

EFEITOS DA REGULAÇÃO DA TRADUÇÃO VIA RSKS EM GLIOBLASTOMAS

DANIELLE PEREIRA NASCIMENTO

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio Prudente
para obtenção do título de Mestre em Ciências
Área de Concentração: Oncologia**

Orientador: Dr. Martín Roffé

Co-orientadora: Dra. Vilma Regina Martins

São Paulo

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Nascimento, Danielle Pereira

Efeitos da regulação da tradução via RSKS em glioblastomas / Danielle Pereira

Nascimento - São Paulo, 2019.

148p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente

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

Orientador: Martín Roffé

Descritores: 1. Glioblastoma/Glioblastoma. 2. Proteínas Quinases S6 Ribossômicas/
Ribosomal Protein S6 Kinases. 3. RNA Mensageiro/RNA, Messenger. 4. Polissomos/
Polysomes. 5. Expressão gênica/Gene expression. 6. Vias de sinalização/Signaling
Pathways. 7. Biossíntese de Proteínas/Protein Biosynthesis

O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem. O que Deus quer é ver a gente aprendendo a ser capaz de ficar alegre a mais, no meio da alegria, e inda mais alegre ainda no meio da tristeza! Só assim de repente, na horinha em que se quer, de propósito - por coragem.

João Guimarães Rosa, Grande Sertão: Veredas.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho àqueles que me inspiraram durante essa etapa. Em especial, aos pacientes oncológicos, seus familiares e suas batalhas diárias. Que a pesquisa nacional e nossos esforços com este trabalho ajudem, de alguma forma, a trazer mais esperanças aos seus dias.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, sem o qual nada disso teria acontecido.

Ao meu orientador, Dr. Martín Roffé, pela dedicação, paciência e pelas discussões de experimentos que engrandeceram o trabalho. Agradeço por ter me estimulado a pensar criticamente e por ter contribuído para meu amadurecimento científico e pessoal.

À Dra. Vilma Regina Martins, por me receber e acolher em seu laboratório e por me auxiliar em inúmeros momentos. À Dra. Gláucia Hajj, por tudo o que foi compartilhado, desde a realização dos experimentos até sua disposição em dividir seus conhecimentos.

A todo o grupo de Biologia Tumoral e Biomarcadores. Aos pesquisadores Dra. Michele e Dr. Tiago, pelo convívio durante os momentos de alegrias e de dificuldade.

Ao A.C. Camargo Cancer Center, por investir em ciência e ensino. A todos os membros do CIPE, à Pós-Graduação e à Biblioteca.

À equipe da AFIP, Sueli Sugama e Hélio Rodrigues, pelo cuidado com os experimentos.

Ao Felipe, Danilo e Ederson, por manterem o funcionamento do laboratório impecável, pela amizade, por todos os cafés, conversas e risadas. Aos funcionários do CIPE, especialmente Janaína e Nega, por cuidarem para conservar um ambiente organizado e amigável. Aos amigos do CIPE, em especial ao Dr. Edson e Dr. Rodrigo, à Bianca, Emne, Alexcia, Jennice e Ester, pela companhia, risadas e conversas.

Às queridas ex-alunas. À Jessica por todas as formas de expressar seu amor (abraços e carinhos), por sua amizade leal e por ter tornado parte dessa caminhada mais

agradável com sua presença. À Ana e Mayra, por serem amigas e parceiras de todos os momentos. À Luana, por toda a atenção e acolhimento.

Aos alunos atuais Denise, Paula, Dimas, Bárbara, Júlia e Adriano, por todo o companheirismo, conversas e ajudas diárias. À Arielly, filhote-IC, que abraça todos os desafios sem perder a alegria e bom humor, obrigada pelos momentos que dividimos.

Ao Hermano por, (primeiramente fora Temer e) secundamente, por tudo o que me ensinou, por todos os momentos descontraídos, pelas conversas profundas ou profanas e pelos conselhos. À Fe Lupi, obrigada paciência em me ensinar tudo desde o início e pela amizade atenciosa. Ao Matheus, por ser meu grande amigo e inspiração de dedicação. À Fe Ferreira, por nossa amizade sincera e pelos momentos de parceria.

À Carol e ao Pedro, por sempre estarem presente na minha vida, obrigada pela paciência e por todos os jantares, conversas, alegrias e aflições que compartilhamos.

Aos meus avôs (*in memoriam*), que carrego no coração e que foram exemplos de determinação, simplicidade e dignidade. Por terem ensinado que a educação é o melhor caminho. Obrigada por me incentivarem a estudar e a ser perseverante. Às minhas avós, pelo zelo, atenção, dedicação e por serem exemplos do que é amor genuíno. Aos meus tios e tias, por todo o apoio.

Ao Arthur (*in memoriam*), nosso pequeno guerreiro que fez surgir em mim a vontade de estudar em oncologia como forma de retribuir sua luta e seu amor. Obrigada por me fazer sentir honrada por ter conhecido um anjinho, que me mostrou a grandeza de Deus.

Às minhas primas queridas, em especial Gabi e Carol, por todas as reuniões do clube, conversas, risadas e conselhos, que me acalmaram e alegraram em diversos momentos.

Aos meus pais, Rose e Itacir, pelos ensinamentos de amor, união, fé e gratidão. Por terem sido presentes e cuidadosos, mesmo quando da distância física. Meus méritos vêm dos esforços de vocês em investir, acreditar e me incentivar a ir mais longe. À minha irmã Larissa, pelo amor, paciência, proteção, apoio incondicional e por todos os cuidados e conversas. À minha irmã Laurinha, pelo amor, torcida, carinho e risadas.

Ao Gabriel, pelo amor, companheirismo, parceria e paciência. Por todo o incentivo, por me ajudar a ser o melhor que puder e por compartilhar comigo seu olhar sobre a vida; obrigada à sua família, por ter me acolhido.

À FAPESP, pelo apoio financeiro durante este projeto (bolsa de Mestrado no país, processo nº 2016/03858-4, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)).

RESUMO

Nascimento DP. **Efeitos da regulação da tradução via RSKs em glioblastomas.** São Paulo; 2019. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

O Glioblastoma (GBM) é o tumor cerebral mais comum e maligno, caracterizado por sua alta agressividade e respostas ineficazes aos tratamentos disponíveis. O diagnóstico impõe uma elevada taxa de mortalidade aos pacientes acometidos, que apresentam um tempo de sobrevida médio menor do que dois anos. A nível molecular, GBMs apresentam alterações em componentes chave das vias de sinalização de receptores tirosina quinase (RTKs), Ras/ERK e PI3K/AKT/mTORC1. A família das “ribosomal protein S6 kinases” (RSKs), ativada pela via Ras/ERK, foi proposta como um regulador da via de mTORC1, convergindo na regulação da síntese de proteínas. Em humanos, foram descritas quatro isoformas de RSKs (RSK1 - 4), que apresentam alta homologia e regulam diferentes funções celulares, sendo a desregulação das RSKs responsável por diferentes processos oncogênicos em diversos tipos tumorais. Contudo, a função das RSKs na regulação da síntese proteica global e de mRNAs específicos em GBMs ainda não foi descrita. Com a finalidade de se estabelecer um modelo robusto para o estudo dos efeitos das RSKs, especialmente do papel específico das isoformas no processo de tradução, foram geradas células nocaute para RSK1, RSK2 e duplo nocautes para RSK1 e RSK2 na linhagem celular de GBM LN-18, através da técnica CRISPR/Cas9. Os estudos com os clones nocautes validou o alvo P(S1798)-TSC2 para avaliação dos efeitos das RSKs. Além disso, detectamos que o alvo de RSKs, P(S422)-eIF4B, pode ser preferencialmente regulado pelas RSKs e não por mTORC1. Importaneamente, realizamos a translátômica das células nocaute e analisamos os mRNAs diferencialmente traduzidos na presença ou ausência do inibidor de mTOR, Torin1, para estabelecer um modelo para o estudo da tradução de mRNAs dependentes de RSKs. A análise por meio de microarranjos mostrou que as isoformas RSK1 e RSK2 regulam diferentes conjuntos de mRNAs. A família de mRNAs contendo sequências 5' TOP são um dos principais alvos de mTORC1. De maneira surpreendente,

observamos que a maioria dos 5'TOP mRNAs tem a tradução dependente de RSK1, em um mecanismo visualizado somente quando mTORC1 está inativado. Essa observação indica fortemente que RSK1, mas não RSK2 estaria mediando um mecanismo redundante e de resistência contra a inativação de mTORC1. Além disso, propomos um mecanismo inédito de controle da tradução de 5'TOP mRNAs. Desse modo, descrevemos um importante modelo para o entendimento das funções biológicas da família das RSKs em GBMs, que contribuirá com o desenho de alvos terapêuticos mais eficientes.

Descritores: Glioblastoma. Proteínas Quinases S6 Ribossômicas. RNA Mensageiro. Polissomos. Expressão gênica. Vias de sinalização. Biossíntese de Proteínas.

SUMMARY

Nascimento DP. [Effects of translation regulation via RSKs in glioblastoma]. São Paulo; 2019. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Glioblastoma (GBM) is the most frequent and malignant brain tumor, characterized by its aggressiveness and poor response to the available treatments. Once diagnosed, GBM patients are inflicted with high mortality rates, and a mean survival lower than two years. From a molecular point of view, GBMs display alterations in key components of receptor tyrosine kinases (RTK), Ras/ERK and/or PI3K/AKT/mTORC1 pathways. The p90 ribosomal S6 kinase family (RSK) is directly regulated by the Ras/ERK pathway, and is thought to regulate mTORC1 pathway, converging on regulation of protein synthesis. Human cells display four RSK isoforms (RSK 1 - 4) that share high levels of sequence homology and regulate several cellular functions. The deregulation of RSKs seems to be responsible for different oncogenic outcomes in several types of tumors. Nevertheless, the function of RSKs in regulation of global protein synthesis and in translation of specific subsets of mRNA in GBM was not described so far. In order to establish a robust model for studying the effects of RSKs focusing on isoform-specific roles in the control of translation, we generated knockout cells using CRISPR/Cas9 system technology for RSK1, RSK2 and double-knockout cells for RSK1 and RSK2 in LN-18 cell line. The studies with knockout cells validated the target P(S1798)-TSC2 to evaluate the effects of RSKs. Also, we found that the RSK target P(S422)-eIF4B might be preferably regulated by RSKs, rather than mTORC1 in LN-18 cells. Importantly, we performed the translomics on knockout cells and analyzed differentially translated mRNAs in the presence or absence of the mTOR inhibitor, Torin1, in order to determine a model for studying the translation of RSK-dependent mRNAs. Microarray data analysis revealed that RSK1 and RSK2 regulate different sets of mRNAs. The family of mRNAs containing a 5'TOP motif is the main target of mTORC1. Surprisingly, we observed that the majority of 5'TOP mRNAs have its translation dependent on RSK1, in a mechanism that emerges only when mTORC1 is

inactivated. This observation strongly suggests that RSK1, but not RSK2, is mediating a mechanism of resistance against mTORC1 inactivation. Moreover, we propose an unprecedented mechanism for translation control of 5'TOP mRNAs. With this study, we were able to describe an important model for understanding the biological functions of RSK in GBMs that will contribute with development of more efficient therapeutic targets.

Key words: Glioblastoma. Ribosomal Protein S6 Kinases. RNA, Messenger. Polysomes. Gene expression. Signaling Pathways. Protein Biosynthesis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema adaptado da classificação molecular de GBMs e sobrevida global associada	10
Figura 2	Principais alterações moleculares em GBMs.....	11
Figura 3	Esquema simplificado das vias Ras/ERK e PI3K/AKT convergindo no controle da maquinaria de tradução.....	16
Figura 4	Mecanismos que regulam a expressão gênica.....	17
Figura 5	A iniciação da tradução de mRNA dependente de 5' cap em eucariotos e seu controle por 4E-BPs.....	20
Figura 6	As vias PI3K/AKT/mTORC1 e Ras/ERK/RSK modulam a tradução de subconjuntos mRNAs particulares	25
Figura 7	Esquema de um polissomo.....	28
Figura 8	Estrutura e domínios das RSKs.....	35
Figura 9	Ativação das RSKs.....	37
Figura 10	Os inibidores de RSK, BI-B1870 (BI) e SL0101 (SL), apresentam efeitos inespecíficos e opostos sobre a via de mTORC 1 em LN-18..	38
Figura 11	Níveis das isoformas RSK3 e RSK4 em linhagens de GBMs.	42
Figura 12	Níveis das isoformas RSK1 e RSK2 em linhagens de GBMs	43
Figura 13	Esquema do sistema CRISPR/Cas9 para editar o genoma.....	51

Figura 14	Perfil polissomal de LN-18 utilizando gradiente linear 5 50%.	57
Figura 15	Perfil polissomal utilizando gradiente não-linear otimizado.	58
Figura 16	Desenho experimental para translatómica.	61
Figura 17	Clones de células LN-18 nocautes para RSK1 e RSK2 obtidos através do sistema CRISPR/Cas9.	67
Figura 18	Sinalização via RSKs e mTORC1 em células LN-18 nocaute para RSK1 ou RSK2 feitas com sgRNAs diferentes.	70
Figura 19	Sinalização via RSKs e mTORC1 em células LN-18 nocautes para RSK1 feitas com sgRNAs diferentes.	72
Figura 20	Análise dos níveis de fosforilação de eIF4B, alvo de RSKs, nas células LN-18 nocaute para RSKs.	74
Figura 21	Comparação dos efeitos dos inibidores de mTOR, rapamicina e Torin1 em células nocaute para as RSKs.	75
Figura 22	Perfil polissomal de células LN-18 nocautes para as RSKs.	77
Figura 23	Comparação dos efeitos à nível de traducional dos inibidores de mTOR, rapamicina e Torin1	78
Figura 24	Perfis polissomais em gradiente não-linear otimizado para obtenção de mRNAs eficientemente traduzidos.	80
Figura 25	Análise da qualidade dos RNAs totais e polissomais isolados.	81

