e Rapamicina (100nM) por 30min e tratamento com VO-OHpic (2 μ M) por 48h; **(B)** Gráfico da expressão de p21 normalizada por ERK1/2; **(C)** Western Blotting de células MCF10A transfectadas com dois Sets diferentes de siRNA para RSK1 e RSK2 (SiA e SiB) ou com dois Sets de oligonucleotídeos controle (ScrA e ScrB). Os gráficos são resultado da quantificação densitométrica de 4 experimentos individuais.

4.6 CÉLULAS NOCAUTE PARA RSK1 E RSK2

A técnica do CRISPR/Cas9 foi utilizada com o intuito de obter uma linhagem de células de glioblastoma (LN-18) nocaute para as proteínas RSK1 e RSK2, visando ao estudo das alterações moleculares e funcionais causadas por essa deleção. Para evitar que sejam observadas alterações provenientes da inespecificidade da guia em outras vias de sinalização, foram feitas duas guias para cada isoforma.

Inicialmente, realizamos a clonagem das guias específicas para RSK1 e 2 no plasmídeo contendo a enzima Cas9. Para a confirmação de que a confecção dos plasmídeos contendo as guias foi correta, estes foram cortados com as enzimas de restrição EcoRI ou BbsI, e os fragmentos de DNA foram separados em gel de agarose 0,8% para observação das bandas (Figura 21). A enzima EcoRI cortou o plasmídeo de maneira a separar o gene de resistência à puromicina (660pb) do resto do plasmídeo (8515pb). No entanto, a enzima BbsI não cortou o plasmídeo, resultando em uma única banda de 9175pb. Isso ocorre, pois, a correta inserção da guia faz com que o sítio da enzima se perca. Foi possível concluir que a confecção dos plasmídeos foi eficiente, e foram escolhidas aleatoriamente uma colônia de cada guia para que fossem multiplicadas.

Uma vez que as guias foram corretamente inseridas no plasmídeo, o mesmo foi, então, utilizado para transfecção de células LN-18. A curva de puomicina realizada mostrou que, em 4 dias, a concentração de $1\mu\text{g/ml}$ era a mais eficiente em preservar as células transfectadas e eliminar as não transfectadas. No entanto, a eficiência na eliminação não foi de 100%; dessa maneira, foi determinada a concentração de $1,2\mu\text{g/ml}$ para ser utilizada na seleção das células transfectadas.

As células transfectadas com os plasmídeos contendo as guias foram, então, selecionadas com puromicina (1,2µg/ml) e isoladas para obtenção de colônias. Para confirmar a ausência da proteína de interesse, foi feito um extrato proteico de cada colônia, os quais foram submetidos a um Western

Blotting para RSK1 e RSK2. Foram obtidos um total de 132 colônias, sendo 21 de células transfectadas com o plasmídeo vazio, 33 com guias para RSK1, 44 para RSK2 e 34 colônias para RSK1 e 2. A figura 22 é um exemplo de gel de Western Blotting-teste das colônias, no qual podem ser observados um clone nocaute para RSK1 (clone RSK1 G2 I); três clones nocaute para RSK2 (clones RSK2 G2 H, I e K); e um clone nocaute para ambas as isoformas (clones RSK1/2 F).

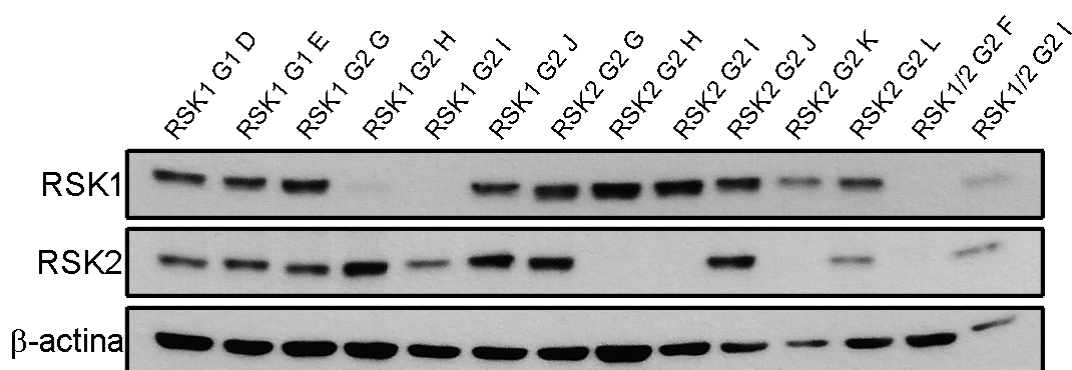


Figura 22 - Exemplo de gel de acrilamida para teste quanto ao conteúdo de RSKs. O clone RSK1 G2 I é nocaute para RSK1; os clones RSK2 G2 H, I e K são nocaute para RSK2; e o clone RSK1/2 G2 F é nocaute para as duas isoformas da proteína.

A capacidade das guias em produzir célula nocaute homozigotas foi calculada através da porcentagem entre as colônias homozigotas e o total de colônias testadas (Quadro 4). No geral, ambas as guias de RSK2 produziram mais colônias nocaute em comparação com as guias de RSK1, sendo que a guia 1 de RSK1 não produziu nenhuma colônia nocaute, o que também explica o fato de nenhuma colônia transfectada com RSK1 guia 1 + RSK2 guia 1 serem utilizadas. Esse fato pode ser explicado por duas

possibilidade. A primeira seria a baixa eficiência das guias para RSK1, a segunda seria a grande importância de RSK1 para a sobrevivência da célula, o que dificultaria a obtenção de clones nocaute para essa isoforma da proteína.

Quadro 4 – Porcentagem de colônias obtidas por guia testada

	Colônias Testadas	Total de colônias nocaute	Porcentagem (%)
RSK1 guia 1	9	0	0.0
RSK1 guia 2	24	1	4.2
RSK2 guia 1	11	4	36.4
RSK2 guia 2	33	4	12.1
RSK1 e 2 guia 1	14	0	0.0
RSK1 e 2 guia 2	20	4	20.0
Total	132	13	9.84

Para minimizar a chance de eventos inespecíficos influenciarem no fenótipo observado nas células nocaute para RSK, os clones obtidos para cada guia foram misturados entre si, criando populações de células. O grupo controle transfectado com vetor vazio foi composto por um *pool* de 5 diferentes colônias, o grupo nocaute para RSK1 derivado de apenas uma colônia obtida com a guia 2; o grupo nocaute para RSK2 um *pool* de 4 diferentes colônias obtidas com a guia 2; e o grupo duplo-nocaute derivados de apenas um clone obtido com a guia 2 para ambas as isoformas.

O primeiro estudo realizado com as células obtidas foi uma análise das vias de sinalização celular envolvidas com a tradução de mRNAs PI3K/AKT e RAS/ERK1/2, com foco nos alvos de RSK (Figura 23).

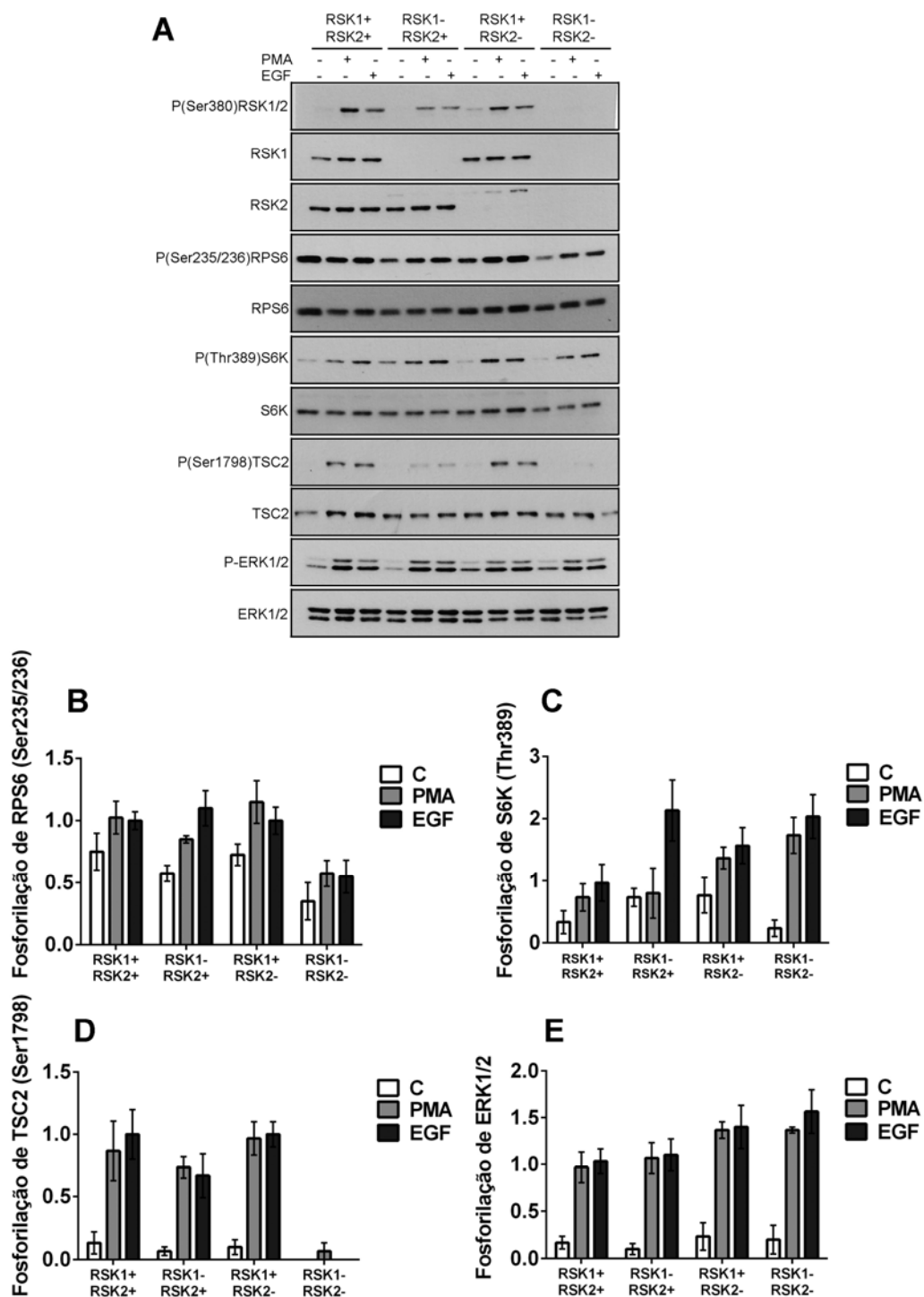


Figura 23 - Western Blotting de células nocaute para RSK1 e/ou RSK2. (A) Western Blotting foi feito após tratamento com EGF (50ng/ml) ou PMA (100ng/ml). (B) Gráfico da fosforilação de RPS6 na Ser235/236; (C) Gráfico da fosforilação de S6K na Thr389; (D) Gráfico da fosforilação de TSC2 na Ser1798; (E) Gráfico da fosforilação de ERK12 na Thr202/Y204. Os gráficos são resultado da quantificação densitométrica de 4 experimentos individuais.

Inicialmente, nota-se que não houve qualquer alteração de fosforilação ou expressão de ERK1/2 nas células nocaute, mostrando que a realização dessa técnica não afetou a via acima de RSK (Figura 23E). Além disso, é possível observar que células nocaute para as duas isoformas de RSK não apresentaram alteração na fosforilação em RPS6, ocorrendo apenas uma ligeira diminuição nas células duplo nocaute (Figura 23B). Células nocaute para RSK1 e para as duas isoformas tiveram uma grande diminuição na fosforilação da Ser1798 em TSC2 (Figura 23D). Outro resultado interessante foi a constatação de que o anticorpo utilizado para reconhecer a fosforilação de RSK1 na Ser380 também reconhece RSK2, uma vez que foram observadas bandas com a utilização desse anticorpo em células nocaute para RSK1 (Figura 23A). Interessantemente, nossos resultados mostraram que a ausência de RSK1, de RSK2 e de ambas as isoformas aumentou a expressão de S6K na Thr389 (Figura 23C), sugerindo que as RSKs exercem um efeito de *feedback* negativo sobre a via de sinalização PI3K/AKT.

Foi realizada também a análise das outras duas isoformas da proteína para verificar se houve alguma alteração em sua expressão nas células nocaute, no entanto, não se observou qualquer diferença da expressão de RSK3 e RSK4 nas células nocaute, comparadas com as células- controle, sendo a expressão praticamente nula nessa linhagem (Figura 24).

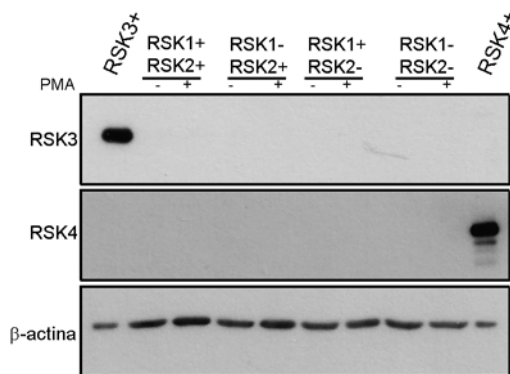


Figura 24 - Verificação de RSK3 e RSK4 em células nocaute. Western Blotting de células nocaute para RSK1 e/ou RSK2 após tratamento com PMA (100ng/ml). RSK3+: controle positivo para RSK3; RSK4+: controle positivo para RSK4.

Uma vez que a velocidade de crescimento confere agressividade ao tumor, foi feita a análise da curva de crescimento nessas células, com o intuito de avaliar o envolvimento de RSK1 e RSK2 nesse processo. É possível observar diminuição de crescimento de todas as células nocaute em comparação com o controle, após o quarto dia de crescimento, mostrando que na ausência dessa proteína as células crescem mais devagar (Figura 25).

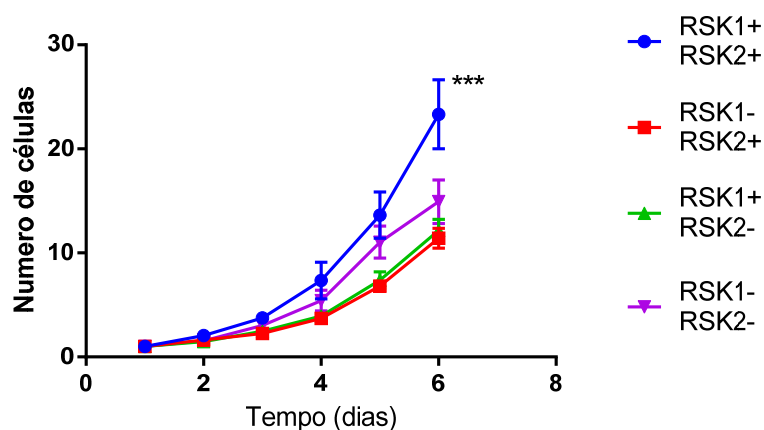


Figura 25 - Curvas de crescimento das células nocaute para RSK1 e/ou RSK2. A quantificação foi baseada em cinco experimentos, e em cada experimento foram feitas duplicatas experimentais.

5 DISCUSSÃO

Atualmente, acredita-se cada vez mais que o tratamento para tumores, incluindo o glioblastoma, deve ser individualizado e de acordo com as características de cada tumor. As alterações moleculares que diferem entre tumores de diferentes pacientes são a principal razão para a falta de resposta a tratamentos. Dessa maneira, na tentativa de dividir tumores com respostas diferentes em subgrupos, de acordo com o perfil molecular, vários estudos têm sido realizados.

Em gliomas difusos de baixo grau já existe a proposta de substituir a estratégia comumente utilizada, que consiste em esperar a evolução do tumor, para uma estratégia mais personalizada, levando em consideração aspectos clínicos, radiológicos e histo-moleculares de cada tumor (DUFFAU e TAILLANDIER 2014). Em glioblastomas, as alterações atualmente utilizadas para definir o tratamento dos pacientes são metilação do promotor do gene *MGMT* e mutações no gene *EGFR* (WELLER et al. 2012), porém poucos são os biomarcadores utilizados na prática, sendo as decisões tomadas principalmente pautando-se em aspectos clínicos. Uma vez que glioblastomas possuem altas taxas de recorrência e baixa eficiência da terapia padrão; estudos moleculares e ensaios clínicos podem ajudar a compreender as alterações que definem o comportamento do tumor e as diferentes respostas frente a tratamentos.

Uma vez que a proteína RSK tem sido descrita como alterada em

diversos tumores, o entendimento sobre sua participação em glioblastomas pode fornecer uma importante ferramenta para terapia. Foi descrito previamente por alunos do laboratório uma grande variabilidade na expressão e ativação de RSKs, tanto em linhagens celulares de glioblastomas, quanto em glioblastomas humanos. O que essa diferença determina e como a expressão desta proteína é regulada em glioblastomas é uma informação de grande importância para melhor compreensão sobre esse tumor.

Para o melhor entendimento sobre o nível em que ocorre a regulação da expressão de RSKs nesses tumores, foi feita uma análise de expressão de mRNAs das isoformas de RSK em linhagens celulares de glioblastomas, objetivando a comparação com a expressão proteica previamente realizada. Os resultados mostraram que não existe correlação entre os níveis de expressão de mRNAs e proteica de RSKs, indicando que essa regulação pode ocorrer na tradução ou através de modificações pós-traducionais. Por exemplo, sabe-se que SGK1 sofre ubiquitinação por estímulo de vias de sinalização em resposta ao ambiente extracelular (GWALTER et al. 2009), o que poderia regular sua estabilidade.

Durante este mestrado também foi feita uma investigação sobre a ação de RSKs em glioblastoma. Para isso, inicialmente houve a tentativa de padronização de ensaios com inibidores de RSK amplamente utilizados na literatura, SL0101 e BI-D1870 (NGUYEN 2008). Uma investigação mais detalhada dos inibidores citados resultou na publicação de um artigo científico (ROFFÉ et al. 2015 - Anexo 2), no qual foi descrito que enquanto o

inibidor SL0101 inibe inespecificamente a via de PI3K/AKT, a droga BI-D1870 ativa inespecificamente a mesma via. Muitos alvos de RSK e processos descritos na literatura foram baseados na utilização desses dois inibidores que possuem efeitos inespecíficos, evidenciando que esses achados devem ser vistos com cautela.