Figura 26	Análise de Componentes Principais (PCA) da translatoômica das células LN-18 nocaute.....	82
Figura 27	Análise dos mRNAs polissomais reprimidos (downregulated) pela perda das isoformas de RSK ou tratamento com Torin1.....	86
Figura 28	Análise dos mRNAs polissomais ativados (upregulated) pela perda das isoformas de RSK ou tratamento com Torin1.	88
Figura 29	Processos biológicos reprimidos devido ao tratamento com Torin1...	89
Figura 30	Processos biológicos reprimidos devido à perda de isoformas de RSK, relativo às células WT.	91
Figura 31	Processos biológicos reprimidos devido à perda de isoformas de RSK, relativo às células nocaute individuais.	92
Figura 32	Processos biológicos enriquecidos devido ao tratamento com Torin1.....	94
Figura 33	Processos biológicos enriquecidos devido a perda de isoformas de RSK, relativo às células WT.	95
Figura 34	Processos biológicos enriquecidos devido a perda de isoformas de RSK, relativo às células nocaute individuais.	96
Figura 35	Resumo da regulação dos processos biológicos dentre os diferentes contrastes/comparações.....	97
Figura 36	Classificação dos mRNAs diferencialmente expressos devido ao tratamento com Torin1 nos módulos regulatórios.....	99

Figura 37	Classificação dos mRNAs diferencialmente expressos devido a perda das isoformas de RSK, relativo a WT, nos módulos regulatórios.....	100
Figura 38	Classificação dos mRNAs diferencialmente expressos devido a perda das isoformas de RSK, relativo aos nocautes individuais, nos módulos regulatórios.....	101
Figura 39	Definição dos módulos de expressão gênica dependente das isoformas de RSK.....	103
Figura 40	Análise das famílias de genes nos módulos regulatórios relacionados à RSK.	105
Figura 41	Ensaio de proliferação nas células LN-18 nocautes para as RSKs.	107
Figura 42	Quantificação dos níveis das RSKs em linhagens comerciais de GBM.....	113

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Características principais de GBMs IDH-tipo selvagem e IDH-mutante.....	5
Quadro 2	Funções das RSKs em câncer	44
Quadro 3	Sequências das guias “A” e “B” desenhadas para os genes RPS6KA1 (RSK1) e RPS6KA3 (RSK2)	52
Quadro 4	Anticorpos utilizados para Western Blotting.	55
Quadro 5	Porcentagem de colônias nocaute obtida por guia utilizada.	66

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

° C	Graus celsius
2-HG	do inglês, <i>D-2-hydroxyglutarate</i> (D-2-hidroxiglutarato)
4E-BPs	do inglês, <i>eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein</i> (proteínas de ligação ao fator eIF4E)
5'UTR	do inglês, <i>5'-untranslated region</i> (região 5' não traduzida)
AKT	do inglês, <i>RAC-alpha kinase serine/threonine-protein</i> ou <i>protein kinase B</i> (proteína quinase B)
Anota	do inglês, <i>analysis of translational activity</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BAD	do inglês, <i>Bcl2-associated agonist of cell death</i>
BCL2	B- do inglês, <i>cell lymphoma protein-2</i>
BP	do inglês, <i>biological process</i> (processos biológicos)
BrdU	Bromodeoxiuridina
BSA	do inglês, <i>bovine serum albumin</i> (Albumina sérica bovina)
CaMK	proteína quinase dependente de Calcio/calmodulina
CCND3	do inglês, <i>G1/S-specific cyclin-D3</i>
CDK2A	do inglês, <i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i> (inibidor de quinase dependente de ciclina 2A)
CHX	Cicloheximida
cm²	Centímetros quadrados
CO₂	Dióxido de carbono
CREB	do inglês, <i>cyclic AMP-responsive element-binding protein</i>
CRISPR	do inglês, <i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
CTKD	do inglês, <i>C-terminal kinase domain</i> (domínio quinase C-terminal)
DEPTOR	do inglês, <i>DEP domain TOR-binding protein</i>
DKO	do inglês, <i>double-knockout</i> (nocaute duplo)
DMEM	do inglês, <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSBs	do inglês, <i>double strand breaks</i> (quebra da dupla fita)

DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
eEF2	do inglês, <i>elongation factor 2</i> (fator de alongação 2)
eEF2K	do inglês, <i>eukaryotic elongation factor 2 kinase</i> (quinase fator de alongação 2 de eucariotos)
EGF	Do inglês, <i>epidermal growth factor</i> (fator de crescimento epidérmico)
EGFR	do inglês, <i>epidermal growth factor receptor</i> (fator de crescimento epidérmico)
EGTA	Ácido etilenoglicol tetracético
eIFs	do inglês, <i>eukaryotic translation initiation factor</i> (fatores de início de tradução)
ERK	do inglês, <i>extracellular signal-regulated kinase</i> (proteínas quinases reguladas por estímulos extracelulares)
ER-α	do inglês, <i>estrogen receptor alfa</i>
ETV1	do inglês, <i>ETS translocation variant 1</i>
FKBP12	do inglês, <i>peptidyl-prolyl-isomerase</i>
g	Unidade de força G
GAP	do inglês, <i>GTPase-activating protein</i> (proteínas ativadoras de GTPase)
GBM	Glioblastoma
G-CIMP	do inglês, <i>glioma-CpG island methylator phenotype</i> (fenótipo de ilhas CpG metiladas de gliomas)
GDP	Guanosina difosfato
GEF	do inglês, <i>guanine nucleotide exchange factor</i> (fator de troca de nucleotídeo guanina)
GPCRs	do inglês, <i>G-protein coupled receptor family</i> (família de receptores acoplados à proteína G)
GRB10	do inglês, <i>growth factor receptor-bound protein 10</i> (proteína ligada ao receptor fator de crescimento 10)
Grb2	do inglês, <i>growth receptor-bound protein 2</i> (proteína 2 ligada a receptores para fatores de crescimento)
GTP	Guanosina trifosfato
HR	do inglês, <i>homologous recombination</i> (recombinação homóloga)

HSP	do inglês, <i>heat shock protein</i> (proteína de choque térmico)
HSPB1	do inglês, <i>heat shock protein beta-1</i>
IDH	do inglês, <i>isocitrate dehydrogenase</i> (isocitrato desidrogenase)
IEGs	do inglês, <i>immediate early genes</i> (genes de ativação imediata)
IGF1	do inglês, <i>insulin like growth factor 1</i> (fator de crescimento insulina-símile 1)
IRES	do inglês, <i>internal ribosome entry site</i> (sítio de entrada interna do ribossomo)
KCl	Cloreto de potássio
KO	do inglês, <i>knockout</i> (nocaute simples)
LARP1	do inglês, <i>La-related protein 1</i> (proteína 1 relacionada a La)
MAD1	do inglês, <i>mitotic arrest deficient 1-like protein 1</i>
MAF1	do inglês, <i>repressor of RNA polymerase III transcription MAF1 homolog</i> (repressor da transcrição de RNA polimerase III homólogo à MAF1)
MAPK	do inglês, <i>mitogen-activated protein kinases</i> (proteína quinase ativada por mitógeno)
MEK	do inglês, <i>mitogen-activated protein kinase kinase</i> (proteína quinase quinase ativada por mitógenos)
Met-tRNAⁱ	RNA transportador especializado em iniciação acoplado a uma metionina
MgCl₂	cloreto de magnésio
MGMT	do inglês, <i>O-6-methylguanine-DNA methyltransferase</i> (O6-metilguanina-DNA metiltransferase)
mLST8	do inglês, <i>mammalian lethal with Sec-13 protein 8</i> (ou GβL)
MNK	do inglês, <i>MAPK signal-integrating kinase</i> (proteína quinase MAP de integração de sinal)
mRNA	RNA mensageiro
mSin1	do inglês, <i>target of rapamycin complex 2 subunit MAPKAP1</i>
mTOR	do inglês, <i>mechanistic target of rapamycin kinase</i> (proteína quinase alvo mecanístico de rapamicina)
mTORC1	do inglês, <i>mechanistic target of rapamycin complex 1</i> (complexo 1 de

	mTOR)
mTORC2	do inglês, <i>mechanistic target of rapamycin complex 2</i> (complexo 2 de mTOR)
NaCl	Cloreto de sódio
NanoCAGE	do inglês, <i>nano-cap analysis gene expression</i> .
NF1	do inglês, <i>neurofibromin 1</i> (neurofibromina 1)
NF-kappaB	do inglês, <i>nuclear factor kappa-B</i>
NHEJ	do inglês, <i>non homologous end joining</i> (junção de pontas não homólogas)
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
NP40	do inglês, <i>4-Nonylphenyl poly(ethylene glycol)</i>
NTKD	do inglês, <i>N-terminal kinase domain</i> (domínio quinase N-terminal)
ODC1	do inglês, <i>ornithine decarboxylase</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	do inglês, <i>open reading frame</i> (fase de leitura aberta)
PABP	do inglês, <i>poly-A-binding protein</i> (proteína de ligação a poli-A)
PBS	do inglês, <i>phosphate-buffered saline</i>
PCA	do inglês <i>principal component analysis</i> (análise de componentes principais)
PDCD4	do inglês, <i>programmed cell death protein 4</i> (proteína de morte celular programada 4)
PDGFRA	do inglês, <i>platelet derived growth factor receptor alpha</i> (fator de crescimento derivado de plaquetas)
PDK1	do inglês, <i>3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1</i> (quinase 1 dependente de 3-fosfoinosídeo)
pH	Potencial hidrogeniônico
PI3,4P₂	do inglês, <i>phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate</i>
PI3K	do inglês, <i>phosphatidylinositol-3-kinase</i> (quinase fosfatidil-inositol-3)
PI4,5P₂	do inglês, <i>phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i>
PIC	do inglês, <i>preinitiation complex</i> (complexo de pré iniciação)
PIK3CA	do inglês, <i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic</i>

	<i>subunit alpha</i> (subunidade alfa de PI3K1)
PIK3R1	do inglês, <i>phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1</i> (subunidade regulatória de PI3K1)
PIP₃	do inglês, <i>phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate</i>
PKC	do inglês, <i>protein kinase C</i> (proteína quinase C)
PMA	do inglês, <i>phorbol-12-myristate-13-acetate</i> (12-miristato-13-acetato de forbol)
PRAS40	do inglês, <i>proline-rich Akt substrate 40 kDa</i>
Protor1/2	do inglês, <i>protein observed with rictor</i>
PTB	do inglês, <i>phosphotyrosine binding</i>
PTEN	do inglês, <i>phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase</i> ou <i>phosphatase and tensin homolog</i> (fosfatase homóloga à tensina)
Raf	do inglês, <i>Raf-proto-oncogene, serine/threonine kinase</i>
Raptor	do inglês, <i>regulatory associated protein of mTOR</i> (proteína regulatória associada à mTOR)
Ras	proteína GTPase Ras
Rb	do inglês, <i>retinoblastoma-associated protein</i> (proteína retinoblastoma)
Rheb	do inglês, <i>Ras homolog</i> (proteína homóloga a Ras)
Rictor	do inglês, <i>rapamycin insensitive companion of mTOR</i>
RIN	do inglês RNA <i>integrity number</i> (valor de integridade do RNA)
RNA	Ácido ribonucleico
RPF	do inglês, <i>ribosome-protected mRNA fragments</i> (fragmentos de mRNA protegidos por ribossomos)
RP_s	do inglês, <i>ribosomal proteins</i> (proteínas ribossomais)
rpS6	do inglês, <i>40S ribosomal protein S6</i> (proteína ribossomal 40S S6)
rRNA	RNA ribossomal
RSK	do inglês, <i>ribosomal protein S6 kinase</i> (proteína quinase ribossômica S6 de 90 kDa)
RT	Radioterapia
RTK	do inglês, <i>receptor tyrosine kinase</i> (receptor tirosina quinase)
S6K	do inglês, <i>ribosomal protein S6 kinase</i> (proteína quinase ribossômica S6 de 70 kDa)

SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	do inglês, <i>SDS-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
Ser	Serina
SFB	Soro fetal bovino
sgRNA	do inglês, <i>single-guide RNA</i>
SH2	do inglês, <i>Src homology 2</i>
SHIP	do inglês, <i>SH2 domain-containing inositolphosphatase</i> (inositol fosfatase contendo o domínio SH2)
SLBP	do inglês, <i>stem-loop binding protein</i> (ou proteína proteína que se liga ao motivo <i>stem-loop</i> de mRNAs de histonas)
SNC	Sistema nervoso central
SOS	do inglês, <i>son of sevenless</i>
SRF	do inglês, <i>serum response factor</i>
STAT3	do inglês, <i>signal transducer and activator of transcription 3</i> (Proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição 3)
TBS-T	Tampão Tris-salino com detergente Tween®
TCF	Fatores de transcrição complexo ternários
TCGA	do inglês, <i>The Cancer Genome Atlas</i>
Thr	Treonina
TIF1A	do inglês, <i>transcription intermediary factor 1-alpha</i> (fator intermediário de transcrição 1-alfa)
TISU	do inglês, <i>translation initiator of short 5' UTR</i> (iniciador da tradução de 5'UTR curta)
TMZ	Temozolomida
TOP	do inglês, <i>terminal oligo-pyrimidine</i> (terminal oligo-pirimidina)
TOS	do inglês, <i>TOR signaling</i>
TP53	do inglês, <i>tumor protein p53</i> (proteína tumoral p53)
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
Tris-HCl	Tris(hidroximetil)aminometano cloridrato
tRNA	RNA transportador
TSC	do inglês, <i>tuberous sclerosis complex</i> (complexo da esclerose tuberosa)
TSC2	do inglês, <i>TSC complex subunit 2</i> (subunidade 2 do complexo TSC, ou

	tuberina)
TSS	Sítios de início de transcrição
ULK	do inglês, <i>unc-51-like kinase</i> (quinase unc-51-símile)
uORF	do inglês, <i>upstream open reading frame</i> (fase de leitura aberta a montante)
V	Volts
VEGF	do inglês, <i>vascular endothelial growth factor</i>
WT	do inglês, <i>wild type</i> (tipo selvagem)
α-KG	do inglês, <i>α-ketoglutarate</i> (alfa-cetoglutarato)
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
μM	Micromolar

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Gliomas.....	1
1.1.1	Glioblastomas.....	3
1.1.1.1	Marcadores Genéticos e Epigenéticos Clinicamente Relevantes em GBMs....	5
1.1.1.2	Principais Alterações e Subclassificações Moleculares de GBMs.....	8
1.2	Vias de Sinalização PI3K/AKT/mTORC1 e RAS/ERK.....	13
1.3	O Controle da Síntese de Proteínas.....	17
1.3.1	Iniciação da Tradução Dependente de <i>cap</i>	18
1.3.2	O Complexo mTORC1.....	23
1.3.3	O Controle da Tradução Via mTORC1.....	24
1.3.4	Outros Mecanismos de Controle da Tradução.....	27
1.4	Translatômica Aplicada ao Estudo da Tradução.....	27
1.4.1	A Tradução de mRNAs Específicos Via mTORC1.....	31
1.5	Drogas que Inibem mTOR e Promovem Resistência via RAS/ERK.....	32
1.6	A Família da Proteína Quinase RSK.....	34
2	OBJETIVOS.....	477
2.1	Objetivo Geral.....	477
2.2	Objetivos Específicos.....	477
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	488
3.1	Cultura Celular.....	488
3.1.1	Tratamento das Células com Inibidores de mTORC1.....	488
3.2	Geração de Células LN-18 Nocaute Através do Sistema CRISPR/CAS9.....	49
3.3	Extração e Quantificação De Proteínas.....	52
3.4	Western Blotting.....	53
3.5	Análise da Proliferação Celular.....	544
3.6	Perfil Polissomal.....	555
3.6.1	Perfil Polissomal - Gradiente Linear.....	588

3.6.2	Perfil Polissomal - Gradiente Não Linear (“Two-Step”).....	59
3.7	Translatômica.....	59
3.7.1	Desenho Experimental Translatômica.....	59
3.7.2	Isolamento de RNA Total e Polissomal.....	600
3.7.3	Avaliação da Integridade de RNA Total e Polissomal.....	61
3.7.4	Ensaio de Microarranjo de DNA.....	62
3.7.5	Análise de Componentes Principais.....	62
3.7.6	Análise do Translatoma.....	62
3.7.7	Análise GOSTats.....	63
4	RESULTADOS.....	64
4.1	Células LN-18 Nocaute para RSK1 E RSK2.....	64
4.2	Vias de Sinalização nas Células Nocaute para as RSK.....	67
4.2.1	Validação do Envolvimento de RSK na Fosforilação de TSC2.....	68
4.2.2	Efeitos do Nocaute de RSK1 na Via de mTORC1.....	69
4.3	A Fosforilação de eIF4B nas Células Nocaute.....	71
4.4	Efeitos da Inibição de mTORC1 nas Células Nocaute para RSK.....	73
4.5	Comparação entre o Tratamento com as Drogas Rapamicina e Torin1 para estudos Sobre a Tradução.....	75
4.6	Perfil Polissomal Otimizado para Translatômica de Células Nocaute para as RSK.....	78
4.7	Translatômica das Células LN-18 Nocaute.....	79
4.7.1	Análise da Integridade dos mRNA Totais e Polissomais.....	79
4.7.2	Análise de Componentes Principais.....	80
4.7.3	Análise dos Efeitos da Depleção das Isoformas de RSK nos mRNAs Traduzidos.....	82
4.7.4	Determinação de Formas de Regulação que Resultam em Mudanças dos mRNAs Traduzidos.....	97
4.7.5	Definição de módulos de Regulação da Expressão Genica Dependente das Isoformas de RSK.....	100
4.7.6	Família de Genes são Enriquecidas em Módulos Regulatórios Específicos.....	103
4.8	O Papel de RSK na Proliferação das Células Nocaute.....	105

5	DISCUSSÃO.....	107
6	CONCLUSÃO.....	119
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	120

1 INTRODUÇÃO

Tumores localizados no cérebro e no Sistema Nervoso Central (SNC) representam, a nível global, 1,6% dos tumores malignos (BRAY et al. 2018). Apesar da incidência ser relativamente rara, esses tumores estão relacionados a um prognóstico ruim, pois são altamente agressivos. A agressividade é evidenciada pelas altas taxas de mortalidade e morbidade. Além disso, o impacto desses tumores nos pacientes pode ser medido por um índice que avalia quantos anos da vida do paciente (anos de vida em potencial) são perdidos devido a sua neoplasia. Pacientes com tumores no cérebro e SNC perdem mais anos de vida em potencial do que aqueles com qualquer outro câncer (ROUSE et al. 2016). No mundo, cânceres do cérebro e SNC são o 13º tipo mais frequente em homens, com o risco estimado de 3,9/100 mil e ocupam a 15ª posição entre as mulheres, com o risco estimado de 3,0/100 mil (BRAY 2018). Nos Estados Unidos, no ano de 2015, esses tumores foram a principal causa de mortalidade em homens de até 40 anos e a quarta entre mulheres da mesma faixa etária (SIEGEL et al. 2017). Para o Brasil, durante o biênio 2018-2019 estimam-se 5810 novos casos em homens e 5510 em mulheres, correspondendo a um risco estimado de 5,62 casos novos a cada 100 mil homens e 5,17 a cada 100 mil mulheres, sendo que a incidência e a mortalidade de câncer do SNC vêm aumentando durante os últimos anos (Ministério da Saúde 2018).

1.1 GLIOMAS

Em termos de composição, tumores malignos do cérebro e SNC incluem um grupo complexo de doenças, contando com mais de 50 tipos de entidades patológicas diferentes, que podem ter origem no cérebro, nervos cranianos e meninges. Gliomas são os tumores mais comuns do SNC, consistindo em 30% dos casos. Os gliomas correspondem a 80% dos tumores malignos, sendo responsáveis pela maioria das mortes relacionadas a tumores primários do cérebro e SNC. A incidência anual estimada de gliomas nos Estados Unidos, ajustada por idade, é de 6,24 por 100.000 indivíduos e o risco estimado para homens é maior que para mulheres (1,3:1)

(OSTROM et al. 2014). Em geral, esses tumores não são curados pelos tratamentos padrões, que consistem de cirurgia, seguida de radio e quimioterapia. Assim, gliomas causam significativa mortalidade e morbidade aos indivíduos diagnosticados.

A origem dos gliomas ainda não foi completamente elucidada. De fato, estabelecer uma “célula de origem” é desafiador, tendo em vista a heterogeneidade de tumores gliais, a ausência de lesões pré-malignas e a ausência de metodologias de rastreamento que forneçam tecido cerebral suficiente (PISAPIA 2017). A definição mais aceita para “célula de origem” refere-se ao tipo celular exclusivamente susceptível a uma mutação oncogênica específica (VISVADER 2011). Contudo, esta definição torna ainda mais complexa a determinação da origem de gliomas, já que uma célula que adquiriu eventos mutacionais precoces pode ser diferente daquela que seria melhor descrita como uma “célula de origem” particular de um tumor, ou seja, mutações podem continuar ocorrendo até que se estabeleça a neoplasia de fato. Dessa forma, acredita-se que tumores originários de células da glia tem, potencialmente, origem a partir de células tronco neuroglicais ou progenitoras, células precursoras de oligodendrocitos ou astrócitos, já que as mesmas apresentam potencial regenerativo (ZONG et al. 2015).

Histologicamente, gliomas são classificados de acordo com as células gliais de origem. Dessa forma, são divididos em astrocitomas (derivados de astrócitos, células que formam o principal tecido conectivo do cérebro); oligodendrogliomas (derivados de oligodendrócitos, células cuja função é envolver os axônios do SNC com mielina); ependimomas (derivados de células ependimárias, que formam um arranjo epitelial para revestir as cavidades do SNC); ou gliomas mistos oligoastrocíticos (derivados de mais de um tipo celular). Gliomas podem ser ainda subclassificados de acordo com os níveis presumidos de diferenciação, determinado com base nas irregularidades morfológicas em comparação ao tecido saudável. Essa classificação, discutida abaixo, leva em consideração características histológicas que se refletem na agressividade do tumor. Essas características incluem: aumento da celularidade, mitoses, proliferação endotelial e necrose.

Em 2007, a Organização Mundial de Saúde (OMS) definiu uma classificação histopatológica para tumores do SNC, com o intuito de prever o comportamento biológico das diversas neoplasias que compõem o grupo (LOUIS et al. 2007). Trata-

se de um esquema de classificação baseado em uma escala de malignidade que varia entre graus I - IV e compreende uma grande variedade de neoplasias, não sendo uma classificação estritamente histológica. Assim, de acordo com a OMS os gliomas são classificados em 4 graus histopatológicos, baseado nos níveis de indiferenciação, anaplasia e agressividade apresentados. Grau I aplica-se a lesões geralmente benignas, com baixo potencial proliferativo e com potencial de cura. Neoplasias de grau II exibem apenas hiperplasia, caracterizando-se como uma massa difusa. A designação grau III geralmente compreende lesões com evidencia histológica de malignidade, incluindo atipia e atividade mitótica ativa. O grau IV é atribuído a neoplasias citologicamente malignas, com atividade mitótica ativa e/ou com necrose, tipicamente associada com uma doença que evolui pré e pós-operação rapidamente e tem um desfecho fatal. Além disso, infiltração generalizada do tecido ao redor e propensão à disseminação crânio-espinhal caracterizam neoplasias de grau IV.

1.1.1 Glioblastomas

Os Glioblastomas (GBMs) são os principais gliomas de grau IV. GBMs são essencialmente astrocitomas e apresentam, conforme acima mencionado, atipia nuclear, pleomorfismo celular, proliferação microvascular e/ou necrose (LOUIS et al. 2016). GBMs são responsáveis por 45,6% dos casos de tumores primários malignos do cérebro/SNC. A incidência anual nos Estados Unidos é baixa (a saber, 3,1 por 100.000 habitantes), quando comparada a outros tumores, sendo maior em pacientes de faixa etária entre 75 - 84 anos (OSTROM et al. 2014). Os GBMs e outros gliomas malignos são altamente invasivos, infiltrando o parênquima cerebral que o cerca, apesar de, tipicamente, manterem-se no sistema nervoso central e não apresentarem metástase (JOHNSON e O'NEILL 2012). A agressividade do tumor é caracterizada pela baixa sobrevida, sendo que apenas 5% dos pacientes diagnosticados com GBM sobrevivem mais do que 5 anos (OSTROM et al. 2015). Essa porcentagem diminui para 2% para pacientes com mais de 65 anos (OSTROM et al. 2015). Em relação aos fatores de risco, o mais bem definido é idade, sendo que homens são mais afetados que mulheres (1,6:1) e brancos mais que negros (2:1).

O tratamento padrão para GBMs consiste, inicialmente, na ressecção cirúrgica máxima do tumor, até extensão considerada segura (WELLER et al. 2017).

Contudo, devido a sua natureza altamente infiltrativa, o tumor não pode ser completamente ressecado cirurgicamente e, por isso, após a cirurgia, se procede com o tratamento adjuvante de primeira linha, que consiste em radioterapia (RT) com simultânea e adjuvante quimioterapia com o agente alquilante temozolomida (TMZ, ou Temodal) (STUPP et al. 2009). No entanto, muitos dos tumores respondem pobremente à quimioterapia e radioterapia padrão, sendo que a resposta daqueles cuja progressão é considerada controlada pela terapia não é prolongada (MASUI et al. 2012). Além disso, GBMs apresentam recidiva e o tempo médio de progressão da doença após o tratamento é de 6 a 9 meses (STUPP et al. 2009). Assim, a terapia padrão tem como intuito tornar a doença estável e/ou melhorar a qualidade de vida e funções cognitivas dos pacientes. Por esses motivos o estudo de vias moleculares alteradas em tais tumores é particularmente importante, visto que é necessário ampliar o espectro de tratamentos disponíveis, com o desenvolvimento de terapias direcionadas, que irão beneficiar os pacientes.

A maioria dos GBMs surge *de novo*, na forma de GBMs primários, ou seja, sem evidências clínica e histológica de uma lesão precursora menos maligna. GBMs que surgem da progressão de gliomas pré-existentes de graus II ou III são menos comuns e denominados GBMs secundários. GBMs primários manifestam-se, em geral, em pacientes idosos, enquanto os secundários são mais comuns em pacientes mais jovens (com menos de 45 anos). Contudo, os termos clínicos GBM, “primário” e “secundário”, vem sendo menos utilizado na prática, devido às classificações baseadas em marcadores moleculares de gliomas, que surgiram da necessidade de incorporar achados moleculares relevantes às características histopatológicas e clínicas dos tumores (WELLER et al. 2015).

Dessa forma, visando incorporar características fenotípicas e genotípicas que refletem a complexidade molecular dos gliomas, a classificação mais recente da OMS dos tumores do SNC adicionou informações moleculares às características histológicas clássicas para o diagnóstico dos tumores (LOUIS et al. 2016). No caso de GBMs, a classificação recomenda a avaliação do estado mutacional da proteína isocitrato desidrogenase 1 e 2 (IDH1 e IDH2). A mutação mais frequente em *IDH* ocorre no gene *IDH1* e resulta na troca do resíduo arginina (R) por histidina (H) no resíduo 132 da proteína (IDH1^{R132H}). A presença da mutação IDH1^{R132H} segrega

cl clinicamente dois grupos de pacientes, dessa forma, GBMs são classificados em Glioblastoma, IDH-tipo selvagem (ou GBM primário, que corresponde por volta de 90% dos casos, com tempo médio de histórico clínico de 4 meses) e Glioblastoma, IDH-mutante (ou GBM secundário, que corresponde a aproximadamente 10% dos casos, com tempo médio de histórico clínico de 15 meses). Os principais dados estão sumarizados no Quadro 1, abaixo.

Quadro 1 - Características principais de GBMs IDH-tipo selvagem e IDH-mutante.

	Glioblastoma IDH-selvagem	Glioblastoma IDH-mutante
Sinônimo	Glioblastoma primário, IDH-selvagem	Glioblastoma secundário, IDH-mutante
Lesão precursora	Não identificável; desenvolve <i>de novo</i>	Astrocitoma difuso Astrocitoma anaplásico
Proporção de Glioblastomas	~ 90%	~ 10%
Idade média ao diagnóstico	~ 62 anos	~ 44 anos
Razão homem para mulher	1,42:1	1,05:1
Tempo médio de histórico clínico	4 meses	15 meses
Mediana da sobrevida global		
Cirurgia + radioterapia	9,9 meses	24 meses
Cirurgia + radioterapia + quimioterapia	15 meses	31 meses
Necrose	Extensiva	Limitada
Mutações promotor <i>TERT</i>	72%	26%
Mutações <i>TP53</i>	27%	81%
Mutações <i>ATRX</i>	Excepcional	71%
Amplificação <i>EGFR</i>	35%	Excepcional
Mutações <i>PTEN</i>	24%	Excepcional

Fonte: Adaptada de LOUIS et al. (2016).