Além disso, nesse artigo é descrito um alvo específico de RSK que pode ser utilizado para acessar sua atividade. Sabe-se que para acessar a atividade de uma cinase é necessário observar a ativação de seu principal alvo, geralmente uma proteína diretamente por ela fosforilada. Essa tarefa se complica em se tratando de RSK, uma vez que são descritos muitos alvos para essa proteína, e quase nenhum deles pode ser considerado seu alvo exclusivo (ANJUM e BLENIS 2008). Comumente é utilizada a fosforilação de RPS6 no resíduo Ser235/236 (ROUX et al. 2007), no entanto observou-se que essa fosforilação ocorre principalmente por S6K. Através da utilização de siRNA, foi observado que a fosforilação de TSC2 no resíduo Ser1798 é um alvo mais específico para acessar a atividade de RSKs.

Uma vez que os inibidores inicialmente cogitados foram considerados inespecíficos, percebeu-se a necessidade de padronização de outra droga conhecida como FMK. Os resultados mostraram que esse inibidor pode ser considerado mais específico, pois não afetou a fosforilação de S6K. A especificidade de FMK já foi demonstrada previamente por COHEN (2005) em lisados proteicos de células epiteliais humanas, nas quais a droga FMK marcada com biotina foi encontrada associada apenas às RSK1 e RSK2, detectadas através de imunodepleção com anticorpos específicos.

A inibição de RSK foi causada também através da realização de edição genômica utilizando o sistema CRISPR/Cas9. Comparada com outras técnicas de edição genômica, o sistema CRISPR/Cas9 é considerado mais simples, com padrão de clivagem mais específico e com taxa de eficiência mais alta (RAN et al. 2013). Foi constatado que a realização da técnica não afetou a via acima de RSK, uma vez que não houve qualquer alteração de fosforilação ou expressão de ERK1/2 nas células nocaute.

Além disso, como proposto pelo nosso grupo anteriormente (ROFFÉ et al. 2015 - Anexo 2), foi observado que a fosforilação de TSC2 na Ser1798 é um alvo específico para RSK, uma vez que células nocaute para RSK1 e células nocaute para as duas isoformas tiveram a fosforilação desse resíduo muito afetada, indicando que RSK é a principal cinase responsável por esse processo. A fosforilação de TSC2 por RSK1 de maneira independente de AKT foi inicialmente descrita por ROUX et al. (2004), no entanto, a fosforilação de RPS6 na Ser235/236, é mais comumente utilizada na literatura para acessar a atividade de RSK (ROUX et al. 2007). Não foram observadas muitas alterações das células nocaute na fosforilação desse resíduo em RPS6, apenas foi observada ligeira diminuição nas células nocaute para RSK1 e RSK2. Esse dado corrobora os achados nos quais se descreveram que a via principalmente responsável por essa fosforilação é a via de mTORC1 através de S6K, e que de fato a fosforilação de TSC2 na Ser1798 é um melhor alvo para ser utilizado em estudos que visam acessar à atividade de RSK. Outra constatação interessante foi o fato de que o anticorpo que reconhece a forma fosforilada de RSK1, também reconhece a

isoforma RSK2, uma vez que foram observadas bandas com a utilização desse anticorpo em células nocaute para RSK1. Esse fato pode ser explicado pelo alto grau de homologia entre as isoformas RSK1 e RSK2, que corresponde a aproximadamente 80% dos aminoácidos (ANJUM e BLENIS 2008).

Finalmente, foi observado que a inibição de RSK promoveu ativação de S6K, componente da via de PI3K/AKT, potencializando a ação de EGF e do Soro. Sabe-se que as vias de RAS/ERK e PI3K/AKT possuem ponto de interação, que ativam ou inibem uma a outra dependendo do contexto celular (AKSAMITIENE et al. 2012). De maneira semelhante ao encontrado neste mestrado, HAYASHI et al. (2008) demonstraram que em resposta a fatores de crescimento, a via de ERK regula negativamente a via de PI3K/AKT, uma vez que a inibição de ERK potencializou a ativação de AKT em fibroblastos embrionários. Dessa maneira, a proteína RSK pode possuir um papel na inibição causada pela via de RAS/ERK sobre a via de PI3K/AKT.

O envolvimento de RSK na proliferação celular também foi investigado. Inicialmente, foi feito um ensaio de incorporação de BrdU utilizando o inibidor químico FMK na concentração padronizada. Não foi observada diferença na proliferação das células quando tratadas ou não com FMK, seja sob estímulo de EGF ou Soro. De fato, KANG et al. (2010) observaram que tratamento com FMK atenua invasão e migração, porém não afeta proliferação em carcinoma de células escamosas em cabeça e pescoço, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Um possível mecanismo para esse

processo é a existência da via de RSK2/CREB-1, que confere potencial metastático em linhagens celulares de diversos tipos tumorais de maneira independente da proliferação, por controlar a proteína agregadora de filamentos de actina, conhecida como Fascin, controlando a formação de filopódios (LI et al. 2013).

De maneira oposta a este resultado, observou-se que células nocaute para RSK1, RSK2 e para ambas as isoformas proliferam mais devagar do que as células controle. Essa divergência de resultados pode ocorrer pela diferença de tempo de tratamento, uma vez que o tratamento realizado com FMK foi agudo (24h de tratamento). As células nocaute, por outro lado, estão cronicamente expostas à falta de RSK. Muitas proteínas que estimulam a proliferação celular são alvos de RSK e podem ter sido afetadas nas células nocaute. O fator transcricional FOS é ativado por RSK2 e regula positivamente a expressão de ciclina D1, processo essencial para formação de osteossarcomas em camundongos (DAVID et al. 2005). Além disso, RSKs também regulam negativamente GSK-3 β (SUTHERLAND et al. 1993), evitando a degradação de MYC e ciclina D1 pelo proteassomo (COHEN e FRAME 2001). RSKs também podem estimular a proliferação através da fosforilação da proteína MXD1, a qual compete com MYC pela heterodimerização com MAX, sendo que a fosforilação pelo RSK e por S6K acelera sua degradação pelo proteassomo (ZHU et al. 2008). Dessa maneira, terapias visando à inibição de RSK podem ter como objetivo a inibição de crescimento e proliferação celular.

Adicionalmente a tratamentos visando inibir o processo de

crescimento celular e proliferação, uma alternativa que tem sido cada vez mais investigada para combater o câncer é o resgate da senescência celular (NARDELLA et al. 2011). Durante este mestrado foi feita uma análise do envolvimento de RSK1 com a senescência induzida pela perda de PTEN.

Primeiramente, observou-se a existência de uma correlação entre aumento de RSK1 e aumento da proteína p21. Com 24h de tratamento com VO-OHpic, células MCF10A apresentaram aumento da ativação de AKT na Thr308, o que é esperado uma vez que PTEN é um regulador negativo dessa via. Com apenas 24h de tratamento com VO-OHpic já se observa o aumento de expressão de p21, que continua ao longo do tempo. De fato, ALIMONTI et al. (2010) observaram em fibroblastos embrionários de camundongos o aumento de senescência em 24h após inibição de PTEN. Segundo os autores, a senescência do tipo PICS ocorre nas primeiras horas de inibição de PTEN por ser independente de uma longa fase de hiper-replicação, como ocorre em outros tipos de senescência. Curiosamente, foi observado o aumento da ativação de RSK1 no resíduo Ser380 ao mesmo tempo em que ocorreu o aumento da expressão de p21. Dessa maneira, de fato constatamos uma correlação entre RSK1 e os níveis de p21, o que pode indicar uma correlação de RSK1 com a senescência do tipo PICS.

Além disso, foram realizados experimentos de inibição de RSK1 com o objetivo de observar se a célula perde a capacidade de entrar em senescência quando na ausência dessa proteína. Inicialmente foi feita uma curva de inibidores químicos utilizando os três inibidores de RSK disponíveis em nosso laboratório (SL0101, BI-D1870 e FMK), bem como o inibidor de

MEK (U0126), e a rapamicina, inibidor de mTOR. A utilização de VO-OHpic aumentou os níveis de p21 em todos os tratamentos, indicando que a inibição de PTEN por essa droga pode ter resultado no processo de senescência do tipo PICS, como já esperado (ALIMONTI et al. 2010). A utilização de rapamicina inibiu a senescência tanto na presença quanto na ausência de VO-OHpic. Esse fato se deve ao envolvimento de mTOR do processo de geroconversão, e a utilização de rapamicina pode inibir esse processo (DEMIDENKO et al. 2009). Oportunamente, a inibição de RSK tanto pela droga FMK quanto pela inibição da via acima com a utilização de U0126 resultou na diminuição dos níveis de p21 somente após a inibição de PTEN, indicando o possível envolvimento de RSK nesse tipo de senescência. O inibidor BI-D1870 resultou em um aumento mais acentuado de p21 quando na presença de VO-OHpic em comparação ao FMK. Esse fato pode ser explicado pela ativação inespecífica que essa droga causa sobre a via de mTOR (ROFFÉ et al. 2015 - Anexo 1), aumentando ainda mais o estímulo de senescência. Além disso, já foi descrito que BI-D1870 induz acúmulo de p21 de maneira independente de RSK (NEISE et al. 2013). Por sua vez, a utilização de SL0101 inibiu a expressão de p21 na presença de VO-OHpic em comparação com FMK, o que é compatível com a inibição inespecífica dessa droga sobre a via de mTOR, diminuindo o estímulo de geroconversão causada por essa proteína.

Tanto a inibição química, quanto a depleção de RSK utilizando siRNA foram capazes de diminuir os níveis de p21 em células não transformadas. Dessa maneira, com esses resultados evidenciou-se o possível

envolvimento de RSK1 com senescência do tipo PICS. O envolvimento de RSK com o processo de senescência pode ocorrer de maneira semelhante a mTOR. LEONTIEVA e BLAGOSKLONNY (2014) observaram que a via de RAS/ERK1/2 pode promover a senescência tanto por induzir a parada do ciclo celular quanto por promover a geroconversão.

O conceito de uma terapia pró-senescência é relativamente recente, sendo que as primeiras evidências de seu potencial no tratamento contra o câncer apareceram em 2005 (NARDELLA et al. 2011). XUE et al. (2007) demonstraram que células senescentes podem limitar o crescimento do tumor por ativar o sistema imune inato *in vivo*, fornecendo forte evidência do potencial dessa terapia. Mais do que isso, a senescência do tipo PICS, por não depender da hiperproliferação, atinge tanto as células em divisão quanto as células quiescentes, que também contribuem para a manutenção do tumor (DONNENBERG e DONNENBERG 2005). Assim, a recuperação de PICS pode ser uma importante estratégia terapêutica para pacientes com glioblastomas, e o melhor entendimento das moléculas envolvidas e que podem ser utilizadas para a ativação desse processo é de extrema importância.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que a expressão diferencial de RSKs em glioblastoma afeta mecanismos como proliferação celular e senescência.

- 1 A regulação de RSK pode ter ocorrido na tradução ou através de modificações pós-traducionais em linhagens de glioblastomas;
- 2 Os inibidores SL0101 e BI-D1870 foram inespecíficos, pois tiveram efeitos sobre a sinalização de mTORC1 e S6K, enquanto o inibidor FMK se apresentou específico através das proteínas avaliada. A análise da fosforilação de TSC2 no resíduo Ser 1798 foi específica para a atividade de RSK;
- 3 Em cultura de células não transformadas (MCF10A) encontrou-se relação entre ativação de RSK1 e expressão de p21, após inibição de PTEN;
- 4 A utilização de inibidores químicos ou siRNA para RSK1/2 diminuiu os níveis da proteína p21 em células MCF10A, após inibição de PTEN;
- 5 A metodologia CRISPR/Cas9 foi eficiente para produzir células LN18 nocaute para RSK1 e/ou RSK2 e evidenciou o papel de RSK na proliferação celular.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agnihotri S, Burrell KE, Wolf A, et al. Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies. **Arch Immunol Ther Ex** 2013; 61:25-41.

Aksamitiene E, Kiyatkin A, Kholodenko BN. Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance. **Biochem Soc T** 2012; 40:139-46.

Alimonti A, Nardella C, Chen Z, et al. A novel type of cellular senescence that can be enhanced in mouse models and human tumor xenografts to suppress prostate tumorigenesis. **J Clin Invest** 2010; 120:681-93.

Anjum R, Blenis J. The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2008; 9:747-58.

Balss J, Meyer J, Mueller W, Korshunov A, Hartmann C, von Deimling A. Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. **Acta Neuropathol** 2008; 116:597-602.

Ben-Porath I, Weinberg RA. The signals and pathways activating cellular senescence. **Int J Biochem Cell B** 2005; 37:961-76.

Blagosklonny MV, Hall MN. Growth and aging: a common molecular mechanism. **Aging** 2009; 1:357-62.

Blagosklonny MV. Cell cycle arrest is not yet senescence, which is not just cell cycle arrest: terminology for TOR-driven aging. **Aging** 2012; 4:159-65.

Blagosklonny MV. Geroconversion: irreversible step to cellular senescence. **Cell Cycle** 2014; 13:3628-35.

Calkhoven CF, Müller C, Leutz A. Translational control of gene expression and disease. **Trends Mol Med** 2002; 8:577-83.

Campbell L, Jasani B, Griffiths DFR, Gumbleton M. Phospho-4e-BP1 and eIF4E overexpression synergistically drives disease progression in clinically confined clear cell renal cell carcinoma. **Am J Cancer Res** 2015; 5:2838-48.

Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2007; 8:729-40.

Carrière A, Cargnello M, Julien LA, et al. Oncogenic MAPK signaling stimulates mTORC1 activity by promoting RSK-mediated raptor phosphorylation. **Curr Biol** 2008; 18:1269-77.

Chen RH, Sarnecki C, Blenis J. Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. **Mol Cell Biol** 1992; 12:915-27.

Chen RH, Abate C, Blenis J. Phosphorylation of the c-Fos transrepression domain by mitogen-activated protein kinase and 90-kDa ribosomal S6 kinase. **Proc Natl Acad Sci USA** 1993; 90:10952-6.

Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, et al. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. **Nature** 2009; 436:9492-9.

Cho YY, Yao K, Kim HG, et al. Ribosomal S6 kinase 2 is a key regulator in tumor promoter induced cell transformation. **Cancer Res** 2007; 67:8104-12.

Clark DE, Errington TM, Smith JA, Frierson HF, Weber MJ, Lannigan DA. The serine/threonine protein kinase, p90 ribosomal S6 kinase, is an important regulator of prostate cancer cell proliferation. **Cancer Res** 2005; 65:3108-16.

Cohen MS, Zhang C, Shokat KM, Taunton J. Structural bioinformatics-based design of selective, irreversible kinase inhibitors. **Science** 2005; 308:1318–21.

Cohen P, Frame S. The renaissance of GSK3. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2001; 2:769-76.

Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. **Science** 2013; 339:819-23.

Cosme-Blanco W, Shen MF, Lazar AJF, et al. Telomere dysfunction suppresses spontaneous tumorigenesis in vivo by initiating p53-dependent cellular senescence. **EMBO Rep** 2007; 8:497-503.

Dalby KN, Morrice N, Caudwell FB, Avruch J, Cohen P. Identification of regulatory phosphorylation sites in mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinase-1a/p90(rsk) that are inducible by MAPK. **J Biol Chem** 1998; 273:1496-505.

Dang L, White DW, Gross S, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. **Nature** 2009; 462:1-18.

David J, Mehic D, Bakiri L, et al. Essential role of RSK2 in c-Fos-dependent osteosarcoma development. **J Clin Invest** 2005; 115:664-72.

De Benedetti A, Rhoads RE. Overexpression of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E in HeLa cells results in aberrant growth and morphology. **Proc Natl Acad Sci USA** 1990; 87:8212–6.

Demidenko ZN, Zubova SG, Bukreeva EI, Pospelov VA, Pospelova TV, Blagosklonny MV. Rapamycin decelerates cellular senescence. **Cell Cycle** 2009; 8:1888-95.

Dennis MD, Jefferson LS, Kimball SR. Role of p70S6K1-mediated phosphorylation of eIF4B and PDCD4 proteins in the regulation of protein synthesis. **J Biol Chem** 2012; 287:42890-9.

Deveau H, Garneau JE, Moineau S. CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions. **Annu Rev Microbiol** 2010; 64:475-93.

Dimri GP, Lee XH, Basile G, et al. A biomarker that identifies senescent human-cells in culture and in aging skin in-vivo. **P Natl Acad Sci USA** 1995; 92:9363-7.

Doehn U, Hauge C, Frank SR, et al. RSK is a principal effector of the RAS-ERK pathway for eliciting a coordinate promotile/invasive gene program and phenotype in epithelial cells. **Mol Cell** 2009; 35:511-22.

Donnenberg VS, Donnenberg AD. Multiple drug resistance in cancer revisited: the cancer stem cell hypothesis. **J Clin Pharmacol** 2005; 45:872-7.

Duffau H, Taillandier L. New concepts in the management of diffuse low-grade glioma: proposal of a multistage and individualized therapeutic approach. **Neuro-Oncology** 2014; 17:1–11.

Dummler BA, Hauge C, Silber J, et al. Functional characterization of human RSK4 , a new 90-kDa ribosomal S6 kinase, reveals constitutive activation in most cell types. **J Biol Chem** 2005; 280:13304-14.

Eberle J, Krasagakis K, Orfanos CE. Translational initiation factor eIF-4A1 mRNA is consistently overexpressed in human melanoma cell in vitro. **Int J Cancer** 1997; 71:396–401.

Efeyan A, Sabatini DM. Nutrients and growth factors in mTORC1 activation. **Biochem Soc T** 2013; 41:902-5.

Fingar DC, Blenis J. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. **Oncogene** 2004; 23:3151–71.