1.1.1.1 Marcadores Genéticos e Epigenéticos Clinicamente Relevantes em GBMs

Dadas as frequência e malignidade de GBMs, muitos estudos focaram na tentativa de entender as bases moleculares desse tipo tumoral. Atualmente, existem muitas informações sobre a biologia molecular de GBMs. As alterações gênicas de GBMs mais prevalentes e aceitas na literatura envolvem mutações no gene do receptor do fator de crescimento epidérmico (*EGFR*), no gene supressor tumoral da

fosfatase homóloga à tensina (*PTEN*) e no gene supressor tumoral da proteína tumoral p53 (*TP53*) (WELLER et al 2015). Em relação às alterações cromossômicas, encontram-se a perda dos cromossomos 10 (que contém *PTEN*) e 9p (que contém o inibidor de quinase dependente de ciclina 2A, *CDK2A*) e ganho dos cromossomos 7 (que contém *EGFR*) e 19 (VRANOVÁ et al. 2007; WELLER et al. 2015). Contudo, apenas algumas alterações genéticas e epigenéticas são relevantes no contexto clínico, ou seja, se traduzem na predição sobre a progressão da doença ou estão relacionadas ao sucesso ou falha das terapias padrões. Aqui, apresentamos as principais anormalidades encontradas em GBMs verificadas na rotina clínica, com foco naquelas que se correlacionam com características clinicamente relevantes. A seguir, abordaremos outras alterações gênicas que estão associadas às vias de sinalização alteradas em GBMs.

A Mutações no Gene *IDH1*

Mutações na enzima isocitrato desidrogenase (IDH) 1 e 2 ocorrem em aproximadamente 5-10% de todos os GBMs e estão associadas à menor idade ao diagnóstico e melhor desfecho clínico (PARSONS et al. 2008). Mais de 90% das mutações em *IDH* analisadas em gliomas envolvem o gene *IDH1*, são heterozigóticas e resultam da mutação missense CGT>CAT no códon 132, trocando o resíduo de arginina por histidina (R132H). Mutações análogas ocorrem em R172 de *IDH2* (HORBINSKI 2013). As mutações são mais comuns em GBMs secundários sendo, dessa forma, consideradas como um marcador molecular de GBMs que possuem um prognóstico mais favorável (PARSONS et al. 2008; YAN et al. 2009).

A mutação pontual *IDH1*^{R132H} faz com que a enzima, localizada no citoplasma, prefira ligar-se a alfa-cetoglutarato (α -KG), em vez do substrato original isocitrato, catalisando a reação de redução dependente de NADPH de α -KG a D-2-hidroxi-glutarato (2-HG) (DANG et al. 2009). Os níveis de 2-HG, considerado um oncometabólito, são 10-100 vezes maiores em gliomas *IDH*-mutantes, quando comparados aos *IDH*-selvagens (DANG et al. 2009; GARBER 2010). A relação entre 2-HG e oncogênese ainda é controversa, mas acredita-se que a expressão da proteína mutante resulta na inibição de dioxigenases dependentes de α -KG por 2-HG. Enzimas que são α -KG-dependentes regulam diversos processos fisiológicos, como

sensibilidade a hipóxia, demetilação de histonas e mudanças na metilação do DNA (LOENARZ e SCHOFIELD 2008; SCHWARTZENTRUBER et al. 2012). De fato, a mutação está associada a um padrão epigenético distinto, designado fenótipo de ilhas CpG metiladas de gliomas (G-CIMP) (NOUSHMEHR et al. 2010), discutido na seção seguinte.

B Metilação do promotor do gene *MGMT*

Outra alteração importante é a metilação do promotor do gene de O6-metilguanina-DNA metiltransferase (*MGMT*). *MGMT* codifica a enzima MGMT, uma proteína de reparo de DNA, que atua removendo grupos alquila na posição O6 de guanina, prevenindo assim a cascata de eventos que levam à ativação de resposta a danos no DNA e morte celular. MGMT pode, portanto, modular a sensibilidade ao tratamento quimioterápico com agentes alquilantes, como TMZ. A droga TMZ age de forma a transferir grupos alquila às bases de guanina, causando danos no DNA e consequente morte celular por apoptose. Na presença de MGMT, grupos alquila da posição O6 de guanina no DNA podem ser removidos e o dano reparado, conferindo, dessa forma, resistência às células tratadas com TMZ (KORSHUNOV et al. 2005; KLEINBERG 2012). A metilação do promotor do gene *MGMT* resulta no seu silenciamento, aumentando, assim, a sensibilidade das células ao tratamento com TMZ devido à ausência da proteína de reparo (NAKAGAWACHI et al. 2003; HORBINSKI 2013). Desde que foi descoberto o papel de MGMT na resistência à quimioterapia alquilante, *MGMT* tem permanecido como um biomarcador com maior impacto nas decisões clínicas, particularmente em pacientes idosos (WICK et al. 2012; WELLER et al. 2015, 2017). Adicionalmente, a metilação é associada a melhor resposta a TMZ, assim como RT e melhora a sobrevida livre de progressão e sobrevida global com tratamento combinado adequado (TMZ + RT), do que qualquer modalidade sozinha (THAKKAR et al. 2014). Além disso, a metilação de *MGMT* está associada a tumores com mutação em *IDH1/2*, sendo, dessa forma, mais comum em GBMs secundários (EOLI et al. 2007; NAKAMURA et al. 2001; HORBINSKI 2013).

C Alterações cromossômicas

Em relação às alterações cromossômicas, é relevante mencionar perda no cromossomo 10, que ocorre em 80 - 90% dos casos de GBMs. O gene do supressor tumoral PTEN está localizado no cromossomo 10q23. Além de perda de número de cópias, o gene PTEN está mutado em 20 - 40% dos GBMs, ocorrendo de forma praticamente exclusiva em GBMs primários.

Além disso, o *status* da integridade dos cromossomos 1p/19q é verificado na prática clínica para o diagnóstico molecular de gliomas (THAKKAR et al. 2014). As deleções que resultam na perda do braço curto do cromossomo 1 e longo do 19 e são preditivas de resposta a quimioterapia e melhor prognóstico em oligodendrogliomas, porém não tem utilidade em GBMs (WELLER et al. 2017).

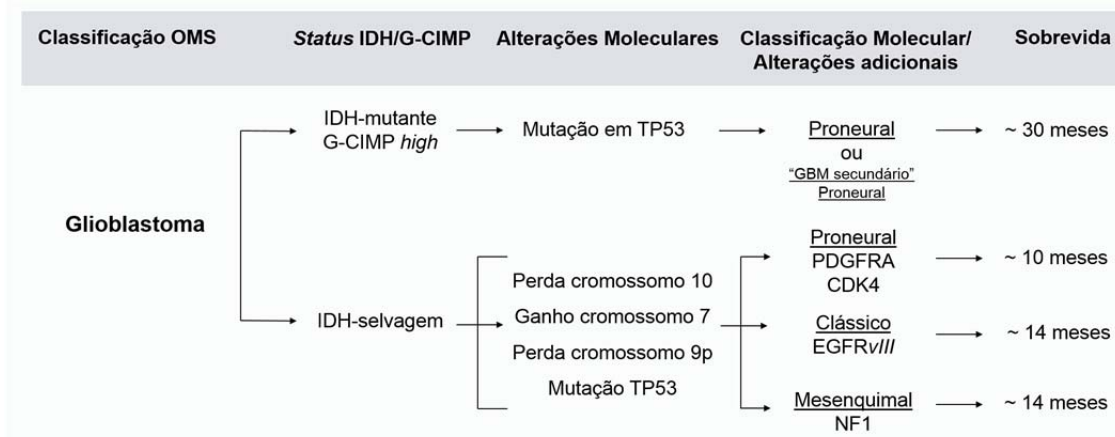
1.1.1.2 Principais Alterações e Subclassificações Moleculares de GBMs

GBMs foram um dos primeiros tipos tumorais a serem estudados pelo consórcio *The Cancer Genome Atlas* (TCGA). Por meio desse consórcio, foi realizada uma análise integrada de diversas plataformas moleculares, como de mRNA, miRNA, número de cópias de DNA, dados mutacionais, de expressão proteica e de metilação de DNA, que revelaram as principais alterações moleculares que poderiam contribuir para a progressão e “patobiologia” da doença (MCLENDON et al. 2008; VERHAAK et al. 2010; BRENNAN et al. 2013). Os achados do TCGA confirmaram dados de estudos anteriores e possibilitaram enxergar a doença sob outras perspectivas. Assim, foram identificadas alterações altamente recorrentes, que deram luz à heterogeneidade genética de GBMs e possibilitaram a introdução de novos conceitos na classificação desses tumores.

Em 2010, a subclassificação molecular inicialmente sugerida por PHILLIPS et al. em 2006, foi refinada, contemplando então 840 genes e dados de sequenciamento de 173 pacientes, que levaram à subclassificação de GBMs em quatro subtipos moleculares, baseados em padrões de expressão gênica e designados como proneural, neural, clássico e mesenquimal (VERHAAK et al. 2010). O subtipo clássico é descrito pela amplificação/mutação no gene *EGFR*, que codifica o receptor do fator de crescimento epidérmico, um dos membros da família de receptores tirosina quinase (RTKs). O subtipo mesenquimal apresenta inativação do gene *NF1*,

que codifica Neurofibromina 1, um supressor tumoral que regula negativamente o oncogene Ras e a proteína mTOR em astrocitomas (BANERJEE et al. 2011). O subtipo proneural apresenta mutações nos genes do receptor para o fator de crescimento derivado de plaquetas (*PDGFRA*) e *IDH1*. De maneira importante, a posterior análise dos dados de padrão de metilação de GBM gerados pelo TCGA identificou G-CIMP alto (ou G-CIMP *high*), um fenótipo de hipermetilação de DNA presente em aproximadamente 10% dos GBMs (NOUSHMEHR et al. 2010). Este fenótipo está fortemente relacionado à mutação em *IDH1* e ao subtipo molecular proneural, sendo raro em GBMs primários (~5 - 8%). Em termos de sobrevivência de pacientes, existe uma significativa vantagem daqueles classificados como proneural G-CIMP *high* com mutação em *IDH1*, em relação aos outros subtipos e especialmente ao proneural IDH1 tipo selvagem não G-CIMP (NOUSHMEHR et al. 2010; VERHAAK et al. 2010; BRENNAN et al. 2013). Dessa maneira o grupo de tumores G-CIMP *high* foi separado como uma entidade diferente (BRENNAN et al. 2013). É importante salientar que não existe associação entre os subtipos moleculares G-CIMP *high* com a metilação no promotor *MGMT*.

É importante ressaltar que as classificações moleculares que se seguiram à de 2010 descartaram a existência do subgrupo neural (CECCARELLI et al. 2016). Isso se deve ao fato de que a classificação original incluiu nas análises dados de células não malignas associadas ao tumor. Assim, com estudos posteriores e refinamento dos dados, que excluíram outros tipos celulares das análises, foi revelada a existência de três subtipos de GBM (a saber, clássico, mesenquinal e proneural), além de confirmada a existência da plasticidade entre os mesmos (WANG et al. 2017). A Figura 1 esquematiza uma releitura atual que sumariza os subtipos moleculares de GBM, suas principais alterações moleculares e sobrevivências globais associadas.



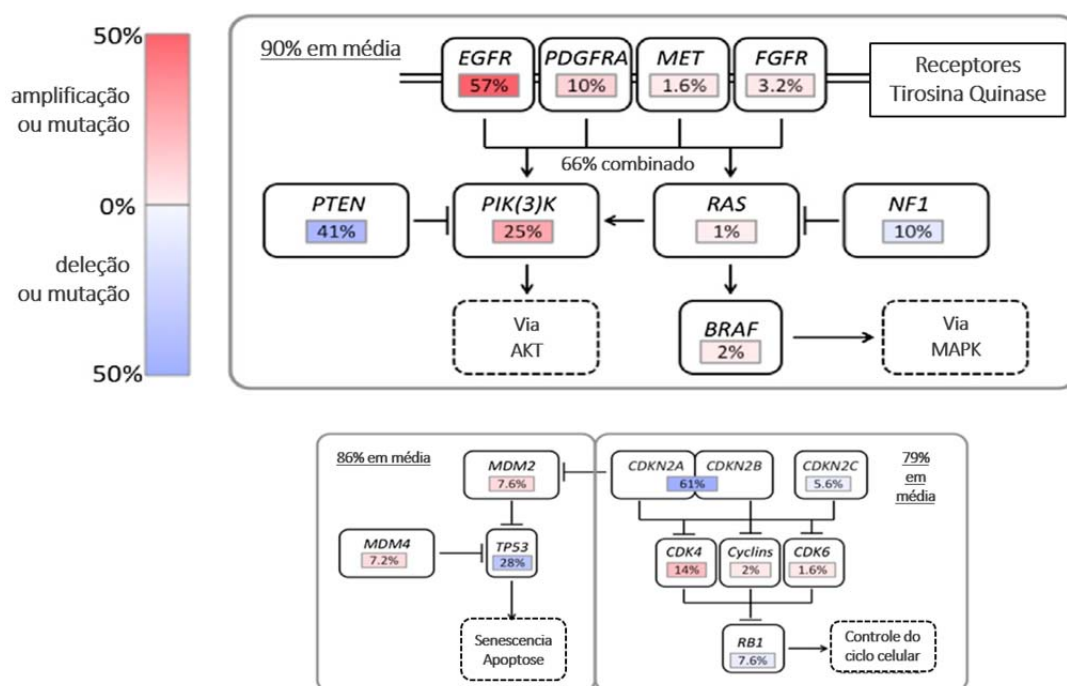
Fonte: Adaptado de VAN MEIR et al. (2010); VERHAAK et al. (2010), BRENNAN et al. (2013) - TCGA; HUSE e ALDAPE (2014); CECCARELLI et al. (2016).

Figura 1 – Esquema adaptado da classificação molecular de GBMs e sobrevida global associada. Conforme proposto em 2016, os gliomas foram subdivididos em IDH-mutante e IDH-selvagem. Aqui, com foco nos GBMs, mostramos que os GBMs foram subdivididos em IDH-mutante (GBM secundário) e IDH-selvagem. Ainda, GBMs IDH-selvagem são subdivididos em três subtipos moleculares, de acordo com as alterações encontradas em: Clássicos, Mesenquimais ou Proneurais, sendo que ao subtipo Proneural pode ser associada a presença do padrão de hipermetilação G-CIMP (G-CIMP *high*). Notar que a sobrevida global do subgrupo (Proneural + G-CIMP *high*) é a maior dentre os subtipos moleculares.

Contudo, os esforços das subclassificações de GBMs não foram suficientes para estabelecer novas abordagens terapêuticas para uso na rotina clínica, nem resultaram na identificação de marcadores preditivos que melhorassem o desfecho dos pacientes com GBM.

Os dados do TCGA serviram para confirmar as três principais vias de sinalização comumente alteradas em GBMs (Figura 2) (PARSONS et al. 2008). São elas as vias de RTK/RAS/fosfatidil-inositol-3-quinase (PI3K), TP53 e proteína retinoblastoma (Rb), que se encontraram alteradas em aproximadamente 90%, 86% e 79% dos casos, respectivamente. De maneira importante, 57% dos GBMs apresentam mutação (ativadora) e/ou amplificação de *EGFR*. Em particular, a maioria dos GBMs apresentam ativação das vias abaixo de RTKs, como PI3K/proteína quinase B (AKT)/proteína alvo mecanístico da rapamicina (mTOR) e RAS/proteínas quinase ativadas por mitógenos (MAPK). As mutações que desregulam essas vias e contribuem com o comportamento biológico agressivo dos

tumores incluem mutações nos genes que codificam os domínios catalíticos (*PIK3CA*) ou regulatórios (*PIK3R1*) de PI3K (~15%), que induzem a ativação de PI3K; além disso, deleções e/ou mutações em *PTEN*, gene supressor tumoral e o principal regulador negativo de PI3K/AKT foram observadas em aproximadamente 41% dos casos. Mutações em *NF1*, produto de outro gene supressor tumoral, que regula negativamente as vias de Ras ocorrem em aproximadamente 10% dos GBMs. Os GBMs apresentam, também, mutação em Ras (aproximadamente 1% dos casos).



Fonte: Adaptado de TCGA Research Network (2013).

Figura 2 - Principais alterações moleculares em GBMs. Dentre as principais alterações moleculares encontradas em GBMs, aproximadamente 90% dos tumores apresentam mutações/amplificações em receptores tirosina quinase, que participam das vias de AKT e MAPK. Em particular, 57% dos GBMs apresenta mutação ativadora e/ou amplificação em EGFR. Além disso, 41% dos GBMs apresenta deleção e/ou mutação no supressor tumoral PTEN, levando à ativação aberrante da via de PI3K/AKT. A via das MAPK também se encontra alterada em GBMs, já que Neurofibromina 1 (NF1), regulador negativo de Ras é mutada ou deletada em 10% dos GBMs. Ras encontra-se mutada em 1% dos casos analisados. Também podem ser encontradas importantes alterações na via de TP53 (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.

As vias de sinalização ativadas por RTK modulam diversas funções celulares, como crescimento, migração e sobrevivência. Membros da família de RTKs são compostos por um domínio extracelular, com região para interação com o ligante, um domínio transmembranar e uma região citoplasmática, que contém o domínio proteína tirosina quinase, composto por tirosinas que são autofosforiladas (LEMMON e SCHLESSINGER 2010). Simplificadamente, RTKs são ativados via dimerização dos receptores em resposta a um ligante extracelular e sofrem subsequente ativação do domínio intracelular tirosina quinase. É importante salientar que o grau de ativação de uma via por fatores de crescimento específicos depende da expressão e localização na superfície celular do seu cognato RTK e co-expressão de membros da família do receptor e diversas proteínas de ancoragem molecular. Em tumores, alterações como amplificação e mutações ativadoras, resultam na hiperativação de vários desses receptores. Em GBMs, a sinalização via EGFR promove divisão celular, invasão tumoral e resistência a radio e quimioterapia (NAGANE et al. 1996; CHAKRAVARTI et al. 2002; FAN e WEISS 2010). A atividade do receptor é aumentada nos casos em que há superexpressão de EGFR, inibição/deleção de reguladores negativos abaixo da via, EGFR constitutivamente ativado (por exemplo, EGFRvIII) e amplificação de EGFR (HATANPAA et al. 2010; MAZZOLENI et al. 2010). Aproximadamente metade dos GBMs com amplificação em *EGFR* possuem uma deleção no domínio extracelular de *EGFR* (delta-*EGFR* ou *EGFRvIII*), que resulta em atividade do receptor independente de ligante (ALDAPE et al. 2004). A proteína EGFRvIII interage com a selvagem para causar transformação celular via transdução de sinal e ativação da via de sinalização da proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição 3 (STAT3) (FAN et al. 2013). A superexpressão de EGFRvIII foi descrita como um fator forte para predição de prognóstico ruim na presença de amplificação de EGFR (SHINOJIMA et al. 2003).

Além do TCGA, outros projetos disponibilizam bancos de dados públicos para análise em larga escala de GBMs (EDGAR 2002; MADHAVAN et al. 2009; BARRETT et al. 2013). Em geral, esses outros bancos servem como fontes secundárias ao TCGA e são utilizados em estudos que buscam por assinaturas genicas de GBMs, em conjunto ou à parte da subclassificação de GBMs proposta

pelo TCGA (LIANG et al. 2005; ZHAO et al. 2017). Contudo, mesmo com a grande quantidade de informações provenientes do TCGA e de outras fontes, ainda existe uma grande necessidade para a identificação de fatores preditivos sólidos, que resultariam em um tratamento individualizado dos pacientes. Para isso, é necessário compreender como ocorre o controle das principais vias de sinalização em GBMs, que resultaria na identificação de possíveis novos alvos terapêuticos.

1.2 VIAS DE SINALIZAÇÃO PI3K/AKT/mTORC1 E RAS/ERK

As habilidades de sustentar sinalização proliferativa, independência de fatores de crescimento externos, insensibilidade a sinais inibitórios do crescimento, evasão da apoptose, potencial replicativo ilimitado, capacidade de estimular a angiogênese e de invadir tecidos normais resultam da regulação anormal ou inexistente de diversas vias de sinalização nesses tumores (HANAHAHAN e WEINBERG 2011).

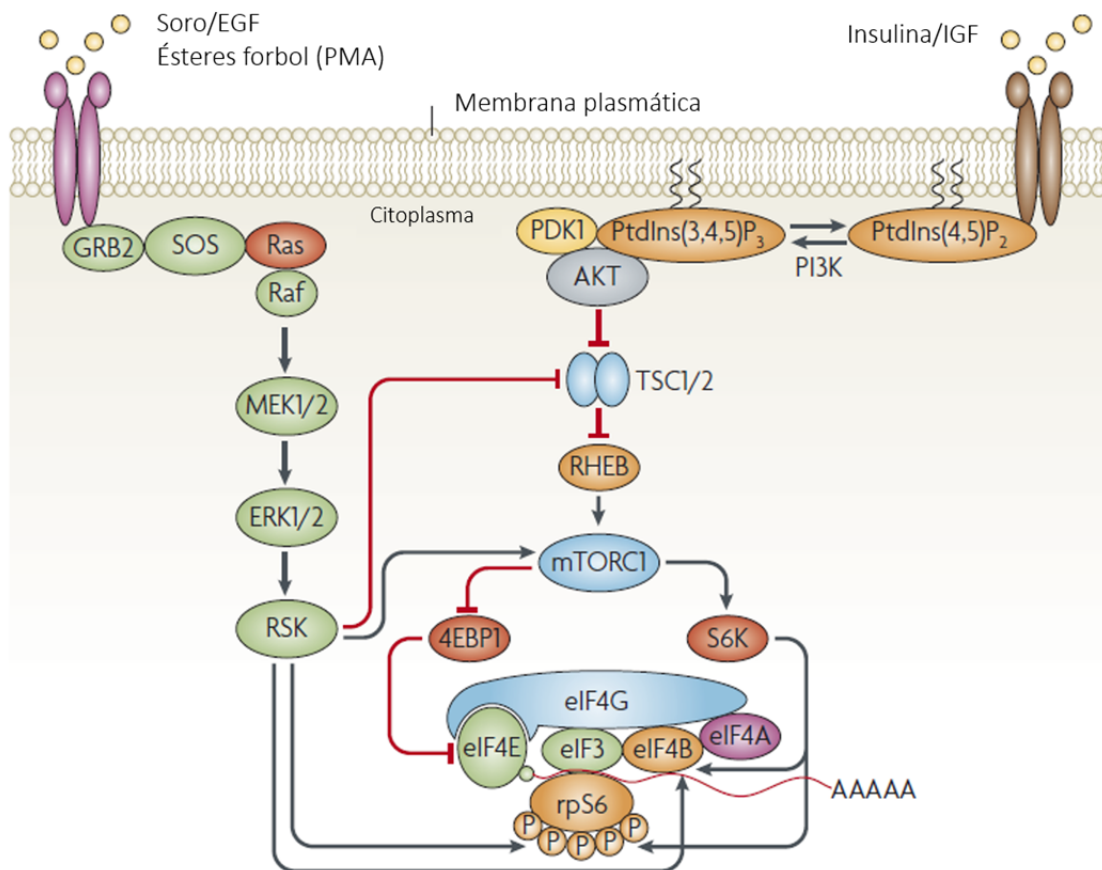
Conforme descrito pelo TCGA, as vias de sinalização comumente desreguladas em GBMs estão relacionadas às vias ativadas por RTKs, como PI3K/AKT (PKB)/mTORC1 e Ras/proteínas quinases reguladas por estímulos extracelulares (ERK1/2). As vias de PI3K/AKT/mTORC1 e Ras/ERK regulam os principais mecanismos para controle de sobrevivência, diferenciação, proliferação, metabolismo e motilidade celular, em resposta a estímulos extracelulares (MENDOZA et al. 2011). Ambas as vias têm início com a ativação de RTKs. Além de seus mecanismos independentes de regulação (*feedbacks*), as vias estão integradas e conversam entre si, regulando uma a outra extensivamente, por meio de inibição ou ativação cruzada (*crosstalk*) (MENDOZA et al. 2011). De maneira importante, as vias convergem em termos de substratos e processos celulares regulados pelos mesmos. A modulação da via de mTORC1, importante modulador da síntese de proteínas, pela via de Ras/ERK é um exemplo da convergência entre as vias e é o foco do nosso estudo (Figura 3).

A via canônica de PI3K/AKT inicia-se com a ativação de RTK ou receptores acoplados a proteína G (GPCR), por meio de fatores de crescimento como insulina. A ativação da via leva ao recrutamento e ativação de uma ou mais isoformas da família de PI3K da classe I, na membrana plasmática. Também importante para

regulação de PI3K é a interação com membros da família Ras de pequenas GTPases. A classe I de PI3Ks fosforila predominantemente PI4,5P₂, produzindo PIP₃. Apesar de isoformas específicas de PI3K serem diferentemente ativadas de acordo com o contexto celular, o resultado final é o mesmo: realocização de AKT inativo em sítios na membrana que possuem acúmulo de PIP₃ ou PI3,4P₂, através da interação com o domínio PH (Pleckstrin-homology) de AKT. Domínios PH funcionam como módulos de ligação a lipídeos em diversas proteínas, incluindo diversas quinases citoplasmáticas. Assim, além de AKT, a molécula PIP₃ gerada na parte interna da membrana plasmática recruta outra proteína serina/treonina quinase que contém o domínio PH, denominada quinase 1 dependente de 3-fosfoinosítido (PDK1) (ANDJELKOVIĆ et al. 1997; BELLACOSA et al. 1998). PDK1 é responsável por fosforilar AKT na Thr308. Essa fosforilação é necessária e suficiente à ativação de AKT, mas a ativação máxima da proteína requer fosforilação adicional em Ser473 por mTORC2, responsável por estabilizar a fosforilação em Thr308 e o estado ativo de AKT (SARBASSOV et al. 2005). Os níveis de PIP₃ são muito baixos em células de mamíferos sem estímulo de crescimento e são fortemente regulados, devido aos efeitos combinados de uma rígida regulação de PI3K e da ativação de diversas fosfatases de PIP₃, como PTEN e inositol fosfatases contendo o domínio SH2 (SHIP).

Uma vez ativada, AKT promove sobrevivência, proliferação e crescimento celular por meio da fosforilação e inibição de diversos substratos chave, que inclui o inibidor de mTORC1, TSC2 (ou tuberina). TSC2, junto de TSC1 (ou hamartin), integram o complexo proteico da esclerose tuberosa (TSC). Na ausência de fatores de crescimento, TSC2 funciona como uma proteína ativadora de GTPase (GAP) para a GTPase proteína homóloga à Ras (Rheb), um regulador positivo de mTORC1. Dessa forma, o complexo TSC mantém Rheb-GDP. Sob estímulo, AKT fosforila TSC2 e causa inibição de TSC (GAO et al. 2002; INOKI et al. 2002; MANNING et al. 2002; POTTER et al. 2002), permitindo que Rheb se ligue a GTP e ative mTORC1 (LI et al. 2004). A regulação da expressão gênica por meio do controle traducional via mTORC1 é um mecanismo fundamental que está implicado em diversos processos biológicos e sua desregulação contribui para o desenvolvimento de doenças, exercendo um papel-chave na tumorigênese.

A via de Ras/ERK é ativada por fatores de crescimento, hormônios polipeptídeos, neurotransmissores, quimiocinas e ésteres de forbol (como PMA), que sinalizam por meio de seu RTK cognato e receptores acoplados à proteína G (GPCRs), ou pela ativação direta da proteína quinase C (PKC) (MCKAY e MORRISON 2007; ROZENGURT 2007). A autofosforilação dos RTKs induzida por ligantes fornece sítios de ligação específicos para proteínas adaptadoras que possuem domínios SH2 ou PTB, como a proteína 2 ligada a receptores para fatores de crescimento (Grb2). A rota mais caracterizada da ativação de Ras ocorre na membrana plasmática e é mediada por SOS, um fator de troca do nucleotídeo guanina (GEF). SOS é recrutado do citosol para a membrana como resultado de sua interação com Grb2 e estimula a troca do GDP ligado a Ras por GTP, que é necessário para uma regulação positiva da atividade de Ras e a subsequente ativação de uma via de MAPK. A via das MAPK, consiste de uma proteína quinase inicial regulada por GTPase (MAPKKK), que fosforila e ativa uma quinase intermediária (MAPKK) que, por sua vez, fosforila e ativa uma MAPK efetora. Na via Ras/ERK, esses componentes são a proteína Ras e as quinases Raf (MAPKKK), MEK (MAPKK) e ERK1/2 (MAPK). Essa troca de nucleotídeo permite a interação entre Ras com seus efetores, como Raf. Raf ativada se liga e fosforila MEK1/2 que, então, fosforila ERK1/2 no motivo conservado Thr-Glu-Tyr em seu *loop* de ativação (CARGNELLO e ROUX 2011). A proteína ERK ativada fosforila fatores de transcrição e proteínas sinalizadoras, como RSK. Os alvos nucleares de ERK incluem os fatores de transcrição complexo ternários (TCF), que possuem um importante papel na indução de genes de ativação imediata (IEGs). Os produtos de IEG, como c-Fos e c-Myc induzem genes de resposta tardia, que promovem sobrevivência, divisão e motilidade celular.