Fisher TL, Blenis J. Evidence for two catalytically active kinase domains in pp90rsk. **Mol Cell Biol** 1996; 16:1212-9.

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, et al. **GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase n° 11**. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <URL:<http://globocan.iarc.fr>, accessed on day/month/year> [2015 out 15].

Frodin M, Jensen CJ, Merienne K, Gammeltoft S. A phosphoserine-regulated docking site in the protein kinase RSK2 that recruits and activates PDK1. **EMBO J** 2000; 19:2924-34.

Fukuchi-Shimogori T, Ishii I, Kashiwagi K, Mashiba H, Ekimoto H, Igarashi K. Malignant transformation by overproduction of translation initiation factor eIF4G. **Nature** 2000; 57:4353-7.

Funayama R, Ishikawa F. Cellular senescence and chromatin structure. **Chromosoma** 2007; 116:431-40.

Gingras AC, Raught B, Gygi SP, et al. Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. **Gene Dev** 2001; 15:2852-64.

Gwalter J, Wang ML, Gout I. The ubiquitination of ribosomal S6 kinases is independent from the mitogen-induced phosphorylation/activation of the kinase. **Int J Biochem Cell B** 2009; 41:828-33.

Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. **Nature** 1990; 345:458-60.

Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. **Gene Dev** 2004; 18:1926-45.

Hayashi H, Tsuchiya Y, Nakayama K, Satoh T, Nishida E. Down-regulation of the PI3-kinase/Akt pathway by ERK MAP kinase in growth factor signaling. **Genes Cells** 2008; 13:941-7.

Hayflick L, Moorhead PS. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. **Exp Cell Res** 1965; 37:614-36.

Junqueira LC, Carneiro J. **Histologia básica**. 10^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. Tecido nervoso; p.154-83.

Kang S, Dong S, Gu TL, et al. FGFR3 activates RSK2 to mediate hematopoietic transformation through tyrosine phosphorylation of RSK2 and activation of the MEK/ERK pathway. **Cancer Cell** 2007; 12:201-14.

Kang S, Elf S, Dong S, et al. Fibroblast growth factor receptor 3 associates with and tyrosine phosphorylates p90 RSK2, leading to RSK2 activation that mediates hematopoietic transformation. **Mol Cell Biol** 2009; 29:2105-17.

Kang S, Elf S, Lythgoe K, et al. p90 ribosomal S6 kinase 2 promotes invasion and metastasis of human head and neck squamous cell carcinoma cells. **J Clin Invest** 2010; 120:1165-77.

Kim DD, Sarbassov SM, Ali JE, et al. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. **Cell** 2002; 110:163-75.

Krex D, Klink B, Hartmann C, et al. Long-term survival with glioblastoma multiforme. **Brain** 2007; 130:2596-606.

Lanigan F, Geraghty JG, Bracken AP. Transcriptional regulation of cellular senescence. **Oncogene** 2011; 30:2901-11.

Leontieva OV, Blagosklonny MV. Tumor promoter-induced cellular senescence: cell cycle arrest followed by geroconversion. **Oncotarget** 2014; 5:12714-27.

Li D, Jin L, Alesi GN, et al. The prometastatic ribosomal S6 kinase 2-cAMP response element-binding protein (RSK2-CREB) signaling pathway up-regulates the actin-binding protein fascin-1 to promote tumor metastasis. **J Biol Chem** 2013; 288:32528-38.

Li L, Zhu YQ, Jiang L, Peng W. Increased autophagic activity in senescent human dental pulp cells. **Int Endod J** 2012; 45:1074-9.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathol** 2007; 114:97-109.

Machado LES. **Expressão das proteínas da família rsk em astrocitomas de baixo e alto grau**. São Paulo, 2015. [Dissertação-Mestrado-Fundação Antonio Prudente].

Miller JC, Tan S, Qiao G, et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. **Nat Biotechnol** 2011; 29:143-8.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva. **Estimativa/2014 Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2014.

Mirmohammadsadegh A, Mota R, Gustrau A, et al. ERK1/2 is highly phosphorylated in melanoma metastases and protects melanoma cells from cisplatin-mediated apoptosis. **Journal Invest Dermatol** 2007; 127:2207-15.

Nardella C, Clohessy JG, Alimonti A, Pandolfi PP. Pro-senescence therapy for cancer treatment. **Nat Rev Cancer** 2011; 11:503-11.

Neve RM, Chin K, Fridlyand J, et al. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. **Cancer Cell** 2009; 10:515-27.

Nguyen TL. Targeting RSK: an overview of small molecule inhibitors. **Anticancer Agents Med Chem** 2008; 8:710-16.

Nishio K, Inoue A, Qiao S, Kondo H, Mimura A. Senescence and cytoskeleton: overproduction of vimentin induces senescent-like morphology in human fibroblasts. **Histochem Cell Biol** 2001; 116:321-7.

Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. **Clin Cancer Res** 2013; 19:764-72.

Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, et al. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. **Neuro-Oncology** 2013; 15 Suppl 2: ii1-ii56.

Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. **Science** 2008; 321:1807-12.

Ran F, Hsu P, Wright J, Agarwala V. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. **Nat Protoc** 2013; 8:2281-08.

Rodier F, Munoz DP, Teachenor R, et al. DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. **J Cell Sci** 2011; 124:68-81.

Roffé M, Lupinacci FC, Soares LC, Hajj GN, Martins VR. Two widely used RSK inhibitors, BI-D1870 and SL0101, alter mTORC1 signaling in a RSK-independent manner. **Cell Signal** 2015; 27:1630-42.

Roux PP, Richards SA, Blenis J. Phosphorylation of p90 ribosomal S6 kinase (RSK) regulates extracellular signal-regulated kinase docking and RSK activity. **Mol Cell Biol** 2003; 23:4796-804.

Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. **Microbiol Mol Biol Rev** 2004; 68:320-44.

Roux PP, Ballif BA, Anjum R, Gygi SP, Blenis J. Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. **Proc Natl Acad Sci USA** 2004; 101:13489-94.

Roux PP, Shahbazian D, Vu H, et al. RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation. **J Biol Chem** 2007; 282:14056-64.

Sabatini DM, Erdjument-Bromage H, Lui M, Tempst P, Snyder SH. RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. **Cell** 1994; 78:35–43.

Sapkota GP, Cummings L, Newell FS, et al. BI-D1870 is a specific inhibitor of the p90 RSK (ribosomal S6 kinase) isoforms in vitro and in vivo. **Biochem J** 2007; 401:29-38.

Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, et al. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. **Curr Biol** 2004; 14:1296-302.

Sasaki M, Knobbe CB, Itsumi M, et al. D-2-hydroxyglutarate produced by mutant Idh1 perturbs collagen maturation and basement membrane function. **Gene Dev** 2012; 26:2038-49.

Scott J, Tsai YY, Chinnaiyan P, Yu HHM. Effectiveness of radiotherapy for elderly patients with glioblastoma. **Int J Radiat Oncol** 2011; 81:206-10.

Sears R, Nuckolls F, Haura E, Taya Y, Tamai K, Nevins JR. Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. **Gene Dev** 2000; 14:2501-14.

Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16(INK4a). **Cell** 1997; 88: 593-602.

Shahbazian D, Roux PP, Mieulet V, et al. The mTOR/PI3K and MAPK pathways converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity. **EMBO J** 2006; 25:2781-91.

Shuda M, Kondoh N, Tanaka K, et al. Enhanced expression. Of translation factor mRNAs in hepatocellular carcinoma. **Anticancer Res** 2000; 20:2489-94.

Silvera D, Formenti SC, Schneider RJ. Translational control in cancer. **Nat Rev Cancer** 2010; 10:254–66.

Smith JA, Poteet-Smith CE, Xu Y, Errington TM, Hecht SM, Lannigan DA. Identification of the first specific inhibitor of p90 ribosomal S6 kinase (RSK) reveals an unexpected role for RSK in cancer cell proliferation. **Cancer Res** 2005; 65:1027-34.

Smith JA, Maloney DJ, Hecht SM, Lannigan, DA. Structural basis for the activity of the RSK-specific inhibitor, SL0101. **Bioorgan Med Chem** 2007; 15:5018-34.

Song MS, Carracedo A, Salmena L, et al. Nuclear PTEN regulates the APC-CDH1 tumor suppressive complex in a phosphatase-independent manner. **Cell** 2011; 144:187-99.

Stiles CD, Rowitch DH. Glioma stem cells: a midterm exam. **Neuron** 2008; 58:832-46.

Stupp R, Mason WP, van den Bent, MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. **N Engl J Med** 2005; 352:987-96.

Sutherland C, Leighton IA, Cohen P. Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. **Biochem J** 1993; 296(Pt 1):15-9.

Tejada S, Lobo MVT, García-Villanueva M, et al. Eukaryotic initiation factors (eIF) 2alpha and 4E expression, localization, and phosphorylation in brain tumors. **J Histochem Cytochem** 2009; 57:503-12.

The Cancer Genome Atlas Research Network. The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. **Cell** 2012; 155: 462-77.

Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. **Nat Rev Genet** 2010; 11:636-46.

Van Meir EG, Hadjipanayis CG, Norden AD, Shu H, Wen PY, Olson JJ. Exciting new advances in neuro-oncology. **CA Cancer J Clin** 2010; 60:166-93.

Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, et al. An integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR and NF1. **Cancer Cell** 2010; 19:38-46.

Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:489-501.

Weller M, Stupp R, Hegi ME, et al. Personalized care in neuro-oncology coming of age: why we need MGMT and 1p/19q testing for malignant glioma patients in clinical practice. **Neuro-Oncology** 2012; 14:iv100-8.

Xian W, Pappas L, Pandya D, et al. Fibroblast growth factor receptor 1-transformed mammary epithelial cells are dependent on RSK activity for growth and survival. **Cancer Res** 2009; 69:2244-51.

Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. **Nature** 1993; 366:701-4.

Xue W, Zender L, Miething C, et al. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. **Nature** 2007; 445:656-60.

Yan H, Parsons DW, Jin G, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. **N Engl J Med** 2009; 360:765-73.

Yang H, Cho M, Zakowicz H, Hegamyer G, Sonenberg N, Colburn NH. A novel function of the MA-3 domains in transformation and translation suppressor Pdc4 is essential for its binding to eukaryotic translation initiation factor 4A. **Mol Cell Biol** 2004; 24:3894-906.

Zeniou M, Ding T, Trivier E, Hanauer A. Expression analysis of RSK gene family members: the RSK2 gene, mutated in Coffin-Lowry syndrome, is prominently expressed in brain structures essential for cognitive function and learning. **Hum Mol Genet** 2002; 11:2929–40.

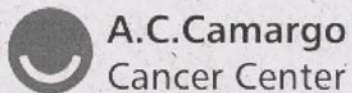
Zhao Y, Bjørbaek C, Weremowicz S, Morton CC, Moller DE. RSK3 encodes a novel pp90rsk isoform with a unique N-terminal sequence: growth factor-stimulated kinase function and nuclear translocation. **Mol Cell Biol** 1995; 15:4353-63.

Zhao J, Yuan X, Frödin M, Grummt I. ERK-dependent phosphorylation of the transcription initiation factor TIF-IA is required for RNA polymerase I transcription and cell growth. **Mol Cell** 2003; 11:405-13.

Zhao S, Lin Y, Xu W, et al. Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1 α . **Science** 2009; 324:261-5.

Zhu J, Blenis J, Yuan J. Activation of PI3K/Akt and MAPK pathways regulates Myc-mediated transcription by phosphorylating and promoting the degradation of Mad1. **Proc Natl Acad Sci USA** 2008; 105:6584-9.

Anexo 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP

São Paulo, 06 de março de 2014.

A
Dra. Glauca Noeli Hajj.

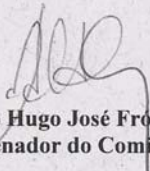
Aluna: Luana Campos Soares (Mestrado).

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1775/13B
“Papel do mTOR e RSK no processo de tumorigênese em gliomas”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 25/02/2014, **tomaram conhecimento e aprovaram** os seguintes documentos:

- Solicitação de dispensa da submissão da documentação obrigatória e análise ética do projeto acima mencionado por se tratar de um projeto afiliado ao temático intitulado “Translatômica aplicada ao descobrimento de alterações moleculares em gliomas”, registrado neste CEP sob nº 1775/13. O projeto afiliado em referência será a dissertação de Mestrado da aluna *Luana Campos Soares*.
- Projeto de Mestrado, datado de Novembro de 2013.

Atenciosamente,



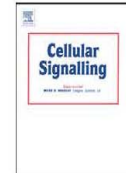
Dr. Antônio Hugo José Frões Marques Campos
2º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa



Contents lists available at ScienceDirect

Cellular Signalling

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cellsig



Two widely used RSK inhibitors, BI-D1870 and SL0101, alter mTORC1 signaling in a RSK-independent manner



Martín Roffé, Fernanda C. Lupinacci, Luana C. Soares, Glaucia N. Hajj, Vilma R. Martins *

International Research Center, A.C. Camargo Cancer Center, Brazil. National Institute of Science and Technology in Oncogenomics (INCTO).

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 January 2015
Received in revised form 6 April 2015
Accepted 8 April 2015
Available online 16 April 2015

Keywords:

p90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK)
BI-D1870
SL0101
p70 ribosomal S6 kinase (p70S6K)
Ribosomal protein S6 (rpS6)
Tuberin (TSC2)

ABSTRACT

The 90 kDa ribosomal S6 kinases (RSK) are effectors of the Ras-ERK1/2 signaling pathway. RSK signaling controls proliferation and protein synthesis, and is altered in several types of tumors. BI-D1870 and SL0101 are two widely used inhibitors of RSK. After revision of the literature, discrepancies in the effects of the inhibitors were identified. Herein we report that while SL0101 inhibited mTORC1-p70S6K signaling, BI-D1870 increased p70S6K activation. Both effects were independent of ERK1/2 and RSK, and thus nonspecific. We also demonstrated how these opposite nonspecific effects mislead the identification of the RSK-dependent phosphorylation of rpS6 (S235/236), a known RSK and p70S6K substrate. Phosphorylation of tuberin at S1798 by RSK was proposed to mediate ERK1/2-dependent activation of mTORC1-p70S6K signaling. In glioblastoma-derived cells, phosphorylation of tuberin was abolished after RSK depletion or ERK1/2 inhibition, suggesting that RSK is its main kinase. However, RSK depletion did not reduce PMA-dependent p70S6K phosphorylation, which suggests that tuberin phosphorylation at S1798 is not the main mediator of ERK1/2-dependent activation of mTORC1. Remarkably, tuberin phosphorylation (S1798) followed the activation status of RSK in different cells and experimental conditions, suggesting that phosphorylation of that residue could be used as readout for RSK activation in cells. We confirmed the difference in the effects of SL0101 and BI-D1870 in cellular proliferation assays. Rapamycin potentiated the inhibition of proliferation induced by BI-D1870, but not by SL0101. We thus conclude that SL0101 and BI-D1870 induce distinct off-target effects in mTORC1-p70S6K signaling, and thus, the functions previously ascribed to RSK based on these inhibitors should be reassessed.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The family of p90 ribosomal S6 kinase (RSK) is among several direct targets of extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 (ERK1/2) [1]. Correspondingly, RSK contributes to many cellular functions, including

control of cell proliferation, growth, survival, and migration. RSK can control gene expression by regulating transcription factors and also at the level of protein synthesis [2]. Human cells express four different RSK isoforms (RSK1–4) that are highly homologous. Furthermore, RSK possesses two distinct functional kinase domains, one at the N-terminus (NTKD) and one at the C-terminus (CTKD) [3]. The CTKD mediates regulatory functions and is necessary for activation of the NTKD by the Ras-ERK1/2 pathway. When activated, the NTKD phosphorylates numerous proteins, preferentially at serine residues [4]. The association of RSKs with different stages of tumorigenesis is steadily increasing, thereby making them an attractive therapeutic target [5,6].

In 88% of glioblastomas (GBs), the most common type of malignant primary brain tumor diagnosed, alterations in receptor tyrosine kinases (RTK), Ras, and/or PI3K pathways have been identified [7]. Moreover, the epidermal growth factor receptor (EGFR), which can activate both Ras-ERK1/2 and PI3K-Akt-mTORC1 signaling pathways, is the RTK most frequently altered in GBs [7]. Clinical trials targeting the EGFR-PI3K-mTORC1 signaling pathway have been conducted. However, resistance to this treatment is usually observed. Several lines of evidence suggest that compensatory activation of Ras-ERK1/2 may contribute to this resistance [8]. RSK is at the nexus of the cross-talk that occurs

Abbreviations: 4E-BP1, eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1; Akt, protein kinase B; BrdU, bromodeoxyuridine; CTKD, C-terminus kinase domain; eIF4B, eukaryotic translation initiation factor 4B; EGF, epidermal growth factor; EGFR, epidermal growth factor receptor; ERK1/2, extracellular-signal-regulated kinase 1 and 2; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; GB, glioblastoma; GSK3 α , glycogen synthase kinase alpha; HA, influenza hemagglutinin; HEK293, human embryonic kidney 293; MEK, mitogen-activated protein kinase; MELK1, maternal embryonic leucine-zipper kinase 1; MST2, mammalian homologue Ste20-like kinase 2; mTORC1, mammalian target of rapamycin complex 1; mTORC2, mammalian target of rapamycin complex 2; NTKD, N-terminus kinase domain; p70S6K, p70 ribosomal S6 kinase; PIM3, provirus integration site for Moloney murine leukemia virus 3; PKA, cAMP-dependent protein kinase; PLK1, polo-like kinase 1; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; raptor, regulatory associated protein of mTOR; rpS6, ribosomal protein S6; RSK, p90 ribosomal S6 kinase; RTK, receptor tyrosine kinase; siRNA, small interfering RNA; TSC1, tuberous sclerosis complex 1; TSC2, tuberous sclerosis complex 2 or tuberin; YB1, Y-box binding protein 1.

* Corresponding author at: Rua Taguá, 440, Liberdade, São Paulo, SP CEP: 01508-010, Brazil. Tel.: +55 11 2189 5000x2979.

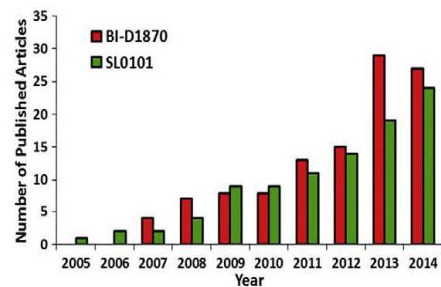
E-mail address: vmartins@cipe.acamargo.org.br (V.R. Martins).

between the Ras-ERK1/2 and mTORC1 pathways. Thus, RSK potentially represents an attractive pharmacological target for GBs.

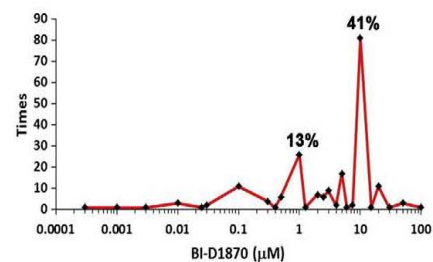
Over the past decade, three RSK inhibitors, including fmk, SL0101, and BI-D1870, have been widely used. Fmk is an irreversible inhibitor of the CTDK of RSK [9], although two caveats restrict its application: 1) it does not inhibit RSK3 [9], and 2) it cannot inhibit RSK when it is activated by mechanisms independent of the CTKD [9,10]. On the other hand, SL0101 [11] and BI-D1870 [12] are both ATP-competitive inhibitors of the NTKD of RSK and are effective against the four RSK isoforms *in vitro*. Correspondingly, an increasing number of cell-based studies continue to use SL0101 or BI-D1870 for inhibition of RSK (Fig. 1A). However, the concentrations published for these inhibitors vary by more than an order of magnitude (Fig. 1B and C). It is possible that these discrepancies are due to the lack of a well-defined reporter (e.g., RSK substrates) to determine the minimum effective concentration of RSK inhibitors in order to avoid nonspecific effects. Indeed, the main RSK substrates that have been used as reporters include ribosomal protein S6 (rpS6), eukaryotic translation initiation factor 4B (eIF4B), and glycogen synthase kinase 3 α and β (GSK3 α and β). However, these substrates can also be phosphorylated by other AGC kinases [13]. For example, S235/236 of rpS6 and S422 of eIF4B can be phosphorylated by RSK and/or p70 ribosomal S6 kinase (p70S6K) [14,15]. RSK may also induce rpS6 phosphorylation by regulating tuberlin (TSC2) and raptor, thereby resulting in activation of mTORC1-p70S6K [16,17]. Phosphorylation of GSK3 α and β is even a more complex process, since these proteins can be phosphorylated by RSK, protein kinase B (Akt), and cAMP-dependent protein kinase (PKA) [12,18–20]. Moreover, GSK3 α and β can also be phosphorylated by p70S6K following loss of the TSC1–TSC2 complex [21]. Therefore, these substrates may not accurately reflect RSK activity depending on their basal phosphorylation levels, cell type, and/or treatment involved. Accordingly, these substrates could be misleading in determinations of optimal concentration for RSK inhibitors.

The most commonly reported concentration for BI-D1870 is 10 μ M (Fig. 1B), and it has been shown to provide good inhibition of GSK3 α and β phosphorylation [12]. However, it was recently reported that Akt activity may be affected by 10 μ M BI-D1870 [22,23]. In addition, both RSK and Akt can phosphorylate the same residues of GSK3 α and β . Therefore, data obtained using these substrates may not be accurate. In another recent article, 10 μ M BI-D1870 was shown to induce p21 expression in a RSK-independent manner, and to induce senescence [24]. Furthermore, *in vitro* studies have shown that PLK1 can be inhibited when BI-D1870 is present at slightly higher concentrations. AuroraB, MELK, PIM3, and MST2 can also be inhibited when BI-D1870 concentrations are 10 times higher than those used for RSKs [12,25]. On the other hand, it has been demonstrated that concentrations lower than 2.5 μ M can affect several biological functions [23,26–36], thereby suggesting that RSK may be inhibited by BI-D1870 at concentrations lower than 10 μ M. Therefore, the results obtained when BI-D1870 has been applied at higher concentrations should be accompanied by an alternative validation method, such as with siRNA targeting of RSK or another RSK inhibitor. However, only 54% of the 114 papers that described studies of RSK and BI-D1870 provided any validation of the results obtained using BI-D1870 (Fig. 1D). Unlike BI-D1870, the concentrations reported for studies of SL0101 are rather variable, with 100 μ M being the most used concentration (Fig. 1C) [24]. There was also a high proportion of papers that described the use of SL0101 as the unique tool to demonstrate the involvement of RSK (Fig. 1D). In addition, in several articles SL0101 was used to validate the effects of BI-D1870 [10,23,28,32,34,37–46], although unexpected differences were observed between the two inhibitors. For example, SL0101 and BI-D1870 were both observed to inhibit glucose uptake, yet by different mechanisms [23]. Moreover, as mentioned above, BI-D1870 can also induce senescence via a p21-dependent mechanism, which is an action not observed for SL0101 [24]. These results suggest that at least one of the inhibitors mediates off-target effects. Moreover, Fonseca et al.

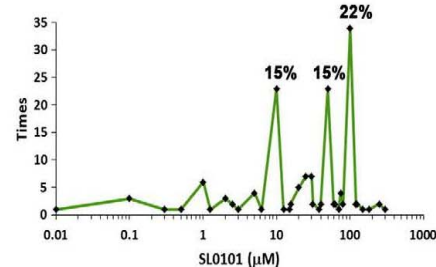
A Use of RSK inhibitors in mammalian cells



B Reported concentrations of BI-D1870



C Reported concentrations of SL0101



D Validation for RSK inhibitor effects

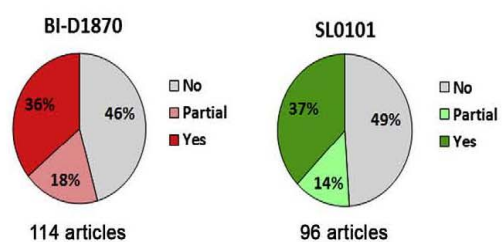


Fig. 1. An analysis of published studies that have used BI-D1870 and SL0101 to inhibit RSK. (A) The number of published studies per year that involved the application of BI-D1870 (red) or SL0101 (green) to a mammalian system (2005–2014). The frequency of the concentrations reported for (B) BI-D1870 and (C) SL0101. In both panels, the highest percentages for the total number of analyzed articles are indicated. (D) The percentage of published reports which demonstrated the effects of BI-D1870 or SL0101 and also confirmed these results using a second system (e.g., overexpression or depletion of RSK; use of constitutively active, kinase dead, or dominant negative mutants of RSK; an alternate chemical inhibitor of RSK). “Partial” indicates that only a subset of the effects demonstrated for the RSK inhibitors was confirmed. The complete list of articles that were used for these analyses is presented in Supplementary Table S1.

reported that RSK was not involved in PMA-induced activation of p70S6K [22], and suggested that the inhibition of p70S6K phosphorylation by BI-D1870 was the result of the off-target inhibition of Akt.

In this study, the effects of SL0101 and BI-D1870 were compared in two widely used human GB-derived cell lines, LN-18 and LN-229. In particular, optimization of the concentrations used to inhibit RSK activity was analyzed. A strong RSK-independent inhibition of mTORC1 by SL0101 was observed. Conversely, BI-D1870 promoted the activation of p70S6K in an ERK1/2 and RSK independent manner. SL0101 was also found to affect cell proliferation to a greater extent than BI-D1870, which represents another important difference between the two inhibitors. One of the proposed mechanisms for the ERK1/2-dependent activation of mTORC1 is the phosphorylation of tuberlin (S1798) by RSK, which inactivates the TSC1–TSC2 complex [16]. Here we show that tuberlin phosphorylation at S1798 is mainly, if not only, dependent on RSK in GB-derived cell lines. However, we were unable to see any involvement of either RSK or tuberlin (S1798) phosphorylation in PMA-induced phosphorylation of p70S6K. Taken together, these results indicate that neither BI-D1870 nor SL0101 should be used as sole indicators of RSK involvement in cellular processes. Moreover, a critical reevaluation of previously published reports is recommended in order to verify the true functions of RSK. The results of the present study also indicate that the phosphorylation of tuberlin (S1798) can be a good reporter to assess the activity of RSK in cells.

2. Experimental procedures

2.1. Data mining

The terms, “BI-D1870” and “SL0101”, were used as queries for searches performed using *Google Scholar*. The last search was conducted on January 19, 2015. Only articles that described the treatment of mammalian cells with these inhibitors were considered. A total of 210 articles were analyzed. A list of these articles is presented in Supplementary Table S1. In addition, panels B and C of Fig. 1 include the concentrations described in each of these papers. In the case of concentration curves of the inhibitors, the concentration of each point of the curve was considered to design the graph.

2.2. Antibodies and reagents

SL0101 was purchased from Tocris (although in some experiments SL0101 from Calbiochem was used and the same results were achieved). BI-D1870 was purchased from Enzo®. Both inhibitors were dissolved in DMSO. Rapamycin, EGF, and PMA were purchased from Sigma. PF4708671 was purchased from Calbiochem. U0126 was purchased from Promega. P(S235/236)-rpS6 (#4857), P(S240/S244)-rpS6 (#2215), rpS6 (#2317), P(T389)-p70S6K (#9234), p70S6K (#2705), P(T37/46)-4E-BP1 (#9459), 4E-BP1 (#9452), P(S473)-Akt (#9271), P(T308)-Akt (#2965), Akt (#9272), P(S380)-RSK1 (#9341), RSK1 (#9333), RSK2 (#9340), P(S422)-eIF4B (#3591), eIF4B (#3592), P(T202/Y204)-ERK1/2 (#9101), and ERK1/2 (#9102) antibodies were purchased from Cell Signaling Technology. P(S21)-GSK3 α was purchased from Signalway. P(S1798)-tuberlin (sc-293149), tuberlin (sc-893), rpS6 (sc-74459), RSK3 (sc-1431), RSK4 (sc-100424), and RSK1 (sc-231) antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology.

2.3. Cell culture, transfections, and treatments

LN-18 (ATCC® CRL-2610), LN-229 (ATCC® CRL-2611), and HEK293 (ATCC® CRL-1573) cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), high glucose, GlutaMAX, pyruvate (Gibco®) containing 10% fetal calf serum (growth medium). Transfections were performed using 4.5 μ l Lipofectamine® 2000 (Invitrogen™), according to the manufacturer's instructions, in 35 mm dishes with a final volume of 1.5 ml Opti-MEM® (Gibco®). A total of 200 pmol siRSK1 plus 200 pmol siRSK2, or the equivalent amounts of scrambled oligonucleotides

(the sequences are presented in Supplementary Table S2) were applied for transfections. After 6 h, medium was replaced with fresh growth medium. After an additional 24 h, cells were serum-starved for 2 days (LN-18 and LN-229) or 1 day (HEK293) prior to treatments. Where indicated, cells were pretreated with 100 nM rapamycin or the indicated amount of RSK inhibitors for 30 min. PF4708671 at 20 μ M was added for 30 min before pretreatment with the RSK inhibitors. U0126 at 20 μ M was added for 30 min before pretreatment with the RSK inhibitors, however, in Fig. 6(E), 10 μ M U0126 was added together with the RSK inhibitors for 30 min. After pretreatment, cells were subsequently treated with 100 ng/ml PMA or 50 ng/ml EGF for 15 min. LN-18 cells were transfected to express influenza hemagglutinin (HA)-tagged RSK3 (HA-RSK3) or RSK4 (HA-RSK4) using Lipofectamine® 2000 (Invitrogen™). These plasmids were previously described [47].

2.4. Cell lysis and immunoblotting

Cells were lysed in 50 mM Tris–HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 1 mM EDTA, and 1 mM EGTA supplemented with a protease and phosphatase inhibitor cocktail (Roche and Thermo Fisher Scientific, respectively). Immunoblots were performed as previously described [48].

2.5. BrdU incorporation

Serum-starved LN-229 cells were pretreated for 30 min with chemical inhibitors and incubated for 16 h with or without EGF (50 ng/ml). Cells were then incubated with BrdU for 4–5 h and assayed using a BrdU Cell Proliferation Assay kit (#6813, Cell Signaling Technology).

3. Results

3.1. SL0101 and BI-D1870 differentially affect p70S6K and rpS6 phosphorylation in an ERK1/2-independent manner

To compare the effects of SL0101 and BI-D1870 on RSK-mediated phosphorylation of rpS6, two widely used cell lines derived from human GBs were examined, LN-18 and LN-229. In non-stimulated cells, it was expected that the RSK inhibitors display no effect or a reduction in the basal levels of rpS6 and p70S6K phosphorylation, depending on the activation of RSK (Fig. 2A). Serum-starved LN-229 cells were incubated with 50 μ M SL0101 or BI-D1870 at 1 μ M or 10 μ M. SL0101 inhibited both p70S6K and rpS6 phosphorylation after 150 min (Fig. 2B, C and D). Conversely, 1 μ M BI-D1870 did not affect the phosphorylation of p70S6K, and rpS6 was scarcely reduced. However, 10 μ M BI-D1870 strongly induced p70S6K activation after 90 min of incubation (Fig. 2D). Next, serum-starved LN-18 cells were individually treated with 100 μ M SL0101, 1 μ M BI-D1870, and 10 μ M BI-D1870, and the levels of p70S6K and rpS6 phosphorylation were analyzed (Fig. 2E, F and G). As previously observed in LN-229 cells, SL0101 behaved very differently from BI-D1870. BI-D1870 at 10 μ M stimulated the phosphorylation of rpS6 and p70S6K, displaying a peak at 90 min. SL0101 at 100 μ M strongly reduced p70S6K phosphorylation after 45 min of incubation, and this was followed by a reduction in rpS6 phosphorylation beginning at 90 min. A lower concentration of BI-D1870 (1 μ M) was also observed to modestly increase phosphorylation levels of p70S6K and rpS6. The effects of the RSK inhibitors on p70S6K phosphorylation implied that mTORC1 activity was affected. Accordingly, the phosphorylation of other target of mTORC1, 4E-BP1, was also reduced in the presence of SL0101, however, BI-D1870 did not exhibit the same effect (Supplementary Fig. S1).

The opposite effects of BI-D1870 and SL0101 on rpS6 and p70S6K phosphorylation indicated that at least one of the RSK inhibitors possesses nonspecific activities. The function of RSK1 and RSK2 depends on their direct activation by ERK1/2 [2]. In the absence of ERK1/2 activity, RSK1 and RSK2 cannot become activated and any effect displayed by

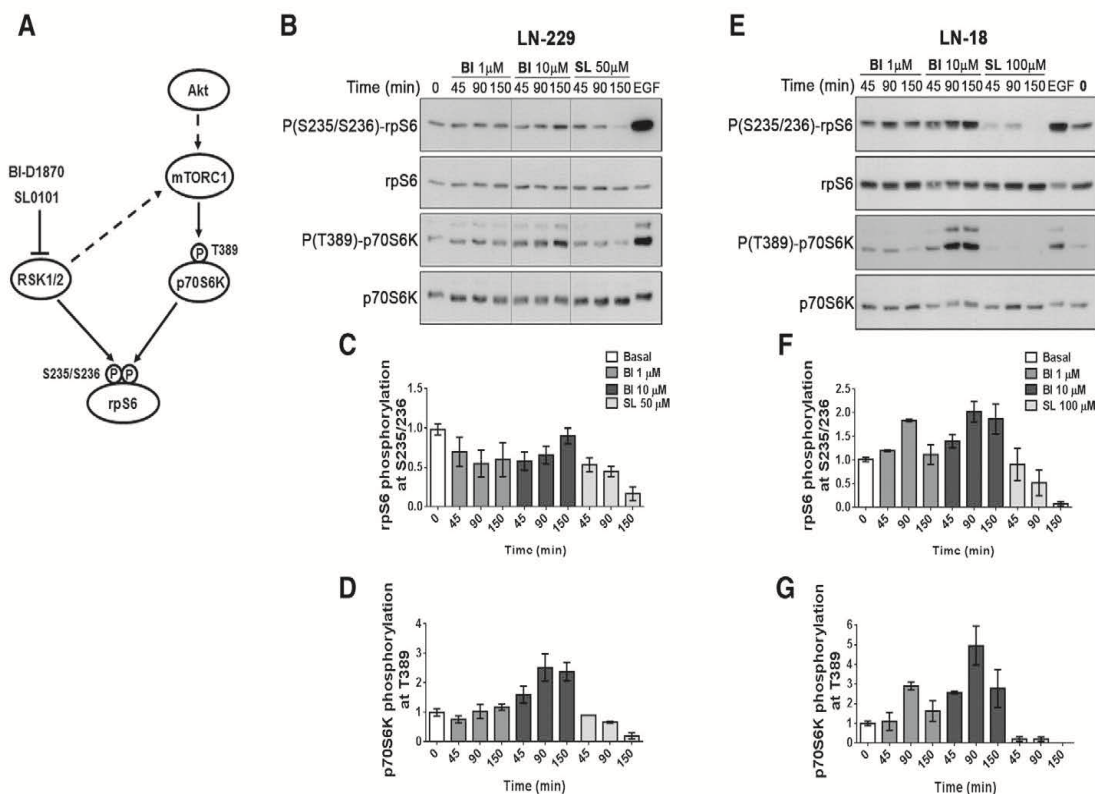


Fig. 2. SL0101 and BI-D1870 promote different effects in glioblastoma-derived cell lines. (A) This illustration indicates the expected effect of the RSK inhibitors, BI-D1870 and SL0101, on the phosphorylation of rpS6 and p70S6K, and the phosphorylated residues of each protein. (B) Serum-starved LN-229 cells were treated with the indicated concentrations of SL0101 or BI-D1870. After the indicated times, cell extracts were prepared and the proteins were detected by western blot. Cells treated with EGF were used as a positive control. For clarity, two unused lanes were eliminated from the film (indicated with vertical lines). Quantification of (C) rpS6 and (D) p70S6K phosphorylation was determined from at least three independent experiments ($\pm$ SEM). Basal phosphorylation levels were obtained from cells incubated for 150 min with DMSO and no RSK inhibitor. (E) Serum-starved LN-18 cells were treated with the indicated concentrations of SL0101 or BI-D1870. At the indicated times, extracts were prepared and western blotting detected levels of the indicated proteins. Cells treated with EGF were used as a positive control. Quantification of (F) rpS6 and (G) p70S6K phosphorylation is also shown. The mean levels ($\pm$ SEM) determined from at least three independent experiments are shown.