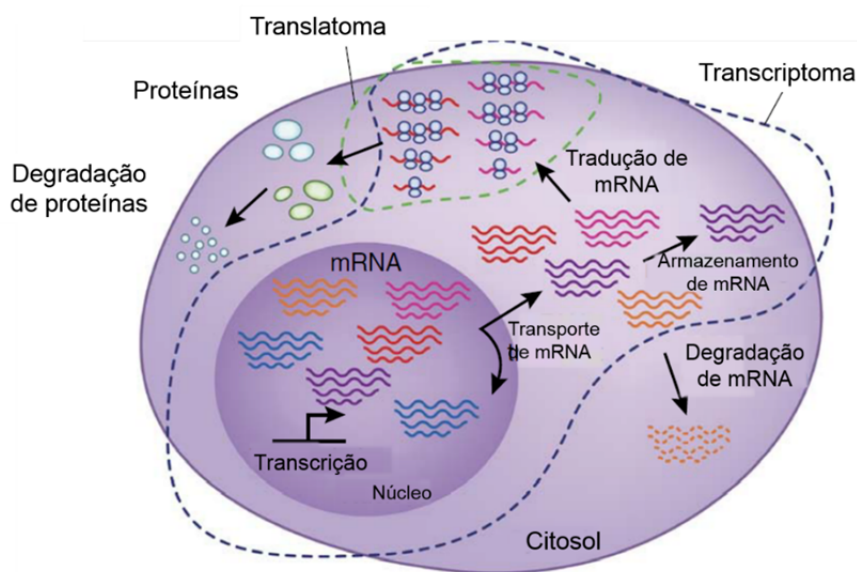


Fonte: Adaptado de ANJUM e BLENIS (2008).

Figura 3 - Esquema simplificado das vias Ras/ERK e PI3K/AKT convergindo no controle da maquinaria de tradução. O estímulo por fatores de crescimento promove a ativação de receptores tirosina quinases (RTKs) na membrana plasmática. Esse estímulo pode, então, ser convertido em respostas intracelulares por meio da ativação das vias PI3K/AKT e Ras/ERK. A via de PI3K/AKT tem início com a fosforilação e ativação da proteína quinase 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 4E-BP1, essenciais para o início da tradução. A via de sinalização de Ras/ERK tem início com a ativação da quinase 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.

1.3 O CONTROLE DA SÍNTESE DE PROTEÍNAS

Atualmente, sabe-se que os níveis de proteínas existentes em uma célula são modulados por diversos processos, desde a transcrição do mRNA no núcleo, até seu processamento, transporte, estabilidade e tradução no citosol, além da própria estabilidade proteica (Figura 4) (KOMILI e SILVER 2008; DESCHÊNES-SIMARD et al. 2014). Dentre esses processos, a tradução é o passo que mais consome energia na célula (BUTTGEREIT e BRAND 1995). Como resultado do alto consumo energético que a síntese de proteínas impõe à célula, diversos estudos apontam que a tradução do mRNA seja a etapa chave que determina a composição do proteoma (SCHWANHÜSSER et al. 2011; KRISTENSEN et al. 2013). Dessa forma, o controle da tradução possui um papel importante na regulação da expressão gênica, o que significa que o mesmo necessita ser rigidamente controlado (ROLFE e BROWN 1997; SONENBERG e HINNEBUSCH 2009).



Fonte: Adaptado de PICCIRILLO et al. (2014).

Figura 4 - Mecanismos que regulam a expressão gênica. A regulação de subconjuntos de mRNAs pode ocorrer a níveis de transcrição no núcleo, transporte para o citosol, degradação, armazenamento e tradução. As demarcações hachuradas correspondem às populações de mRNA estudadas pela “translatômica” (que estuda os mRNAs que estão engajados na síntese de proteínas, compondo translátoma) e “transcriptômica” (ou seja, que estuda a população de mRNA total, ou o transcriptoma).

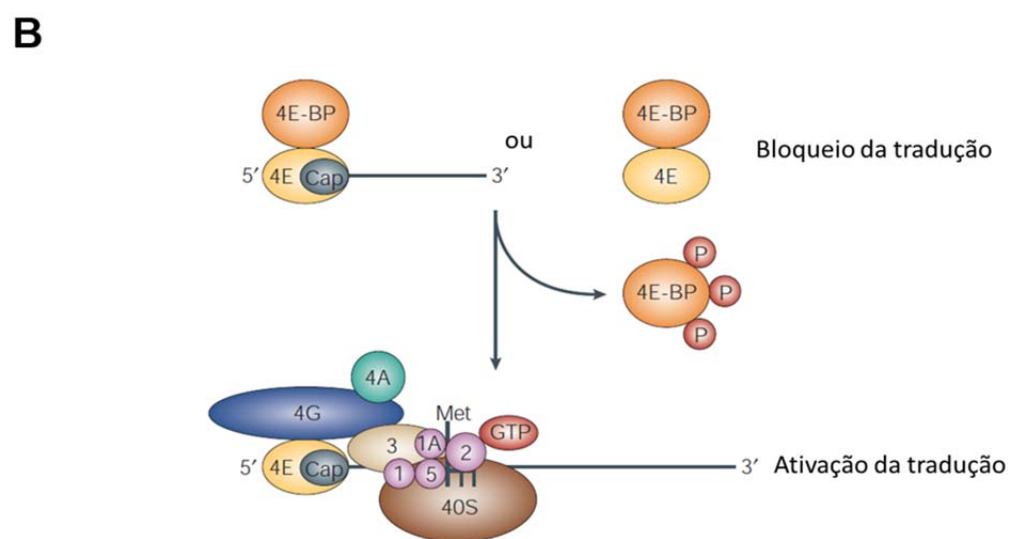
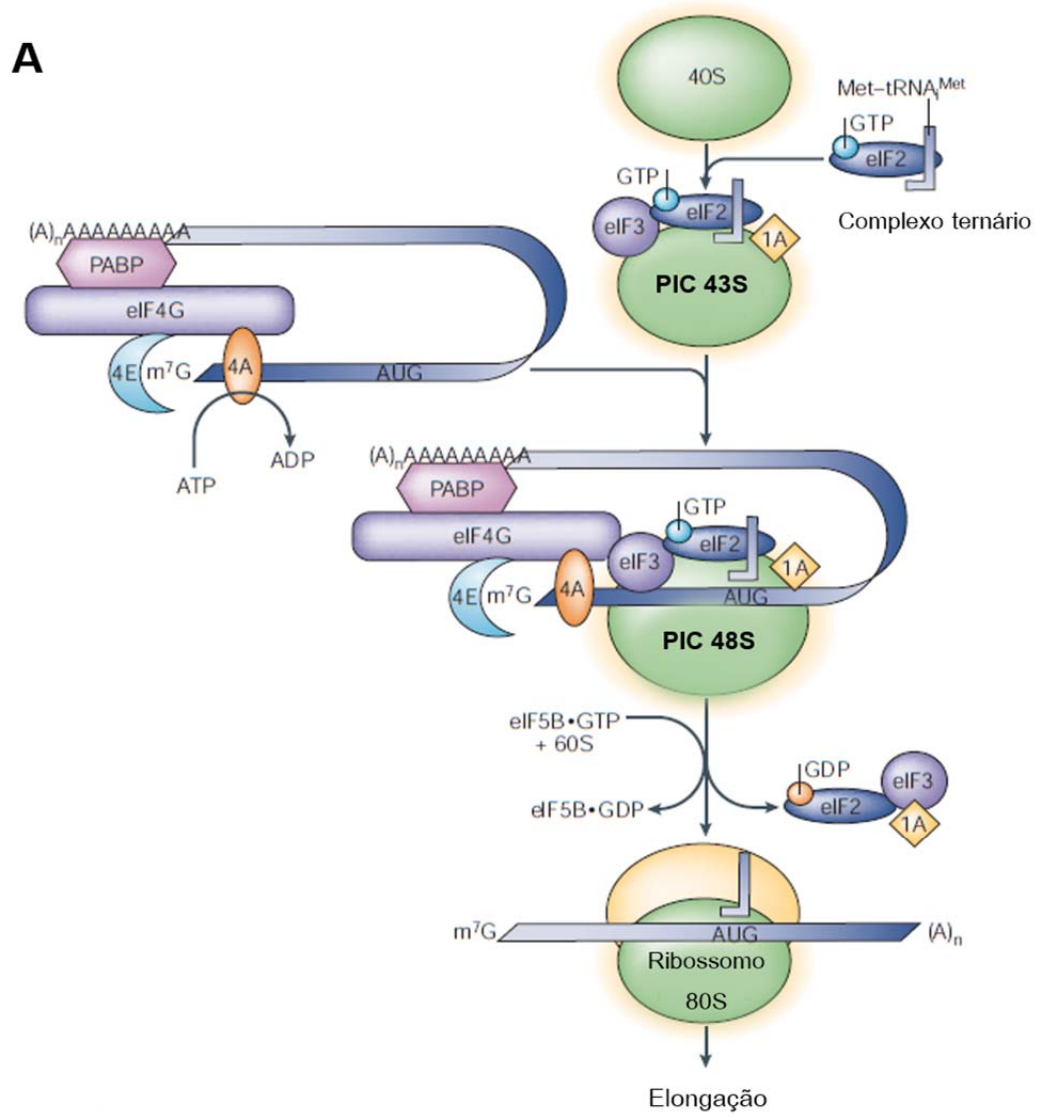
Comparado à regulação transcricional, o controle traducional de mRNAs existentes permite mudanças mais rápidas na concentração celular das proteínas codificadas. A reprogramação requerida para a transformação celular e desenvolvimento tumoral é promovida pela ativação de vias oncogênicas chave, que induzem respostas adaptativas responsáveis tanto por aumentar a síntese global de proteínas, como por modular a codificação de mRNAs específicos em resposta a sinais ambientais. Essas respostas são mediadas pela desregulação do controle da síntese de proteínas, ou controle traducional de mRNAs. Esse controle pode ser utilizado como um mecanismo pelo qual vias oncogênicas promovem transformação celular e desenvolvimento tumoral. A desregulação do processo traducional pode ser considerada uma das marcas do câncer e está relacionada à proliferação aberrante, sobrevivência, angiogênese, alterações na resposta imune e metabolismo energético de câncer (KEVIL et al. 1996; POLUNOVSKY et al. 1996; LARSSON et al. 2007; COLINA et al. 2008; TOPISIROVIC e SONENBERG 2011).

1.3.1 Iniciação da Tradução Dependente de CAP

Durante o processo de transcrição eucariótica, os mRNAs nascentes são modificados nas terminações 5' e 3'. A primeira modificação ocorre na extremidade 5', na qual um *cap*, composto por uma guanina modificada por um grupo metil (7-metilguanossina) é adicionado, formando a estrutura 5'm(7)GpppX (na qual m(7)G é uma 7-metilguanossina, p é um grupo fosfato e X é qualquer base). O processo de adição deste composto, o capeamento, é a primeira modificação feita no RNA transcrito (RAMANATHAN et al. 2016), ocorrendo após a RNA polimerase II ter produzido um fragmento de aproximadamente 25 nucleotídeos de RNA durante a transcrição. Já na extremidade 3' do RNA mensageiro ocorre a poliadenilação, ou seja, a adição de uma sequência repetitiva de 80 - 250 adeninas sobre a extremidade 3' (cauda poli-A). Essas modificações são importantes, pois aumentam a estabilidade do mRNA e auxiliam na exportação para o citoplasma, onde desempenham um papel importante na tradução.

O processo de tradução pode ser dividido nas etapas de iniciação, alongação, terminação e reciclagem dos ribossomos (SONENBERG e HINNEBUSCH 2009). A iniciação é a etapa crítica, na qual a maioria das vias de controle traducional age. O

início da tradução é um processo com várias etapas que finaliza no reconhecimento do códon de início AUG pelo RNA transportador especializado em iniciação acoplado a uma metionina (Met-tRNA_i), levando à montagem do ribossomo 80S, capaz de realizar a etapa de alongação. A via canônica da iniciação da tradução, responsável pela tradução da maioria dos mRNAs é dependente de 5' *cap*. No processo de iniciação dependente de *cap* (Figura 5), é necessária a formação de um complexo ternário: Met-tRNA_i + eIF2 + GTP. Esse complexo liga-se à subunidade ribossomal 40S em conjunto com outros fatores de início (eIFs) da tradução (eIF1, eIF1A, eIF3 e eIF5), formando o complexo de pré-iniciação 43S (PIC 43S). O PIC 43S liga-se ao mRNA próximo à extremidade 5', que contém o m(7)GpppX 5'-*cap*, formando o PIC 48S. Isso é feito com o auxílio do complexo de união ao *cap*, formado pelo complexo eIF4F (composto pela proteína de ligação ao *cap* eIF4E, pela RNA helicase eIF4A e por uma grande proteína adaptadora eIF4G) e pela proteína de ligação a poli-A (PABP), cuja interação com eIF4G promove a circularização do mRNA, por unir as terminações 5' e 3' do mRNA (SONENBERG e HINNEBUSCH 2009). Dessa maneira, se forma o complexo de pré-iniciação 48S, responsável por escanear a região 5' não traduzida (5'UTR), com auxílio de eIF4A, cuja atividade é estimulada por eIF4B, até que seja identificado o códon de início AUG. O pareamento perfeito com o códon AUG, no contexto de uma sequência kozak (KOZAK 1989), leva à parada do rastreamento do mRNA e à hidrólise de GTP do complexo ternário eIF2-GTP-Met-tRNA_i. Assim, com a liberação de eIF2-GDP e outros eIFs, a subunidade 60S pode se acoplar e formar um complexo de iniciação 80S, pronto para começar a fase de alongação da cadeia peptídica (HINNEBUSCH e LORSCH 2012).