SL0101 or BI-D1870 can be considered as RSK independent. Thus, we pretreated the cells with the MEK specific inhibitor, U0126, to inhibit ERK1/2 and study the RSK independent effects of SL0101 and BI-D1870 on rpS6 and p70S6K phosphorylation (Fig. 3A). In the presence of U0126, the phosphorylation of ERK1/2 was completely abolished in both cell lines, indicating the complete inhibition of ERK1/2 (Fig. 3B and 3E). In this condition, the phosphorylation of rpS6 and p70S6K was strongly reduced by 100 μ M SL0101 in LN-229 cells (Fig. 3C and D). Conversely, 10 μ M BI-D1870 induced p70S6K phosphorylation (Fig. 3D). It is important to mention that the levels of Akt phosphorylation in LN-229 cells remained undetectable after the treatment with U0126, which suggests that the SL0101 effect on p70S6K is not dependent on Akt inhibition (Supplementary Figure S2A). In LN-18 cells that were pretreated with U0126, the phosphorylation of rpS6 and p70S6K was stimulated by 10 μ M BI-D1870 (Fig. 3F and G). U0126 promoted an increase in Akt phosphorylation in LN-18 cells, and this was probably a mechanism of compensation for MEK-ERK1/2 inhibition (Supplementary Figure S2B). This might be the reason for the modest effect of SL0101 on p70S6K phosphorylation in LN-18 cells. These results indicate that both inhibitors display ERK1/2 and RSK-independent effects that affect mTORC1. While SL0101 inhibits mTORC1-p70S6K, BI-D1870 induces p70S6K activation.

3.2. RSK1 and RSK2 depletion inhibit PMA-induced phosphorylation of tuberin but not of p70S6K phosphorylation

It was proposed that RSK can mediate the activation of mTORC1-p70S6K upon treatment with PMA, and the phosphorylation of tuberin

at S1798 by RSK was involved in this process (Fig. 4A) [16]. To determine the effect of RSK on p70S6K phosphorylation in GB-derived cell lines, two different sets of siRNAs (a and b) designed to target both *Rsk1* and *Rsk2* were transfected into the cells. It should also be noted that neither LN-18 nor LN-229 cell lines express detectable levels of RSK3 or RSK4 (Fig. 4B). LN-229 cells were transfected with the two different sets of siRNA and after undergoing serum starvation, cells were treated with PMA for 15 min to activate ERK1/2. Set a reduced the expression of RSK1 and RSK2 by 70.7% and 89.6%, respectively (Supplementary Fig. S3A), while set b decreased the levels of RSK1 and RSK2 by 76% and 93.7%, respectively (Supplementary Fig. S3B). The PMA-induced phosphorylation of tuberin was reduced in cells depleted of RSK (Fig. 4C and F, and Supplementary Fig. S3C and S3F). However, RSK depletion did not reduce PMA-induced phosphorylation of p70S6K (Fig. 4E and Supplementary Fig. S3E). A slight reduction of rpS6 phosphorylation was observed in cells transfected with siRSK1/2, being more evident with set b (Fig. 4D and Supplementary Fig. S3D). These results suggest that PMA-induced phosphorylation of p70S6K is not mediated by the RSK-dependent phosphorylation of tuberin, which is consistent with the results obtained using other cell lines [22].

LN-18 cells were also transfected with the siRNAs and then, serum starved. Depletion of RSK1 and RSK2 in LN-18 cells was less effective in comparison to LN-229 cells (Supplementary Fig. S4A and S4B). However, reduction of PMA-induced tuberin phosphorylation was still evident in RSK-depleted LN-18 cells (Figs. 4G and J, and Supplementary Fig. S4C and S4F). Also in this case, the reduction in tuberin phosphorylation was not followed by a reduction in the phosphorylation

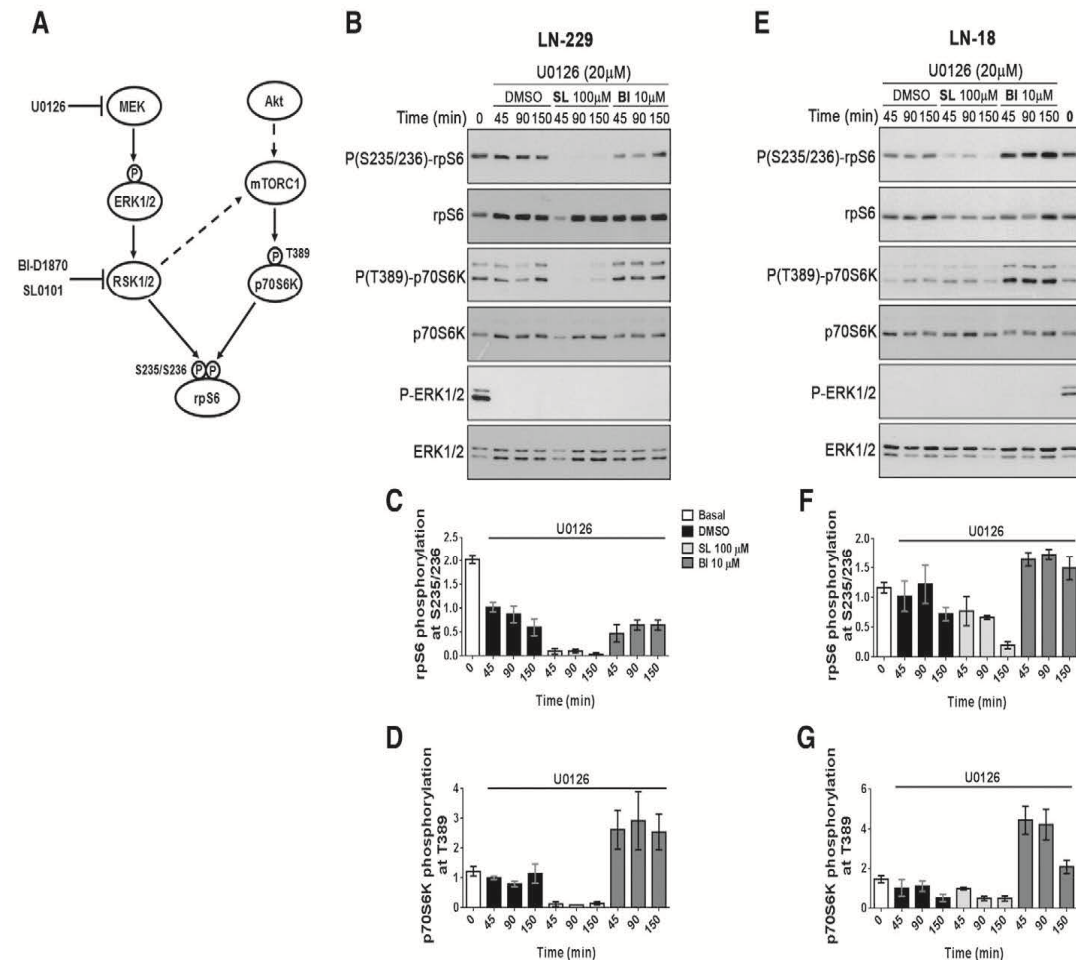


Fig. 3. SL0101 and BI-D1870 promote ERK1/2 and RSK-independent effects. (A) This illustration indicates the expected effect of U0126, BI-D1870 and SL0101 on the phosphorylation of rpS6 and p70S6K, and the phosphorylated residues of each protein. (B) Serum-starved LN-229 cells were pretreated with U0126 for 30 min and then treated with the indicated concentrations of SL0101 or BI-D1870. After the indicated times, cell extracts were prepared and the proteins were detected by western blot. Quantification of (C) rpS6 and (D) p70S6K phosphorylation was determined from at least three independent experiments ($\pm$ SEM). Basal phosphorylation levels were obtained from cells incubated for 150 min with DMSO and no inhibitor. (E) Serum-starved LN-18 cells were pretreated with U0126 for 30 min and then treated with the indicated concentrations of SL0101 or BI-D1870. At the indicated times, extracts were prepared and western blotting detected levels of the indicated proteins. Quantification of (F) rpS6 and (G) p70S6K phosphorylation is also shown. The mean levels ($\pm$ SEM) determined from at least three independent experiments are shown.

of p70S6K and rpS6 (Fig. 4H and I, and Supplementary Fig. S4D and S4E). The phosphorylation of rpS6 at S235/S236 can be mediated by RSK and/or p70S6K. Since LN-18 cells exhibit hyperactivation of Akt [49], high levels of p70S6K phosphorylation at T389 (phosphorylated by mTORC1), and rpS6 phosphorylation at S235/S236 are observed (Supplementary Fig. S5). Thus, to detect the phosphorylation of rpS6 by RSK we used the mTORC1 inhibitor, rapamycin (Fig. 4A). LN-18 cells were transfected and serum-starved before pretreatment with rapamycin to prevent p70S6K-dependent phosphorylation of rpS6. The efficiency of siRSK1/2 remained unaltered in the experiments using rapamycin (Supplementary Fig. S4G and S4H). PMA-induced phosphorylation of tuberin and rpS6 was reduced in LN-18 cells depleted of RSK (Fig. 4K, L and M, and Supplementary Fig. S4I, S4J and S4K). While tuberin phosphorylation consistently reflected the reduction in RSK levels, the effects of RSK depletion on the phosphorylation of S235/236 of rpS6 were only evident upon inhibition of p70S6K. These results indicate that in LN-18 cells the contribution of RSK to the levels of rpS6 phosphorylation is minimal.

3.3. Effects of SL0101 and BI-D1870 on PMA-induced phosphorylation of p70S6K and rpS6 in HEK293 and LN-229 cells

A cell line that was not derived from glioblastoma was included to

of p70S6K and rpS6. Serum-starved HEK293 cells were pretreated with RSK inhibitors prior to PMA stimulation. The PMA-induced rpS6 phosphorylation was inhibited by SL0101 and BI-D1870 at concentrations higher than 1 μ M (Fig. 5A and B). However, SL0101 strongly inhibited PMA-induced p70S6K phosphorylation, while BI-D1870 did not (Fig. 5C). Since p70S6K can also phosphorylate rpS6, the actual effect of the RSK inhibitors on rpS6 phosphorylation could be masked. We then pretreated the cells with rapamycin to prevent p70S6K activation, and observed that 1 μ M BI-D1870 became a potent inhibitor of rpS6 phosphorylation (Fig. 5A). In the presence of rapamycin, SL0101 continued to inhibit rpS6 phosphorylation but showing a lower potency than 1 μ M BI-D1870. It is important to note that rapamycin did not change the levels of PMA-induced RSK1 phosphorylation (Supplementary Fig. S6A). To validate the use of rapamycin, HEK293 cells were also pretreated with a p70S6K specific inhibitor, PF4708671 [50]. Pretreatment with PF4708671 (30 min), slightly reduced the levels of PMA-induced RSK1 phosphorylation, probably in a nonspecific manner (Supplementary Fig. S6B). However, this small effect did not interfere with the experiments using the RSK inhibitors. The effects of BI-D1870 and SL0101 on rpS6 phosphorylation in the presence of PF4708671 were similar to those obtained in the presence of rapamycin (Fig. 5D).

Next, the effects of PMA on serum-starved LN-229 cells pretreated

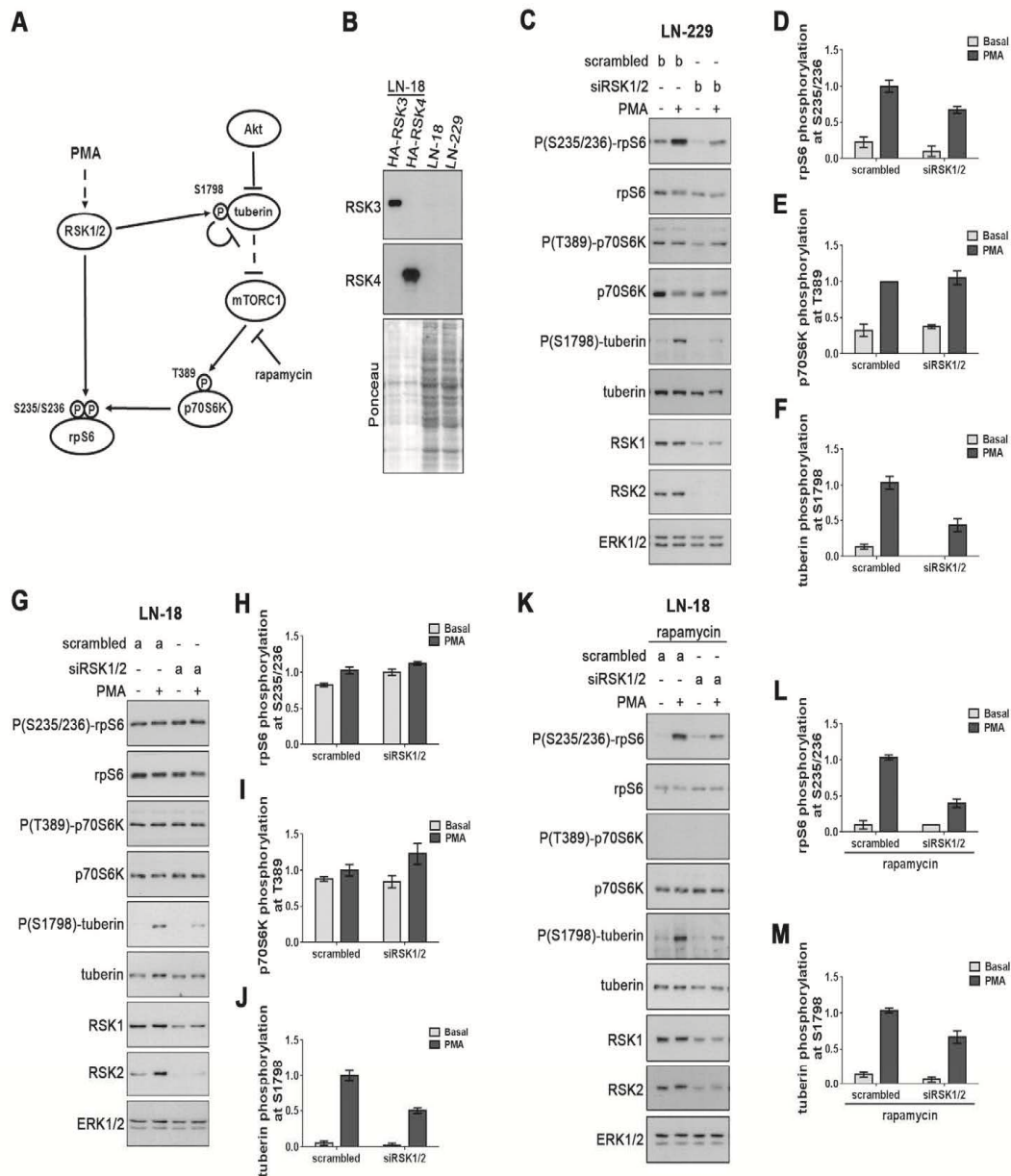


Fig. 4. Effect of RSK1 and RSK2 depletion on the phosphorylation of rpS6, p70S6K and tuberin. (A) This scheme illustrates the phosphorylation of tuberin at S1798 by RSK, which was proposed to lead to the inhibition of the tuberous sclerosis complex and thus, to the activation of mTORC1. The inhibition of p70S6K by the mTORC1 inhibitor, rapamycin, is also shown. (B) To detect levels of RSK3 and RSK4, extracts of LN-18 and LN-229 cells were analyzed by western blot (15 µg each). As positive controls, HA-RSK3 and HA-RSK4 were individually expressed in LN-18 cells and 5 µg of each extract was analyzed. A Ponceau-stained membrane is shown below and was used as a loading control. (C) LN-229 cells were transfected with siRNA targeting *Rsk1* and *Rsk2* (set b), or with the corresponding scrambled oligonucleotides. Following serum starvation, cells were treated with PMA for 15 min. Western blots were then performed to detect the indicated proteins. Quantification of (D) rpS6, (E) p70S6K and (F) tuberin phosphorylation was determined from at least three independent experiments ($\pm$ SEM). (G) LN-18 cells were transfected with siRNA targeting *Rsk1* and *Rsk2* (set a), or with the corresponding scrambled oligonucleotides. Following serum starvation, cells were treated with PMA for 15 min and western blots were performed to detect the indicated proteins. The graphs in (H), (I) and (J) present the mean levels of phosphorylation determined for rpS6, p70S6K and tuberin, respectively, from three independent experiments ($\pm$ SEM). (K) LN-18 cells were transfected with siRNA targeting *Rsk1* and *Rsk2* (set a), or with the corresponding scrambled oligonucleotides. Following serum starvation, cells were pretreated with rapamycin for 30 min, followed by PMA treatment for 15 min. Western blots were then performed to detect the indicated proteins. Quantification of (L) rpS6 and (M) tuberin phosphorylation was determined from at least three independent experiments ($\pm$ SEM).