Fonte: Adaptado de KLANN e DEVER (2004) e GEBAUER e HENTZE (2009).

Figura 5 - A iniciação da tradução de mRNA dependente de 5' *cap* em eucariotos e seu controle por 4E-BPs. (A) A etapa de iniciação começa com a formação do complexo de pré-iniciação 43S (PIC 43S), resultante da união entre a subunidade ribossomal 40S com fatores como eIF3 e eIF1A (1A) e com o complexo ternário, formado pelo fator de iniciação da tradução 2 (eIF2) ligado a GTP e ao RNA de transferência ligado a metionina (Met-tRNA_i^{Met}). O PIC 43S é, então, recrutado ao mRNA que foi circularizado por meio da interação entre o complexo de ligação ao cap eIF4F (eIF4E, junto a eIF4G e eIF4A), ligado à estrutura 5' cap 7-metil-GTP (m7Gppp) e a proteína de ligação à cauda poli-A (PABP), sendo formando o complexo de pré-iniciação 48S (PIC 48S). PIC 48S escaneia e localiza o códon de iniciação AUG e, então, ocorre a hidrólise de GTP por eIF2 e a consequente dissociação dos fatores associados ao PIC 48S. A dissociação permite a ligação da subunidade ribossomal 60S, dependente da hidrólise de eIF5B-GTP. O ribossomo 80S, formado, pode, então, iniciar a etapa de elongação e síntese proteica. (B) O controle da iniciação por meio das proteínas de ligação a eIF4E (4E-BPs). 4E-BPs se ligam a eIF4E e impedem sua interação com eIF4G, inibindo a etapa de iniciação da tradução. A fosforilação de 4E-BPs por mTORC1 faz com que eIF4E seja liberado para interação com eIF4G e, assim, ative a tradução.

A iniciação da tradução é fortemente controlada (SONENBERG e HINNEBUSCH 2009). Durante essa etapa, os fatores de início de tradução desempenham um papel crucial, pois coordenam diversos pontos de controle. Em câncer, alguns fatores tem a expressão aumentada durante o desenvolvimento e progressão tumoral. De maneira importante, fatores de início de tradução podem aumentar a síntese de proteínas (quantitativamente) ou a expressão de mRNAs específicos (qualitativamente). Assim, por meio da regulação da iniciação da tradução, é possível controlar qual mRNA é traduzido e a taxa na qual essa tradução ocorre. Essa regulação contribui para o estabelecimento de ambientes celulares compostos por proteínas com concentrações adequadas. A deregulação desse controle é fundamental para o desenvolvimento e progressão tumoral.

Estudos mostram que ocorre a desregulação de eIFs e de seus reguladores em diversos tipos tumorais. O fator cujo papel relacionado ao desenvolvimento e progressão de neoplasias que foi mais bem caracterizado até o momento é eIF4E, componente do complexo eIF4F. eIF4E é geralmente superexpresso em cânceres e é fortemente relacionado à patogênese da doença (GRAFF et al. 2008). A função de eIF4E é regulada de diferentes maneiras: através da expressão de eIF4E; através da ligação com proteínas de ligação a eIF4E (4E-BPs) (Figura 5B); e por sua

fosforilação no resíduo Ser209, pelas proteínas quinases MAP de integração de sinal (MNK1 e MNK2) (SONENBERG e HINNEBUSCH 2009). Em tumores cerebrais, um estudo examinou a abundância de eIF4E em três tipos tumorais, a saber, astrocitomas, meningiomas e carcinomas oligodendrogliais e mostrou que há aumento da expressão de eIF4E nos três tipos, porém os níveis de eIF4E fosforilado não se correlacionam com a agressividade do tumor (TEJADA et al. 2009). Os fatores eIF4G e eIF4A também são encontrados superexpressos em algumas malignidades. Aumento da expressão de eIF4G está associado a estados agressivos de câncer de pulmão e câncer de mama inflamatório; além disso, eIF4G é superexpresso em câncer cervical, sendo que os altos níveis se correlacionam com um prognóstico ruim em carcinoma de nasofaringe (COMTESSE et al. 2007; SILVERA et al. 2009; LIANG et al. 2014). eIF4A é encontrado superexpresso em pulmão e câncer cervical, no qual níveis mais baixos detectados após radiação é preditivo de melhor sobrevida. Os níveis de eIF4A são controlados por seu inibidor, proteína de morte celular programada 4 (PDCD4), que se liga a eIF4A e bloqueia sua interação com eIF4G, impedindo a participação de eIF4A na iniciação da tradução (YANG et al. 2003; LARONDE-LEBLANC et al. 2007). Interessantemente, níveis de PDCD4, uma proteína supressora tumoral, foram reportados reduzidos em diversos cânceres, incluindo GBMs (GAO et al. 2009).

Na etapa de iniciação, a regulação se dá por meio do recrutamento do ribossomo pelo complexo eIF4F (HINNEBUSCH 2014). Dessa forma, o controle da atividade e formação do complexo eIF4F deve ser fortemente regulado para manter a homeostase celular, o que é realizado pelas principais vias de transdução de sinal (Figura 3). Uma das principais vias de sinalização que modula a etapa de iniciação da tradução dependente de 5' *cap*, afetando a síntese de proteínas, tanto globalmente, como de mRNAs específicos, é a via de PI3K/AKT/mTORC1, por meio da ativação de mTORC1 (ENGELMAN 2009). A via Ras/ERK, assim como PI3K/AKT é comumente ativada em câncer e pode afetar mTORC1 por meio da fosforilação promovida por ERK ou RSKs de TSC2 e da proteína regulatória associada à mTOR (RPTOR ou Raptor) (BALLIF et al. 2005; CARRIÈRE et al. 2008; CARRIÈRE et al. 2011). Além disso, MNK1 e MNK2, ativados por ERK, estimulam a tradução pela

fosforilação de eIF4E, promovendo iniciação da tradução e tumorigênese (WASKIEWICZ et al. 1997).

1.3.2 O Complexo mTORC1

mTORC1 é um dos complexos multiproteicos que contém a proteína mTOR, uma serina/treonina quinase, da família de *PI3K-related kinase* (PIKK) que compõe a subunidade catalítica dos dois complexos funcionalmente e estruturalmente distintos: o complexo 1 de mTOR (mTORC1) e o 2 (mTORC2). Por meio dos complexos mencionados, mTOR medeia diversas funções celulares, atuando de maneira importante em vias de sinalização de células eucarióticas. Dentre os processos regulados por mTOR, podemos citar seu papel em crescimento, metabolismo e doenças, sendo frequentemente desregulada em câncer (SAXTON e SABATINI 2017).

Estruturalmente, mTORC1 é composto por mTOR, Raptor, mLST8, PRAS40 e DEPTOR. Dentre as proteínas que compõem o complexo, Raptor é indispensável, uma vez que é responsável por facilitar o recrutamento dos substratos de mTORC1, ligando-se ao motivo TOS de mTOR, que é encontrado em diversos substratos canônicos de mTORC1 (NOJIMA et al. 2003). Além disso, Raptor é necessária à localização subcelular correta do complexo (SAXTON e SABATINI 2017). Já mLST8, associa-se ao domínio catalítico de mTOR, sendo capaz, dessa forma, de estabilizar o motivo *loop* de ativação de quinase. As subunidades PRAS40 e DEPTOR são caracterizadas por serem as subunidades inibitórias do complexo. Por outro lado, mTORC2 é composto por mTOR, mLST8, DEPTOR, Rictor (cuja função é análoga à de Raptor no complexo mTORC1) e das subunidades regulatórias mSin1 e Protor1/2.

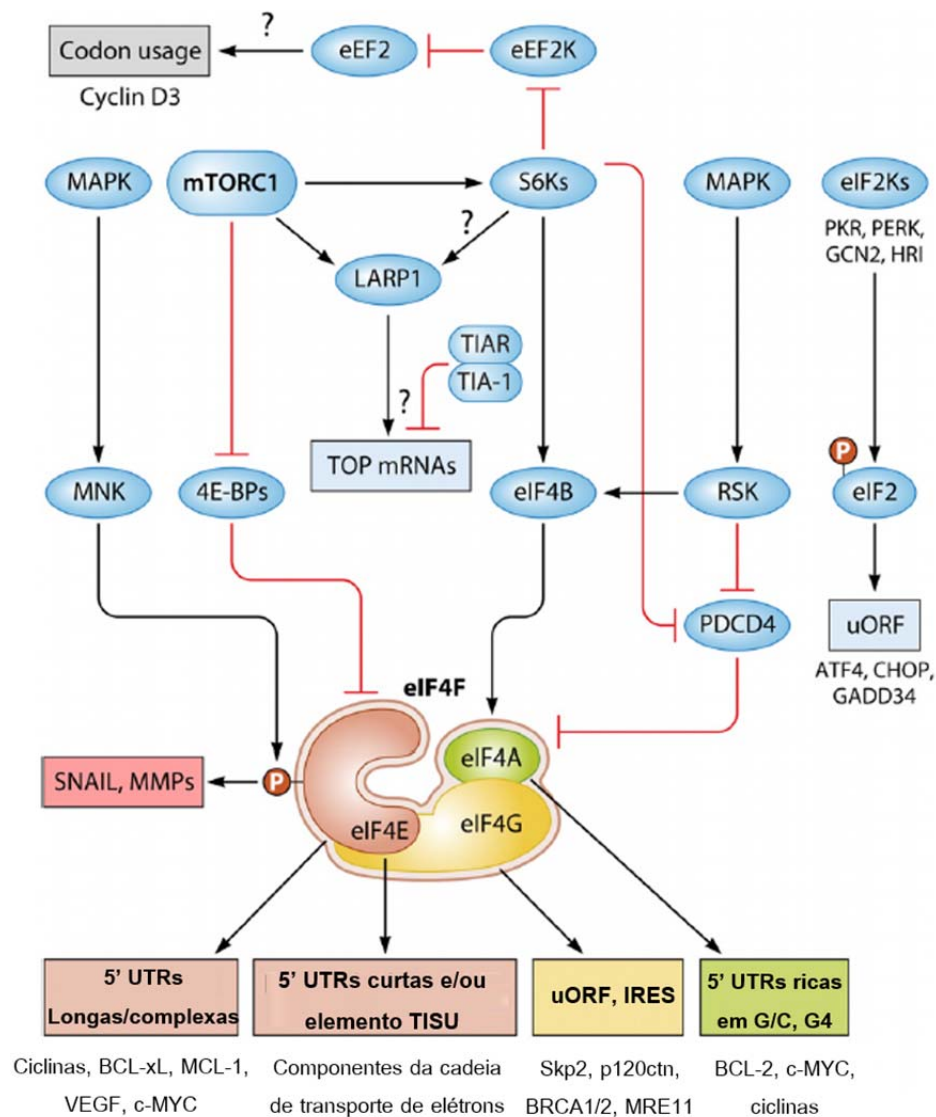
Uma diferença fundamentalmente importante entre mTORC1 e mTORC2 está na sensibilidade da resposta ao tratamento com rapamicina (Sirolimus), molécula isolada de bactérias que dá origem ao nome de mTOR (DOS et al. 2004). Após a identificação da rapamicina, a mesma foi extensivamente estudada e, finalmente, caracterizada por inibir preferencialmente o complexo mTORC1, visto que a sensibilidade de mTORC2 ao tratamento mostrou-se substancialmente menor (SARBASSOV et al. 2005). A droga atua de modo a formar um complexo com a

proteína intracelular FKBP12, o qual inibe alostericamente mTORC1, por meio do enfraquecimento da interação entre Raptor e mTOR (BROWN et al. 1994; KIM et al. 2002). Além disso, o complexo rapamicina-FKBP12 liga-se ao domínio FRB de mTOR, de forma a restringir a fenda catalítica e, dessa forma, obstruir parcialmente os substratos do sítio ativo (OSHIRO et al. 2004; YIP et al. 2010; YANG et al. 2013).

Em termos funcionais, mTORC2 pode regular mTORC1 por meio da fosforilação de AKT e regular a organização do citoesqueleto, proliferação e sobrevivência pela fosforilação de diversos membros da família de proteínas quinase AGC (PKA/PKG/PKC) (DOS et al. 2004; ZONCU et al. 2011). Por outro lado, mTORC1 regula diversas funções importantes para o crescimento celular como tradução, biogênese ribossomal, autofagia e síntese de nucleotídeos. Os processos anabólicos regulados por mTORC1, ou seja, que induzem crescimento, ocorrem por meio da fosforilação de substratos chaves para processo de tradução, como 4E-BP1, proteínas quinases S6 (S6Ks, a saber S6K1 e S6K2) e proteína 1 relacionada a La (LARP1) (FONSECA et al. 2018). Simultaneamente, mTORC1 inibe o catabolismo, por meio da inibição da quinase unc-51-símile (ULK), uma quinase importante para o processo de autofagia (KIM et al. 2011).

1.3.3 O Controle da Tradução via mTORC1

A modulação da tradução por mTORC1 se dá, principalmente, por meio da regulação da montagem do complexo eIF4F, afetando a síntese proteica global e de mRNAs específicos (Figura 6) (ROUX e TOPISIROVIC 2018). Numa escala de tempo mais longa, mTORC1 promove também a transcrição de genes que codificam rRNAs e tRNAs (ROUX e TOPISIROVIC 2012). Isso resulta indiretamente na estimulação da síntese proteica por meio da ativação do fator intermediário de transcrição 1-alfa (TIF1A), bem como por meio da fosforilação e supressão da proteína repressora da transcrição de RNA polimerase III homólogo à MAF1 (MAF1), um inibidor da RNA polimerase III, que leva ao aumento da biogênese ribossomal e síntese de tRNA, respectivamente (KANTIDAKIS et al. 2010; MICHELS et al. 2010; SHOR et al. 2010).



Fonte: Adaptado de ROUX e TOPISIROVICC (2018).