inhibited the PMA-induced phosphorylation of rpS6 (Fig. 6A and B). However, while 100 µM SL0101 strongly reduced the phosphorylation of p70S6K, BI-D1870 induced a modest increase (Fig. 6C). Conversely, the phosphorylation of tuberin was reduced by both SL0101 and BI-D1870 (Fig. 6D). The phosphorylation of p70S6K did not follow the reduction in tuberin phosphorylation induced by BI-D1870, which

suggests that BI-D1870 is inducing p70S6K phosphorylation in a RSK and tuberin-independent manner. Since the different effects of SL0101 and BI-D1870 on the activation of p70S6K could mask the true effects of RSK inhibition on PMA-induced rpS6 phosphorylation, rapamycin was used to eliminate p70S6K contribution. Rapamycin pretreatment slightly increased PMA-induced RSK1 phosphorylation, however, this

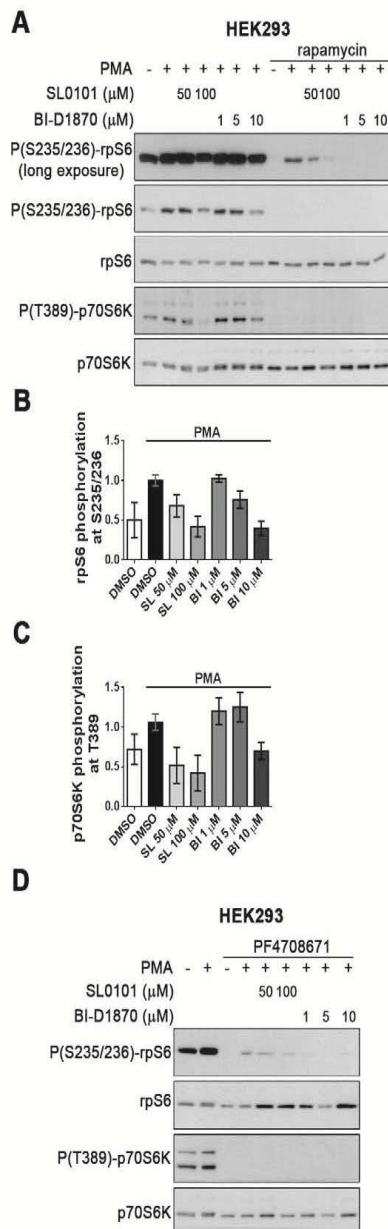


Fig. 5. SL0101 and BI-D1870 elicit different effects on PMA-induced p70S6K and rpS6 phosphorylation in HEK 293 cells. (A) Serum-starved HEK293 cells were pretreated with the indicated concentrations of SL0101 and BI-D1870 in the presence or absence of rapamycin for 30 min before PMA was added. Western blots were subsequently performed to detect levels of the indicated proteins. Levels of (B) rpS6 and (C) p70S6K phosphorylation were quantitated for cells that were not treated with rapamycin. Mean values were determined from at least four independent experiments ($\pm$ SEM) and are shown. (D) Serum-starved HEK293 cells were pretreated with the indicated concentrations of SL0101 and BI-D1870 in the presence or absence of the p70S6K inhibitor, PF4708671, for 30 min before PMA was added. Western blots were subsequently performed to detect levels of the indicated proteins.

small effect did not interfere with the effects of the RSK inhibitors (Supplementary Fig. S7A). In the absence of p70S6K activity both inhibitors strongly inhibited rpS6 phosphorylation in all concentrations tested (Fig. 6A). The effects of BI-D1870 and SL0101 on tuberin phosphorylation remained essentially the same in the presence of rapamycin

(Fig. 6D). These results suggested that 10 μ M BI-D1870 is more potent than 100 μ M SL0101 for the inhibition of tuberin phosphorylation, and thus of RSK activity. To validate the stronger effect of 10 μ M BI-D1870, phosphorylation of GSK3 α (S21) was analyzed as another readout for RSK function, particularly since LN-229 cells are characterized by low levels of Akt activity (Fig. 6E). Treatment with 100 μ M SL0101 was found to inhibit PMA-induced GSK3 α phosphorylation with potency comparable to 1 μ M BI-D1870 (Fig. 6F). Moreover, both 5 μ M and 10 μ M BI-D1870 further inhibited GSK3 α phosphorylation, consistent with their effects on tuberin phosphorylation (Fig. 6D).

Since RSK depletion by siRNA did not affect p70S6K phosphorylation, the strong inhibition of PMA-induced p70S6K phosphorylation by SL0101 was unexpected and probably nonspecific. To study the off-target effects of SL0101 on the mTORC1 pathway, we pretreated LN-229 cells with U0126 to prevent ERK1/2-RSK activation, and treated the cells with SL0101 and BI-D1870 before the incubation with EGF (Fig. 6G). In these conditions EGF should only activate p70S6K by the PI3K-Akt-mTORC1 pathway. Moreover, pretreatment of LN-229 cells with U0126 increased EGF-dependent Akt phosphorylation, probably as a compensatory mechanism to MEK-ERK1/2 inhibition (Supplementary Fig. S7B). However, this effect was not accompanied by a corresponding increase in p70S6K and rpS6 phosphorylation (Fig. 6H). The phosphorylation of ERK1/2, RSK1 and tuberin was completely abolished in the presence of U0126 (Fig. 6H). Remarkably, the phosphorylation of p70S6K and rpS6 was strongly inhibited by SL0101, even in the absence of activated ERK1/2-RSK (Figs. 6I and J), indicating that SL0101 is indeed inhibiting mTORC1 in a RSK-independent manner.

3.4. Determining the optimal concentration for RSK inhibitors in LN-18 cells

In the absence of rapamycin, depletion of RSK1 and RSK2 in LN-18 cells showed no effect on PMA-induced phosphorylation of rpS6 and p70S6K (Fig. 4). Next, the effects of SL0101 and BI-D1870 were studied in serum-starved LN-18 cells treated with PMA. While BI-D1870 did not change the levels of rpS6 and p70S6K phosphorylation, SL0101 reduced the PMA-induced phosphorylation of both rpS6 and p70S6K (Fig. 7A, B and C). Conversely, both inhibitors modestly reduced the levels of PMA-induced phosphorylation of tuberin (Fig. 7D). In LN-229 cells, SL0101 showed a potent inhibitory activity on mTORC1 that was independent of RSK inhibition (Fig. 6). We thus prevented ERK1/2-RSK activation by treating LN-18 cells with 10 μ M U0126 in order to check for off-target effects of SL0101 and BI-D1870. Similar to LN229 cells, the pretreatment of LN18 cells with U0126 resulted in increased levels of EGF-induced Akt phosphorylation that were not followed by increased phosphorylation of p70S6K and rpS6 (Supplementary Fig. S8A). It is noteworthy that a lower concentration and incubation time of U0126 was used for LN-18 cells. In LN-18 cells, the phosphorylation of rpS6 was impaired by the stronger treatment used for LN-229 cells (Supplementary Fig. S9). In the absence of ERK1/2 activity, EGF should only activate p70S6K by the PI3K-Akt-mTORC1 pathway. As expected, the phosphorylation of ERK1/2, RSK1 and tuberin was strongly abolished in the presence of U0126 (Fig. 7E). BI-D1870 showed no important change in EGF-induced phosphorylation of rpS6 and p70S6K (Fig. 7F and G). However, the phosphorylation of p70S6K and, to a lesser extent, of rpS6, was reduced by SL0101, even when ERK1/2 was inhibited, indicating that SL0101 is indeed inhibiting mTORC1 in a RSK-independent manner also in LN-18 cells (Fig. 7G).

The activity of p70S6K was differentially affected by the two inhibitors, which could mask the real RSK-dependent phosphorylation of rpS6. Thus LN-18 cells were pretreated with a specific p70S6K inhibitor, PF4708671, before the incubation of the cells with SL0101 and BI-D1870 (Fig. 7H). In this condition, PMA-induced phosphorylation of rpS6 was inhibited by both SL0101 and BI-D1870 (Fig. 7I). Thus, different effects of the RSK inhibitors on rpS6 phosphorylation are the result of their different modulation of p70S6K activation. A similar result was obtained by using the mTORC1 inhibitor, rapamycin, to avoid p70S6K activation

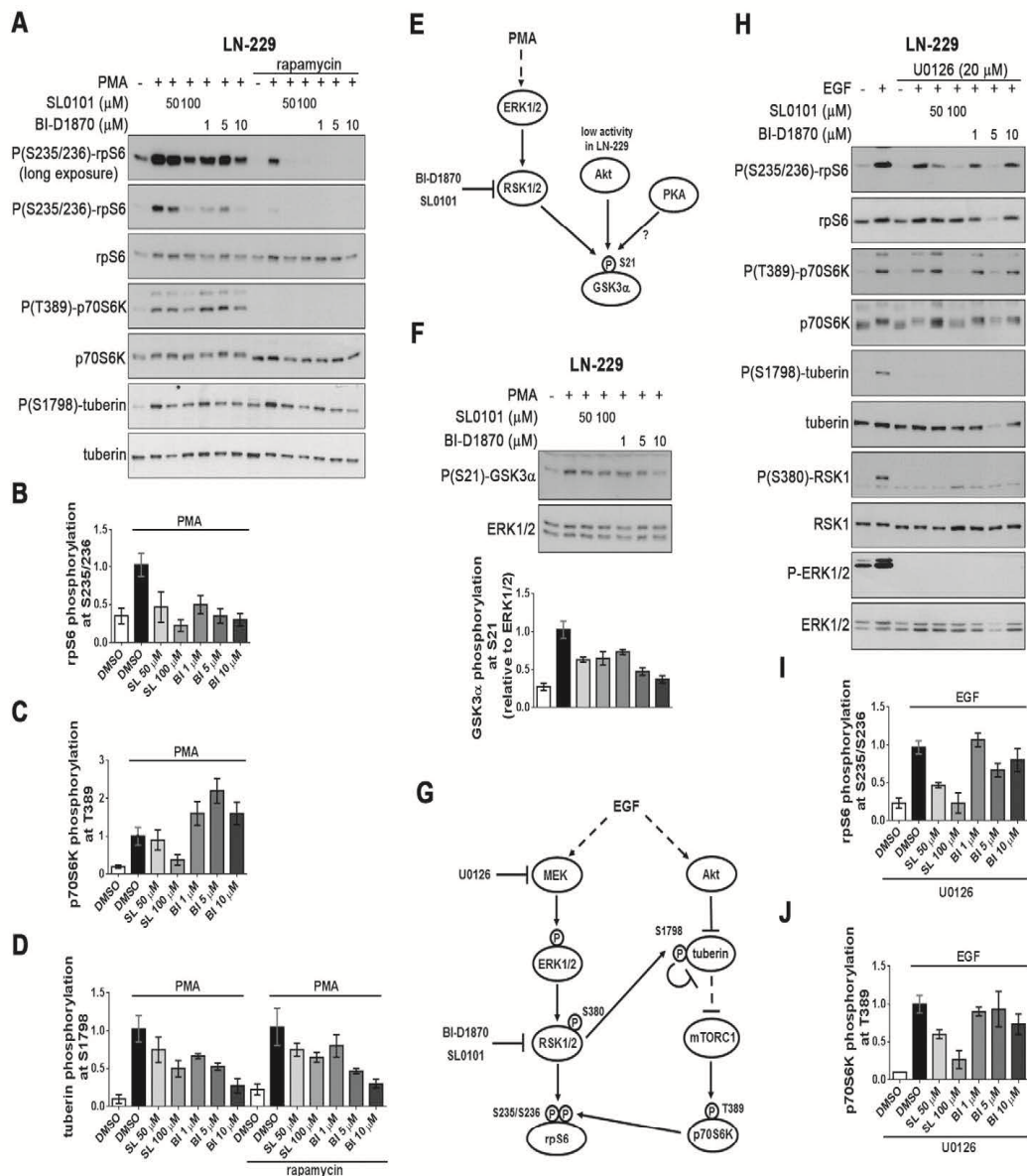


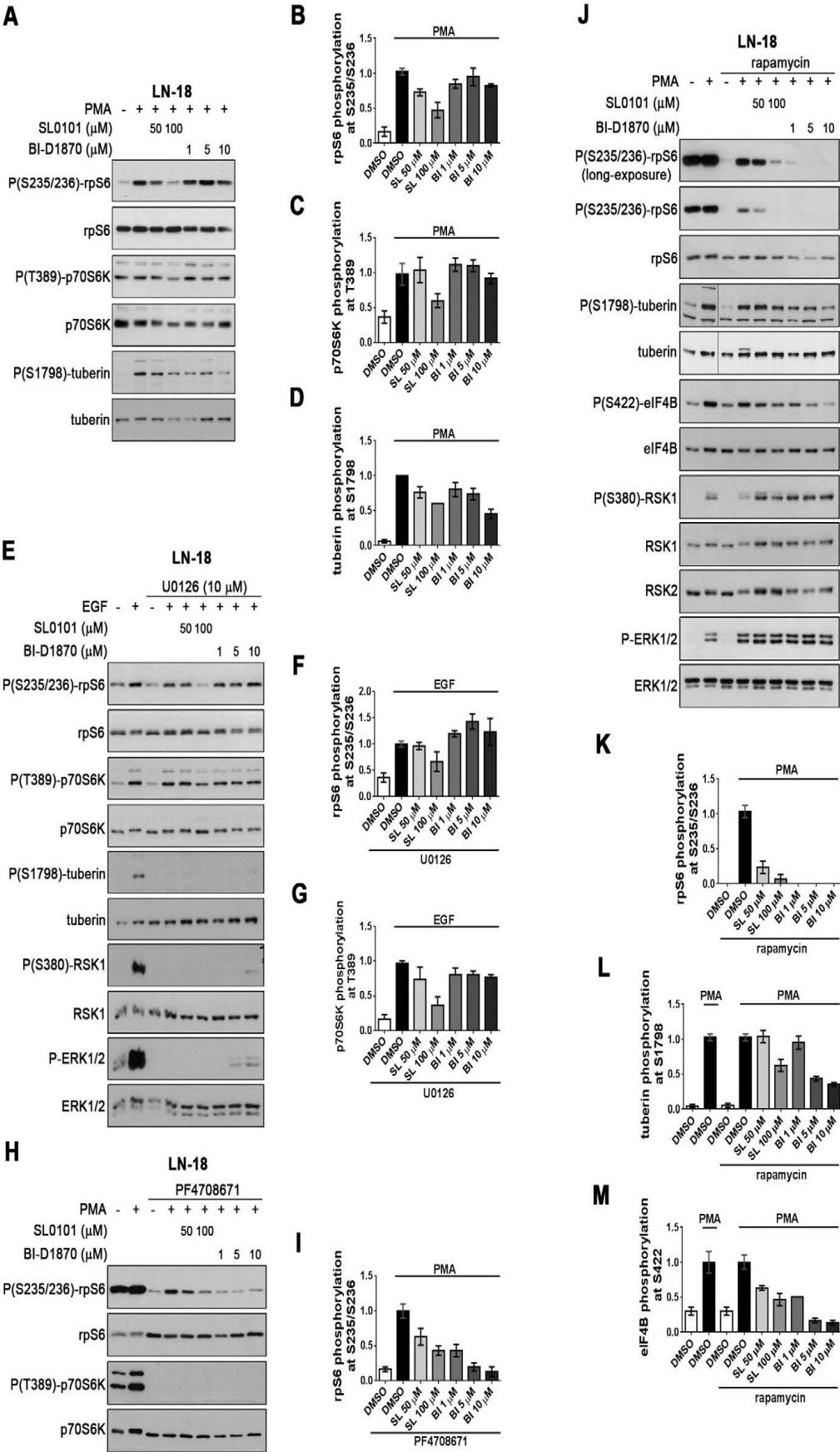
Fig. 6. SL0101 inhibits PMA-induced p70S6K phosphorylation in an ERK and RSK-independent manner in LN-229 cells. (A) Serum-starved LN-229 cells were pretreated with the indicated concentrations of RSK inhibitors in the presence or absence of rapamycin for 30 min prior to the addition of PMA. Western blots were performed for the indicated proteins. Quantification of (B) rpS6 and (C) p70S6K phosphorylation from the cells treated in the absence of rapamycin is shown, with mean values determined from at least three independent experiments ($\pm$ SEM). (D) Quantification of tuberin phosphorylation is shown, with mean values determined from at least three independent experiments ($\pm$ SEM). (E) A scheme showing the kinases that phosphorylate GSK3 α . (F) Western blotting was used to detect levels of GSK3 α phosphorylation (S21) in cells that were pretreated with the indicated concentrations of RSK inhibitors in the absence of rapamycin for 30 min prior to the addition of PMA. Detection of ERK1/2 was used as a loading control. The accompanying graph below presents the mean values from at least three independent experiments ($\pm$ SEM). (G) A scheme showing the expected effects of U0126 on EGF-induced p70S6K and rpS6. (H) Serum-starved LN-229 cells were pretreated with 20 μ M of the MEK inhibitor, U0126, for 30 min before the addition of the indicated concentrations of RSK inhibitors for another 30 min prior to the addition of EGF. Western blots were performed for the indicated proteins. Levels of (I) rpS6 and (J) p70S6K phosphorylation were quantitated for cells that were treated with U0126. Mean values were determined from three independent experiments ($\pm$ SEM) and are shown.

(Fig. 7). We observed a slight reduction of PMA-dependent RSK1 phosphorylation in the presence of PF4706871 or rapamycin, however, this small effect did not preclude this approach for the study of SL0101 and BI-D1870 in conditions where p70S6K was inhibited (Supplementary Fig. S8B and S8C). In the presence of PF4706871 or rapamycin (30 min pretreatment), the phosphorylation of rpS6 was more inhibited by the higher concentrations of BI-D1870 (Fig. 7I and K). Accordingly, other direct-targets of RSK, tuberin (S1798) and eIF4B (S422), were more potently inhibited by the higher concentrations of BI-D1870 (5 and 10 μ M) than by 100 μ M

SL0101 (Fig. 7L and M). In LN-229 cells in the absence of rapamycin, a similar inhibition pattern was observed for other RSK-direct target, P(S21)-GSK3 α (Fig. 6F). These results confirm that 10 μ M BI-D1870 inhibits the phosphorylation of most RSK targets stronger than 100 μ M SL0101.

3.5. The phosphorylation of Akt in the presence of SL0101 and BI-D1870

It is possible that the different effects of the RSK inhibitors on mTORC1 activity are the result of the differential modulation of Akt.



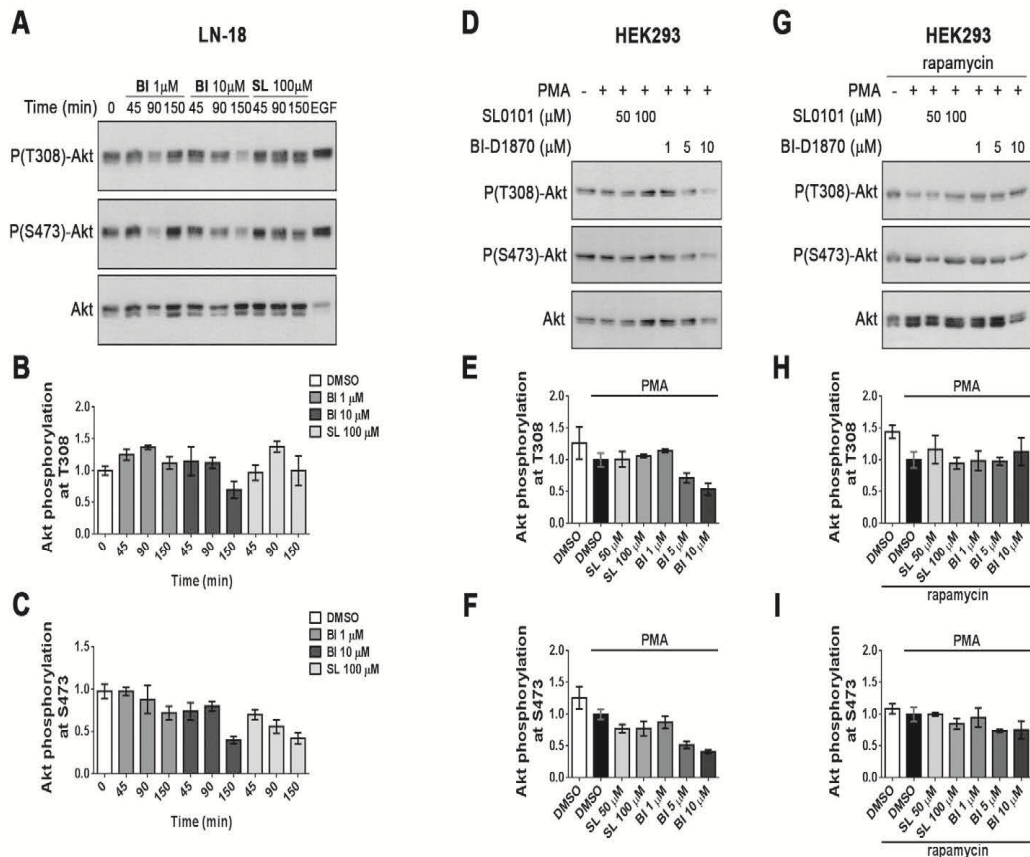


Fig. 8. The effects of RSK inhibitors on Akt phosphorylation. (A) Serum-starved LN-18 cells were treated with the indicated concentrations of SL0101 or BI-D1870 as in Fig. 2(E). At the indicated times, extracts were prepared and western blotting detected levels of the indicated proteins. Cells treated with EGF were used as a positive control. Quantification of Akt phosphorylation at (B) T308 and (C) S473 are shown. The mean values from at least three independent experiments ($\pm$ SEM) are presented. (D) Serum-starved HEK293 cells were pretreated with the indicated concentrations of RSK inhibitors in the absence of rapamycin, followed by an incubation with PMA for 15 min. Cell extracts were western blotted to detect Akt phosphorylation. Graphs showing the quantification of Akt phosphorylation at (E) T308 and (F) S473 are shown. These values represent the mean of at least three independent experiments ($\pm$ SEM). (G) The same experiment was performed as described in (D), except treatment with rapamycin was included. Graphs showing the quantification of Akt phosphorylation at (H) T308 and (I) S473 in the presence of rapamycin are shown. These values represent the mean of at least three independent experiments ($\pm$ SEM).

To address this possibility, serum-starved LN-18 cells were individually treated with 100 μ M SL0101, 1 μ M BI-D1870, and 10 μ M BI-D1870, as for Fig. 2E. No important alteration in Akt phosphorylation was induced by 1 μ M BI-D1870 (Fig. 8A, B and C). However Akt phosphorylation was reduced by 10 μ M BI-D1870 after 150 min (Fig. 8B and C). In this manner, we can conclude that the strong activation of p70S6K phosphorylation by 10 μ M BI-D1870 at shorter times (Fig. 2E) was not elicited by an activation of Akt. SL0101 reduced only Akt phosphorylation at S473 but not at T308, suggesting that mTORC2 might be affected by the inhibitor [51]. PMA-induced Akt phosphorylation was analyzed in HEK293 cells. Neither SL0101 nor 1 μ M BI-D1870 reduced the levels of phosphorylated Akt, however, 5 and 10 μ M BI-D1870 inhibited Akt. Remarkably, PMA-induced p70S6K phosphorylation was reduced by the highest concentration tested of BI-D1870 (10 μ M) in HEK293 cells

(Fig. 5C). It was previously suggested that the effect of 10 μ M BI-D1870 on PMA-induced phosphorylation of p70S6K would be mediated via nonspecific inhibition of Akt [22]. To reconcile the activation of p70S6K elicited by 10 μ M BI-D1870 in unstimulated GB-derived cells with both, the reported off-target inhibition of Akt and the reduction of Akt phosphorylation by high concentrations of BI-D1870, we hypothesized that p70S6K could be triggering a negative feedback that reduces Akt activation [52]. Accordingly, when cells were pretreated with rapamycin, the inhibitory effect on Akt by high concentrations of BI-D1870 was precluded (Fig. 8G, H and I). Previously it was shown that rapamycin treatment alone can induce phosphorylation of Akt at S473 [53]. However, this effect was not observed when HEK293 cells were treated with rapamycin for 45 min in the presence or absence of PMA (Supplementary Fig. S10). These results suggest that at least at shorter

Fig. 7. Determining the optimal concentration for RSK inhibitors in LN-18 cells. (A) Serum-starved LN-18 cells were pretreated with the indicated concentrations of RSK inhibitors for 30 min prior to the addition of PMA. Western blots were performed for the indicated proteins. Quantification of (B) rpS6, (C) p70S6K and (D) tuberin phosphorylation is shown, with mean values determined from at least three independent experiments ($\pm$ SEM). (E) Serum-starved LN-18 cells were pretreated with the indicated concentrations of RSK inhibitors in the presence of 10 μ M of the MEK inhibitor, U0126, for 30 min before the addition of EGF for another 15 min. Western blots were performed for the indicated proteins. Levels of (F) rpS6 and (G) p70S6K phosphorylation were quantitated for cells that were treated with U0126. Mean values were determined from three independent experiments ($\pm$ SEM) and are shown. (H) Serum-starved LN-18 cells were pretreated with the p70S6K inhibitor, PF4708671, for 30 min before the addition of the indicated concentrations of RSK inhibitors for another 30 min prior to the addition of PMA. Western blots were performed for the indicated proteins. (I) Levels of rpS6 phosphorylation were quantitated for cells treated with PF4708671. Mean values were determined from three independent experiments ($\pm$ SEM) and are shown. (J) Serum-starved LN-18 cells were pretreated with the indicated concentrations of RSK inhibitors in the presence of rapamycin for 30 min prior to the addition of PMA. Western blots were performed for the indicated proteins. For the tuberin blots, the first two lanes were not contiguous to the rest of the lanes, and this was indicated by a line. Levels of (K) rpS6, (L) tuberin and (M) eIF4B phosphorylation were quantitated. Mean values were determined

times, the RSK inhibitors affect mTORC1 activity by mechanisms independent of Akt modulation.

3.6. SL0101 and BI-D1870 differentially effect cell proliferation in LN-229 cells

To investigate whether the difference between RSK inhibitors could also differentially affect cellular processes such as proliferation, serum-starved LN-229 cells were pretreated with RSK inhibitors in the presence or absence of rapamycin, and then were stimulated with EGF. BrdU incorporation assays were subsequently performed and 100 μ M SL0101 was observed to inhibit cell proliferation more effectively than 1 μ M BI-D1870 (Fig. 9). Since these concentrations were previously observed to inhibit RSK to a similar extent (with rpS6, in the presence of rapamycin, and GSK3 α as reporters), it was unexpected to observe a difference in this assay. These results suggest that a mechanism distinct from the expected RSK inhibition influences the effect of SL0101 on the proliferation of LN-229 cells. One possibility is the nonspecific inhibitory effect of SL0101 on mTORC1. This possibility was further supported by the observation that SL0101 alone was as effective as the combination of SL0101 and rapamycin for inhibiting cell proliferation (Fig. 9). Moreover, inhibition of proliferation by 10 μ M BI-D1870 was more effective than that mediated by 1 μ M BI-D1870 (Fig. 9). Remarkably, the addition of rapamycin further increased the inhibitory effect of BI-D1870 on proliferation. In combination, these results pointed out that biological activities could be incorrectly ascribed to RSK depending on the type of RSK inhibitor used.

4. Discussion

To evaluate the use of chemical inhibitors that target cellular protein kinases, a cellular reporter of treatment efficiency is needed. An optimal inhibitory concentration needs to be identified in order to avoid off-target effects. Typically, a protein that is directly phosphorylated by the kinase targeted for inhibition can be used. For example, the extent of mTORC1 inhibition can be estimated based on the extent of phosphorylation of its direct targets: 4E-BPs and p70S6K. For the RSKs, there is no well-defined reporter-substrate to assess the effectiveness of chemical inhibitor treatments, mainly because other AGC-kinases can phosphorylate the same residues that are evaluated as RSK targets. As a result, the concentrations of BI-D1870 and SL0101 that have been applied for studies of RSK inhibition vary, sometimes by at least one order of magnitude (Fig. 1B and C).

Originally, RSK-dependent phosphorylation of S235 and S236 on rpS6 was identified as an ERK1/2-dependent and rapamycin-resistant

event [54]. Moreover, this phosphorylation was found to stimulate interactions between rpS6 and the 7-methylguanosine complex to affect mRNA translation [14]. Since the same serine residues can also be phosphorylated by p70S6K, rapamycin and PF4708671 were used to dissect RSK-mediated phosphorylation in order to specifically assess the effectiveness of RSK inhibitors. In the three cell lines tested, phosphorylation of rpS6 was found to drastically decrease upon mTORC1 and p70S6K inhibition, indicating that p70S6K was primarily responsible for rpS6 phosphorylation. Moreover, in previous studies, RSK was not found to be a significant contributor to rpS6 phosphorylation when p70S6K was inhibited [14,55]. However, with the use of rapamycin, PMA-induced phosphorylation of rpS6 by RSK could be detected, and this was confirmed by siRNA-mediated depletion of RSK1 and RSK2. In LN-18 cells, the phosphorylation of rpS6, in the presence of rapamycin or PF4708671, was sufficiently high to titrate the inhibitory effect of the RSK inhibitors. BI-D1870 at higher concentrations (5 and 10 μ M) mediated a stronger inhibition of rpS6 phosphorylation than SL0101. We confirmed the effects of RSK inhibitors analyzing eIF4B phosphorylation at S422 in LN-18 cells. Since eIF4B is a substrate for both RSK and p70S6K, rapamycin was used. However, mTORC1-p70S6K inhibition did not affect the basal or PMA-induced levels of eIF4B phosphorylation in LN-18 cells. Varying sensitivities to rapamycin were observed for eIF4B phosphorylation in different cell types [27,56,57], and thus unknown contributions by p70S6K may explain the discrepancies in the reported effects of BI-D1870 on eIF4B phosphorylation (Supplementary Table S3). In contrast to BI-D1870, the effect of SL0101 on eIF4B phosphorylation has not previously been reported. The effects of the RSK inhibitors were also confirmed by the analysis of the phosphorylation of another target of RSK, GSK3 α at S21, in LN-229 cells. This was possible because these cells show low basal levels of activated Akt, which can also phosphorylate GSK3 α . Similarly to eIF4B, discrepancies in the literature regarding the effects of RSK inhibitors on GSK3 α phosphorylation may also be due to differing contributions of Akt in each of the cellular systems studied (Supplementary Table S4). Moreover, GSK3 α and β can be phosphorylated by PKA at the same residues targeted by RSK and Akt [12,20], which further complicates the interpretation of these data. In this work, the use of three different RSK-targets in conditions where the contribution of other AGC-kinases was low or absent, provided the same conclusions regarding RSK inhibition.

In the present article we also show the effects of BI-D1870 and SL0101 on the phosphorylation of tuberin at S1798 by RSK. Tuberin phosphorylation was completely abolished by the inhibition of ERK1/2, suggesting that RSK is the main, if not the unique, kinase for S1798 in the studied GB-derived cell lines. Accordingly, RSK depletion by siRNA strongly and consistently inhibited PMA-dependent phosphorylation of this substrate. Both SL0101 and BI-D1870 were also able to reduce tuberin (S1798) phosphorylation. The inhibitory effect of BI-D1870 on PMA-induced phosphorylation of tuberin (S1798) was also observed in HEK293 cells [22]. As with the other RSK-substrates tested, the highest concentration of BI-D1870 (10 μ M) showed a stronger effect than 100 μ M SL0101. We thus propose that tuberin (S1798) is a promising candidate to be used as a suitable reporter-substrate for determining the effective concentration for RSK inhibitors in cells. Accumulating evidence suggests that phosphorylation of the transcription factor, Y-box binding protein 1 (YB1), at residue S102 might be used as reporter-substrate of RSK activity (Supplementary Table S5). However, it is important to note that Akt can also phosphorylate this same residue [58], which may restrict the use of YB1 (S102) as a reporter.

It was proposed that RSK is at the nexus of the cross-talk that occurs between the Ras-ERK1/2 and mTORC1 signaling pathways [3,59]. RSK can activate mTORC1, and thus p70S6K, by phosphorylating tuberin (S1798) and raptor [16,17]. Accordingly, it has been shown that RSK inhibition reduces the levels of activated p70S6K in cells exhibiting hyperactivation of ERK1/2 [46]. However, it has also been suggested that RSK does not mediate PMA-induced p70S6K activation in other

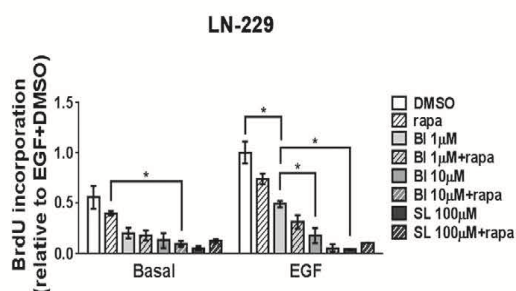


Fig. 9. The effects of RSK inhibitors on the proliferation of LN-229 cells. Serum-starved LN-229 cells were pretreated with the indicated concentrations of BI-D1870 (BI) or SL0101 (SL) in the presence or absence of rapamycin (rapa) for 30 min. Cells were subsequently incubated with or without (Basal) EGF for 16 h before BrdU incorporation was measured. The graph shows BrdU incorporation relative to BrdU incorporation by EGF + DMSO-treated cells. The mean incorporation measured from three independent experiments ($\pm$ SEM) is presented. * p < 0.05, ANOVA followed by Tukey's post-hoc test.

cell types [22]. Studies that have reported both outcomes are listed in Supplementary Table S6. Thus, the involvement of RSK in the PMA-mediated p70S6K activation in GB-derived cell lines was also addressed. Depletion of RSK was very efficient in LN-229 cells, but it failed to abolish PMA-induced p70S6K phosphorylation. However, depletion of RSK strongly inhibited PMA-induced phosphorylation of tuberin (S1798). Thus, in LN-229 cells, tuberin (S1798) phosphorylation was not connected to the expected reduction in p70S6K activation. LN-18 cells show high levels of p70S6K activity in non-stimulated conditions. This was the probable reason of the modest PMA-induced increase in p70S6K phosphorylation. Depletion of RSK was less effective in LN-18 cells, however, the reduction of PMA-dependent phosphorylation of tuberin was still apparent and consistent. Also, the reduction in tuberin phosphorylation by RSK was not reflected in the expected reduction of p70S6K. These results raised the possibility that tuberin (S1798) phosphorylation is not regulating mTORC1 at least in the GB-derived cells tested (Fig. 10).

We also studied the effects of RSK on the phosphorylation of rpS6 (S235/236) without the inhibition of p70S6K, which also phosphorylates the same residues of rpS6. Incubation of GB-derived cells with the RSK inhibitors in the absence of any stimulus revealed strong non-specific actions of SL0101 and BI-D1870. The non-specific actions of SL0101 and BI-D1870 were remarkably different. Unexpectedly, 10 μ M BI-D1870 strongly increased p70S6K phosphorylation in LN-18 and LN-229 cells in the absence of basally activated RSK (first lane of Fig. 6H and 7E), suggesting that RSK inhibition was not responsible for p70S6K activation (Fig. 10A). In addition, the phosphorylation of p70S6K was induced by 10 μ M BI-D1870 even when ERK1/2 was inhibited, which confirmed the non-specificity of BI-D1870. On the other hand, SL0101 strongly reduced rpS6 and p70S6K phosphorylation even in the absence of detectable basal activation of RSK (first lane of Fig. 6H and 7E), suggesting that RSK inhibition was not the involved mechanism (Fig. 10B). Accordingly, in the presence of a MEK inhibitor, which precludes ERK1/2-RSK activation, SL0101 further reduced rpS6 phosphorylation. Remarkably, SL0101 also strongly reduced the phosphorylation of the mTORC1-target, 4E-BP1, in LN-18 cells, confirming the off-target inhibition of mTORC1. Thus, in the present work we were able to unambiguously identify opposite off-target RSK-independent effects on both rpS6 and p70S6K phosphorylation for SL0101 and BI-D1870. However, further work will be necessary to uncover the underlying mechanisms. The off-target effects of the RSK inhibitors on p70S6K made it impossible to determine the true RSK actions on PMA-induced rpS6 phosphorylation. Correspondingly, the optimal concentration for each inhibitor based on rpS6 phosphorylation

alone can be misleading. It is important to note that the reported effects of BI-D1870 or SL0101 on rpS6 phosphorylation are controversial (Supplementary Table S7), and appear to depend on cell type, on the duration and type of treatment, and on the concentration of the inhibitor. In this manner, our work provides important information for the reinterpretation of previously published results.

Fonseca et al. suggested that the inhibition of PMA-induced p70S6K phosphorylation by 10 μ M BI-D1870 was mediated by off-target inhibition of Akt [22]. Other studies have also reported reduced Akt activation in the presence of BI-D1870 [23,30,60]. Conversely, there are several reports that demonstrate that BI-D1870 treatment did not alter levels of Akt phosphorylation (Supplementary Table S8). We observed that 10 μ M BI-D1870, but not 1 μ M, strongly reduced Akt phosphorylation after 150 min of treatment in unstimulated LN-18 cells. However, 10 μ M BI-D1870 induced p70S6K phosphorylation at earlier time points, which suggests that Akt was not involved in that effect. In PMA-treated HEK293 cells, 10 μ M BI-D1870 reduced both Akt and p70S6K phosphorylation, in accordance with Fonseca et al. [22]. To conciliate these observations, we hypothesized that the increased activation of p70S6K by BI-D1870 can trigger a negative feedback that reduces Akt phosphorylation, resulting in the eventual inhibition of p70S6K [52]. Accordingly, the reduction in Akt phosphorylation by 10 μ M BI-D1870 was abolished in the presence of rapamycin. However, further evidence will be necessary to support this conclusion. It has also been consistently reported that SL0101 has no effect on levels of Akt phosphorylation [23,61]. Based on our experience, SL0101 reduced the phosphorylation of Akt at S473 in unstimulated LN-18 cells, however, that action was not evident in PMA-treated HEK293 cells. In this manner, we cannot rule out the off-target inhibition of Akt phosphorylation at S473 as the cause for the strong inhibitory effect of SL0101 on mTORC1.

A greater inhibition of proliferation was observed in the presence of 100 μ M SL0101 when compared to 1 μ M BI-D1870, yet these concentrations inhibit RSK-dependent phosphorylation of rpS6, eIF4B, and GSK3 α to a similar extent. Addition of rapamycin further increased BI-D1870-dependent inhibition of proliferation, however, rapamycin did not affect SL0101-dependent inhibition of proliferation. This result indicates that the distinct off-target effects of the RSK inhibitors on the mTORC1 pathway are responsible for the differential biological outcomes. There have been differences reported in the effects of SL0101 and BI-D1870 upon other biological processes. For example, it has been shown that SL0101 inhibits insulin-induced glucose uptake by a mechanism distinct from that used by BI-D1870 [23]. Moreover, treatment with 10 μ M BI-D1870, and not with SL0101, was found to induce p21 expression and senescence in a RSK-independent manner [24]. Together these

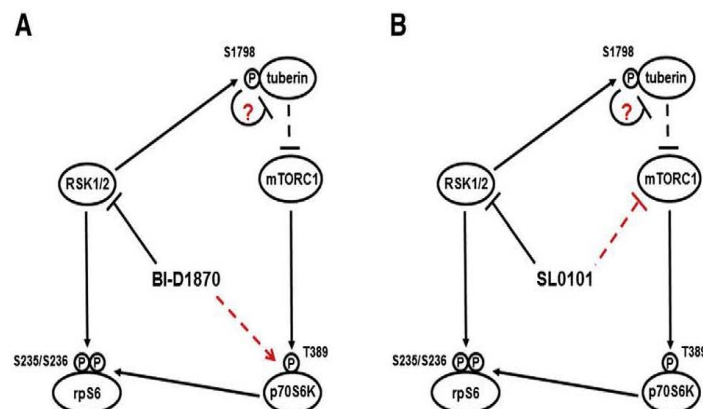


Fig. 10. Model for the nonspecific effects of SL0101 and BI-D1870. (A) We found that BI-D1870 can stimulate the activation of p70S6K, however, the mechanism for this action is unclear (red dotted line). This nonspecific effect results in the misassignment or masking of RSK functions. We could not observe a direct relationship between tuberin phosphorylation at S1798 and p70S6K activation, which questions the importance of this event for ERK1/2-dependent mTORC1 activation (red question mark). (B) We found that SL0101 can inhibit mTORC1

observations emphasize the need of reassessing the biological effects ascribed to RSK based on the use of BI-D1870 and SLO101.

5. Conclusion

Based on the present work, it is recommended that the conclusions obtained using SLO101 or BI-D1870 to inhibit RSK should be confirmed using a different approach (e.g. RSK depletion). Moreover, the important off-target effects shown in this article might preclude the use of SLO101 and BI-D1870 for the study of RSK. It is mandatory that the selection of a cellular reporter-substrate to evaluate RSK activity be optimized according to cell type. It is now evident that the use of some reporter-substrates can be misleading if the potential for other kinases to phosphorylate the same residues is not considered. Our work reinforces the possibility that PMA-induced p70S6K activation is not mediated by RSK. Also, the phosphorylation of tuberlin (S1798) appeared to be not related to mTORC1-p70S6K activation in the two GB-derived cell lines tested. However, phosphorylation of this residue of tuberlin was mainly, if not only, dependent on RSK and thus suitable as a good reporter-substrate to assess RSK activation in cells. In combination, these considerations will help elucidate the true functions of RSK, thereby facilitating the design of RSK-targeted therapies that may prove efficacious for cancer treatment.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2015.04.004>.

Acknowledgments

We thank Dr. P. P. Roux for the helpful comments and the kind gift of the plasmids to express HA-RSK3 and HA-RSK4. The authors declare that they have no competing interests. This work was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), [grants: 2009/14027-2 to V.R.M. and 2012/04370-4 to G.N.H.]; [fellowships: 2011/21350-4 to M.R., 2013/03315-2 to F.C.L. and 2013/25025-6 to L.C.S.].

References

- [1] M. Cargnello, P.P. Roux, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 75 (2011) 50.
- [2] Y. Romeo, X. Zhang, P.P. Roux, *Biochem. J.* 441 (2012) 553.
- [3] R. Anjum, J. Blenis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (2008) 747.
- [4] R. Lara, M.J. Seckl, O.E. Pardo, *Cancer Res.* 73 (2013) 5301.
- [5] F.J. Sulzmaier, J.W. Ramos, *Cancer Res.* 73 (2013) 6099.
- [6] T.S.K. Eisinger-Mathason, J. Andrade, D. a Lannigan, *Steroids* 75 (2010) 191.
- [7] D. Alkhavan, T.F. Cloughesy, P.S. Mischel, *Neuro-Oncology* 12 (2010) 882.
- [8] M. Grzmil, B. a Hemmings, *Biochim. Biophys. Acta* 1834 (2013) 1371.
- [9] M.S. Cohen, C. Zhang, K.M. Shokat, J. Taunton, *Science* 308 (2005) 1318.
- [10] R. Zaru, N. Ronkina, M. Gaestel, J.S.C. Arthur, C. Watts, *Nat. Immunol.* 8 (2007) 1227.
- [11] J. a Smith, C.E. Poteet-Smith, Y. Xu, T.M. Errington, S.M. Hecht, D. a Lannigan, *Cancer Res.* 65 (2005) 1027.
- [12] G.P. Sapkota, L. Cummings, F.S. Newell, C. Armstrong, J. Bain, M. Frodin, M. Grauert, M. Hoffmann, G. Schnapp, M. Steegmaier, P. Cohen, D.R. Alessi, *Biochem. J.* 401 (2007) 29.
- [13] L.R. Pearce, D. Komander, D.R. Alessi, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11 (2010) 9.
- [14] P.P. Roux, D. Shahbazian, H. Vu, M.K. Holz, M.S. Cohen, J. Taunton, N. Sonenberg, J. Blenis, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 14056.
- [15] D. Shahbazian, P.P. Roux, V. Mieulet, M.S. Cohen, B. Raught, J. Taunton, J.W.B. Hershey, J. Blenis, M. Pende, N. Sonenberg, *EMBO J.* 25 (2006) 2781.
- [16] P.P. Roux, B. a Ballif, R. Anjum, S.P. Gygi, J. Blenis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 13489.
- [17] A. Carrière, M. Cargnello, L.-A. Julien, H. Gao, E. Bonneil, P.P. Roux, *Curr. Biol.* 18 (2008) 1269.
- [18] V. Stambolic, J.R. Woodgett, *Biochem. J.* 303 (Pt 3) (1994) 701.
- [19] D.A. Cross, D.R. Alessi, P. Cohen, M. Andjelkovich, B.A. Hemmings, *Nature* 378 (1995) 785.
- [20] X. Fang, S.X. Yu, Y. Lu, R.C. Bast, J.R. Woodgett, G.B. Mills, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 11960.
- [21] H.H. Zhang, A.I. Lipovsky, C.C. Dibble, M. Sahin, B.D. Manning, *Mol. Cell* 24 (2006) 185.
- [22] B.D. Fonseca, T. Alain, L.K. Finestone, B.P.H. Huang, M. Rolfe, T. Jiang, Z. Yao, G. Hernandez, C.F. Bennett, C.G. Proud, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 27111.
- [23] S. Chen, C. Mackintosh, *Cell. Signal.* 21 (2009) 1984.
- [24] D. Neise, D. Sohn, A. Stefanski, H. Goto, M. Inagaki, S. Wesselborg, W. Budach, K. Stühler, R.U. Jänicke, *Cell Death Dis.* 4 (2013) e859.
- [25] J. Bain, L. Plater, M. Elliott, N. Shpiro, C.J. Hastie, H. McLauchlan, I. Klevvernic, J.S.C. Arthur, D.R. Alessi, P. Cohen, *Biochem. J.* 408 (2007) 297.
- [26] D.B. Kintner, X. Chen, J. Currie, V. Chanana, P. Ferrazzano, A. Baba, T. Matsuda, M. Cohen, J. Orłowski, S.-Y. Chiu, J. Taunton, D. Sun, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 35155.
- [27] M. Degen, P. Barron, E. Natarajan, H.R. Widlund, J.G. Rheinwald, *PLoS ONE* 8 (2013) e78979.
- [28] K. Karolina, D. Alzate-Correa, K. Obrietan, *Exp. Neurol.* 253 (2014) 72.
- [29] C.-F. Chiu, L.-Y. Bai, N. Kapuriya, S.-Y. Peng, C.-Y. Wu, A.M. Sargeant, M.Y. Chen, J.-R. Weng, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 73 (2014) 237.
- [30] A.J. Edgar, M. Trost, C. Watts, R. Zaru, *Biosci. Rep.* 34 (1) (2014) art:e00091, <http://dx.doi.org/10.1042/BSR20130094>.
- [31] D. Vial, P.J. McKeown-Longo, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 40371.
- [32] A.L. Stratford, K. Reipas, K. Hu, A. Fotovati, R. Brough, J. Frankum, M. Takhar, P. Watson, A. Ashworth, C.J. Lord, A. Lasham, C.G. Print, S.E. Dunn, *Stem Cells* 30 (2012) 1338.
- [33] a H. Davies, I. Barrett, M.R. Pambid, K. Hu, a L. Stratford, S. Freeman, I.M. Berquin, S. Pelech, P. Hieter, C. Maxwell, S.E. Dunn, *Oncogene* 30 (2011) 3649.
- [34] M. Artamonov, K. Momotani, D. Utepbergenov, A. Franke, A. Khromov, Z.S. Derewenda, A.V. Somlyo, *PLoS ONE* 8 (2013) e58703.
- [35] M.R. Pambid, R. Berns, H.H. Adomat, K. Hu, J. Trisicott, N. Maurer, N. Zisman, V. Ramaswamy, C.E. Hawkins, M.D. Taylor, C. Dunham, E. Guns, S.E. Dunn, *Pediatr. Blood Cancer* 61 (2014) 107.
- [36] E. Dehan, F. Bassemann, D. Guardavaccaro, G. Vasiliver-Shamis, M. Cohen, K.N. Lowes, M. Dustin, D.C.S. Huang, J. Taunton, M. Pagano, *Mol. Cell* 33 (2009) 109.
- [37] C.F. Wu, S. Liu, Y.-C. Lee, R. Wang, S. Sun, F. Yin, W.G. Bornmann, L.-Y. Yu-Lee, G.E. Gallicchio, W. Zhang, S.-H. Lin, J. Kuang, *Oncogene* 33 (2014) 2385.
- [38] J. Čáslavský, Z. Klímová, T. Vomastek, *Cell. Signal.* 25 (2013) 2743.
- [39] J. Li, M.D. Kritzer, J.J.C. Michel, A. Le, H. Thakur, M. Gayanilo, C.L. Passariello, A. Negro, J.B. Danial, B. Oskoui, M. Sanders, J.M. Hare, A. Hanauer, K. Dodge-Kafka, M.S. Kapiloff, *Circ. Res.* 112 (2013) 128.
- [40] B. Nadratowska-Wesolowska, E.M. Haugsten, M. Zakrzewska, P. Jakimowicz, Y. Zhen, D. Pajdzik, J. Wesche, A. Wiedlocha, *Oncogene* 33 (2014) 4823.
- [41] M. Saha, A. Carriere, M. Cheerathodi, X. Zhang, G. Lavoie, J. Rush, P.P. Roux, B. a Ballif, *Biochem. J.* 447 (2012) 159.
- [42] B. Kroczyńska, S. Joshi, E. a Eklund, A. Verma, S.V. Kotenko, E.N. Fitch, L.C. Platanias, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 1147.
- [43] X. Pan, L. a Kane, J.E. Van Eyk, P. a Coulombe, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 42403.
- [44] G. a Smolen, J. Zhang, M.J. Zubrowski, E.J. Edelman, B. Luo, M. Yu, L.W. Ng, C.M. Scherber, B.J. Schott, S. Ramaswamy, D. Irimia, D.E. Root, D. a Haber, *Genes Dev.* 24 (2010) 2654.
- [45] U. Doehn, C. Hauge, S.R. Frank, C.J. Jensen, K. Duda, J.V. Nielsen, M.S. Cohen, J.V. Johansen, B.R. Winther, L.R. Lund, O. Winther, J. Taunton, S.H. Hansen, M. Frödin, *Mol. Cell* 35 (2009) 511.
- [46] Y. Romeo, J. Moreau, P.-J. Zindy, M. Saba-El-Leil, G. Lavoie, F. Dandachi, M. Baptissart, K.L.B. Borden, S. Meloche, P.P. Roux, *Oncogene* 32 (2013) 2917.
- [47] H. Ray-David, Y. Romeo, G. Lavoie, P. Deléris, J. Tcherkezian, J. a Galan, P.P. Roux, *Oncogene* 32 (2013) 4480.
- [48] M. Roffé, G.N.M. Haji, H.F. Azevedo, V.S. Alves, B.A. Castilho, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 10860.
- [49] R.L. Elstrom, D.E. Bauer, M. Buzza, R. Karnauskas, M.H. Harris, D.R. Plas, H. Zhuang, R.M. Cinalli, A. Alavi, C.M. Rudin, C.B. Thompson, *Cancer Res.* 64 (2004) 3892.
- [50] L.R. Pearce, G.R. Alton, D.T. Richter, J.C. Kath, L. Lingardo, J. Chapman, C. Hwang, D.R. Alessi, *Biochem. J.* 431 (2010) 245.
- [51] D.D. Sarbassov, D. a Guertin, S.M. Ali, D.M. Sabatini, *Science* 307 (2005) 1098.
- [52] S.H. Um, D. D'Alessio, G. Thomas, *Cell Metab.* 3 (2006) 393.
- [53] X. Wan, B. Harkavy, N. Shen, P. Grohar, L.J. Helman, *Oncogene* 26 (2007) 1932.
- [54] M. Pende, S.H. Um, V. Mieulet, M. Sticker, V.L. Goss, J. Mestan, M. Mueller, S. Fumagalli, S.C. Kozma, G. Thomas, *Mol. Cell Biol.* 24 (2004) 3112.
- [55] V. Serra, P.J.A. Eichhorn, C. García-García, Y.H. Ibrahim, L. Prudkin, G. Sánchez, O. Rodríguez, P. Antón, J. Parra, S. Marlow, M. Scaltriti, J. Pérez-García, A. Prat, J. Arribas, W.C. Hahn, S.Y. Kim, J. Baselga, *J. Clin. Invest.* 123 (2013) 2551.
- [56] S. Kir, S. a Beddow, V.T. Samuel, P. Miller, S.F. Previs, K. Suino-Powell, H.E. Xu, G.I. Shulman, S. a Kiewer, D.J. Mangelsdorf, *Science* 331 (2011) 1621.
- [57] B. Cen, Y. Xiong, J.H. Song, S. Mahajan, R. DuPont, K. McEachern, D.J. DeAngelo, J.E. Cortes, M.D. Minden, A. Ebens, A. Mims, A.C. LaRue, A.S. Kraft, *Mol. Cell Biol.* 34 (2014) 2517.
- [58] B.W. Sutherland, J. Kucab, J. Wu, C. Lee, M.C.U. Cheang, E. Yorida, D. Turbin, S. Dedhar, C. Nelson, M. Pollak, H. Leighton-Grimes, K. Miller, S. Badve, D. Huntsman, C. Blake-Gilks, M. Chen, C.J. Pallen, S.E. Dunn, *Oncogene* 24 (2005) 4281.
- [59] M.C. Mendoza, E.E. Er, J. Blenis, *Trends Biochem. Sci.* 36 (2011) 320.
- [60] M.J. Groenewoud, S.M.L. Goorden, J. Kassies, W. Pellis-van Berkel, R.F. Lamb, Y. Elgersma, F.J.T. Zwartkruis, *PLoS ONE* 8 (2013) e81649.
- [61] S. Ahn, J. Kim, M.R. Hara, X.-R. Ren, R.J. Lefkowitz, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 8855.