Figura 6 - As vias PI3K/AKT/mTORC1 e Ras/ERK/RSK modulam a tradução de subconjuntos mRNAs particulares. Cada componente do complexo eIF4F modula a tradução de mRNAs com características específicas. A superexpressão de eIF4E, por exemplo, afeta a tradução de mRNAs que codificam proteínas envolvidas na iniciação e manutenção tumoral, como ciclinas, VEGF e BCL-xL. Já eIF4A promove a tradução de mRNAs com a região 5' UTR rica em C/G, como o motivo G4.

Sabe-se que 4E-BPs, quando não fosforilados, competem pelo sítio de ligação de eIF4G em eIF4E e interferem, dessa forma, com a montagem do complexo eIF4F (Figura 5B). A fosforilação de 4E-BP1 em múltiplos sítios por mTORC1 (em Thr37

e Thr46, seguida de Thr70 e Ser65) ocasiona mudanças conformacionais que resultam em sua dissociação de eIF4E, o que permite a montagem do complexo eIF4F e tradução de mRNAs dependentes de *cap* (GINGRAS et al. 1999, 2001). mTORC1 também fosforila eIF4G em diversos resíduos, mas a consequência funcional dessas fosforilações ainda é desconhecida (RAUGHT et al. 2000).

A fosforilação de S6K1 no resíduo Thr389 por mTORC1, propicia sua subsequente fosforilação e ativação por PDK1. Isso resulta na fosforilação de diversos substratos que possibilitam a iniciação da tradução do mRNA. S6Ks fosforilam a proteína ribossomal S6 (rpS6), responsável por promover a montagem do complexo de ligação ao *cap*, em Ser235, Ser236, Ser240, Ser244 e Ser247 em humanos; eIF4B, regulador positivo de eIF4A, é fosforilado em Ser406 e Ser422 (RAUGHT et al. 2004; SHAHBAZIAN et al. 2006); e PDCD4, inibidor de eIF4A, em Ser67 e Ser457, que leva a sua degradação pelo proteassomo, com consequente liberação do fator eIF4A do complexo inibitório PDCD4-eIF4A (YANG et al. 2003), tornando possível a associação de eIF4A com eIF4G. S6Ks também fosforilam a quinase fator de alongação 2 de eucariotos (eEF2K) em Ser366 (WANG et al. 2001), inibindo sua função como inibidor do fator de alongação eEF2, uma GTPase que promove a translocação do peptidil-tRNA do sítio A para o sítio P no ribossomo, aumentando a taxa de alongação.

Um dos alvos mais recentemente descritos de mTORC1 é LARP1, uma conservada proteína de ligação a RNA, que pertence à família que contém o motivo La (LAM). mTORC1 fosforila LARP1 em Ser689 e Thr692, enquanto S6K1 e/ou AKT podem fosforilar os sítios Ser770 e Ser979, sugerindo diversas camadas de regulação por fosforilação de LARP1. Os sítios de fosforilação por mTORC1 promovem a modulação da atividade de ligação a mRNA de LARP1. De maneira importante, foi proposto que LARP1 desempenhe um papel na modulação da estabilidade e/ou tradução de mRNAs que possuem um motivo denominado terminal oligo-pirimidina (TOP), que consiste de um trecho 5'-terminal de oligopirimidinas, caracterizado por uma citosina imediatamente posterior ao *cap*, seguida de 4 - 15 pirimidinas ininterruptas (FONSECA et al. 2015; LAHR et al. 2015, 2017). TOP mRNAs codificam para componentes da maquinaria traducional, incluindo proteínas ribossomais, PABP e eEF2. Assim, por meio da interação com o 5' *cap* de TOP

mRNAs e consequente impedimento do acesso de eIF4E ao *cap*, a ligação de LARP1 a TOP mRNAs inibe sua tradução em resposta a inibidores de mTORC1, sugerindo que a proteína serve como um interruptor que regula a tradução de TOP mRNAs (HONG et al. 2017).

1.3.4 Outros Mecanismos de Controle da Tradução

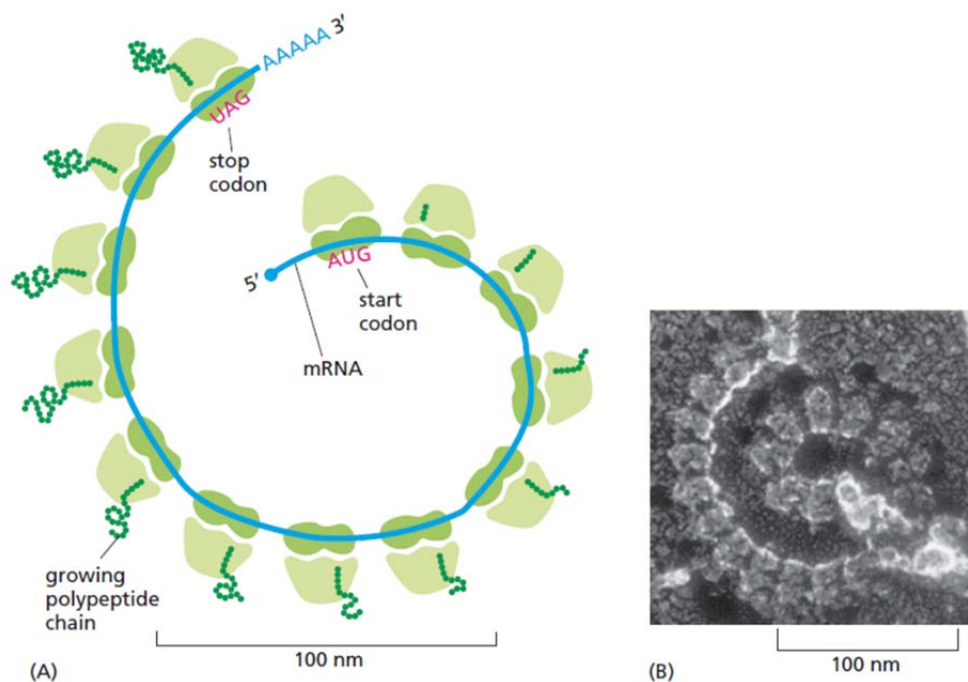
É importante mencionarmos que a tradução de mRNA pode ser mediada por fases de leitura abertas a montante (uORFs). As uORFs são janelas de leituras localizadas na região 5' não traduzida do mRNA, que podem inibir a tradução da janela de leitura subsequente, ou até mesmo promover o início da tradução na sequência codificadora (YOUNG e WEK 2016). São sensíveis à fosforilação por eIF2 α em resposta ao estresse ambiental, como, por exemplo falta de aminoácidos (Figura 6). Quando eIF2 α está fosforilado, a abundância dos complexos ternários necessários para o início da tradução diminui, o que acarreta na perda do efeito inibidor dos uORF sobre o ORF principal e permite a tradução específica dos mesmos.

A tradução independente de 5' *cap* é em geral mediada por estruturas no mRNA chamadas de sítio de entrada interna do ribossomo (IRES) (LEPPEK et al. 2018). Esta tradução requer um menor número de fatores de tradução e corresponde a 5% dos eventos de início de tradução em eucariotos. As IRES apresentam estruturas secundárias que promovem uma interação mais eficiente com o ribossomo 40S, possibilitando a iniciação da tradução sem o auxílio dos fatores de tradução. A complexidade destas estruturas secundárias irá determinar os fatores necessários para a montagem adequada do ribossomo competente 80S. Portanto, a tradução independente de *cap* é uma via de tradução importante em condições de inibição ou redução da tradução dependente de *cap*.

1.4 TRANSLATÔMICA APLICADA AO ESTUDO DA TRADUÇÃO

Uma vez que um ribossomo começou a fase de alongação de um mRNA que será traduzido, outros ribossomos podem iniciar a tradução do mesmo mRNA. Assim, se um mRNA está sendo ativamente traduzido, diversos ribossomos se

encontram associados à mesma molécula e dão origem a estruturas denominadas polissomos, ou polirribossomos, como mostrado na Figura 7. Dessa forma, quanto mais ribossomos um polissomo possuir, maior será a taxa de tradução de um determinado mRNA, já que mais proteínas poderão ser sintetizadas em um menor espaço de tempo.



Fonte: Essential Cell Biology 2e (2014).

Figura 7 - Esquema de um polissomo. Um mRNA ativamente traduzido possui diversos ribossomos associados, que traduzem simultaneamente a mesma molécula.

Os estudos dos mRNAs ativamente traduzidos em um dado contexto celular, ou seja, daqueles mRNAs que estão associados a mais ribossomos do que os mRNAs que são ineficientemente traduzidos, consistem no estudo do translátoma (Figura 4). Estudos sobre o translátoma são importantes, pois podem fornecer informações mais compatíveis em relação à expressão proteica, quando comparados a estudos de transcriptômica. Assim, a partir da análise dos mRNAs engajados na síntese de proteínas, é possível entender quais mRNAs são efetivamente necessários, por exemplo, frente a diferentes estímulos ou em diferentes neoplasias.

As abordagens que permitem estudar mudanças nas eficiências traducionais são realizadas utilizando técnicas de translátômica e incluem os perfis polissomais e

ribossomais (KUERSTEN et al. 2013). Por um lado, no perfil polissomal, os mRNAs eficientemente traduzidos (associados a mais de três ribossomos) são isolados pela separação bioquímica através da abordagem de ultracentrifugação em gradientes de sacarose e analisados por técnicas de larga escala, como microarranjos ou sequenciamento de última geração (LARSSON et al. 2013). Já no perfil ribossomal, se isolam e quantificam os fragmentos de mRNA protegidos por ribossomos (RPF) (KUERSTEN et al. 2013). Ou seja, enquanto uma técnica tem perspectiva de mRNAs (perfil polissomal), a outra tem de ribossomos (perfil ribossomal). Mais especificamente, uma técnica avalia mRNA traduzidos ativamente em termos de abundância absoluta (já que separa fisicamente os mRNAs com $n > 3$) e a outra o faz de forma relativa (já que conta o número de RPFs de mRNAs eficiente e ineficientemente traduzidos). Isso significa que a análise de mRNAs pouco abundantes cujos níveis se alteram de forma pouco dramática sob algum tratamento é enviesada na análise por perfil ribossomal, visto que são menos ponderadas (GANDIN et al. 2016).

Além disso, por meio do perfil polissomal é possível obter informações sobre as regiões 5'UTR dos transcritos, já que os mRNAs são isolados de forma integral, em contraste com as regiões RPFs que são analisadas por meio do perfil ribossomal (GANDIN et al. 2016). Isso é importante, visto que se sabe que as características intrínsecas dos mRNAs como, por exemplo, a estrutura primária e secundária das regiões 5'UTR modulam a tradução dos mesmos e, muitas vezes, determinam a taxa de ligação dos ribossomos (HINNEBUSCH et al. 2016). Dessa forma, as sequências na região 5'UTR, como as 5'TOP, reguladas por mTORC1/LARP1, servem como um elemento regulador cis que inibe a ligação de proteínas reguladoras da tradução (GEBAUER et al. 2012).

A técnica para isolar transcritos por meio do perfil polissomal baseia-se na sedimentação dos polissomos em gradientes de sacarose de acordo com a quantidade de ribossomos ligados a uma molécula de mRNA (MIKULITS et al. 2000). Dessa forma, quanto mais ribossomos ligados ao mRNA, mais densa fica a molécula e maior sua velocidade de sedimentação no gradiente. Essa distribuição dos diferentes componentes ribossomais (a saber, 40S, 60S, monossomos 80S e polissomos) é, então, determinada através da leitura em fluxo da absorbância a 254 nm. O resultado

dessa separação denomina-se perfil polissomal. A técnica de perfil polissomal permite, portanto, que sejam realizados o fracionamento e a coleta das amostras, de acordo com o número de ribossomos ligados a um transcrito. Assim, a fração polissomal de mRNA pode ser comparada diretamente com o transcriptoma total, isto é, com o conjunto de mRNA presente em um extrato celular, para determinar a proporção e identificar os transcritos ativamente traduzidos.

Dado que a composição do proteoma da célula é dependente do contexto celular, o estudo das alterações na eficiência da tradução de mRNAs, ou seja, da informação contida no translato das células, são de grande importância para compreender como efetivamente ocorre a regulação de processos biológicos em patologias, por exemplo. Na área de câncer, este tipo de análise está sendo utilizada cada vez mais para determinar o perfil de mRNAs traduzidos em vários tipos de tumores. Como exemplo específico dessa abordagem, observou-se, no estudo de RAJASEKHAR et al. (2003), que a ativação de PI3K ou do oncogene Ras, vias significativamente alteradas em GBMs, levava a uma importante mudança no perfil de mRNAs associados com polissomos, mas afetava muito pouco o perfil de mRNAs totais da célula (RAJASEKHAR et al. 2003). Outros estudos observaram os efeitos do fator de início de tradução eIF4E, que tem papel importante para o processo tumorigênico (RUGGERO et al. 2004). Foram encontrados cerca de 250 genes diferencialmente traduzidos comparando-se conjuntos de mRNAs polissomais provenientes de linhagens celulares normais ou superexpressando estavelmente eIF4E (LARSSON et al. 2006). Esses estudos suportam que as mudanças observadas teriam sido completamente perdidas em uma análise convencional do transcriptoma, ou seja, analisando mRNAs celulares totais.

Assim, por meio das técnicas de perfil polissomal e ribossomal, foi possível investigar a tradução em uma escala de transcritos a nível global, identificando os subconjuntos de mRNAs traduzidos em resposta a estímulos extra e intracelulares, que são regulados por vias que controlam a maquinaria traducional (INGOLIA et al. 2009; GANDIN et al. 2014).

1.4.1 A Tradução de mRNAs Específicos via mTORC1

Além de afetar a síntese proteica global, a tradução de subconjuntos de mRNAs específicos parecem ser especialmente dependentes de mTORC1 (Figura 6). Contudo, foram obtidas informações distintas por meio das técnicas de perfil polissomal e ribossomal, utilizadas na identificação das classes de mRNAs traduzidos de forma dependente da via mTOR (MASVIDAL et al. 2017). Por um lado, estudos de perfil ribossomal sugeriram que mTOR regule, de forma praticamente exclusiva, a tradução de mRNAs que apresentam motivos TOP ou TOP-like (HSIEH et al. 2012; THOREEN et al. 2012). Por outro lado, estudos de perfil polissomal sugeriram que mudanças na ativação de mTOR impactam a tradução de mRNAs que não contém o motivo TOP, além daqueles que o possuem (LARSSON et al. 2012). Conforme descrito na seção anterior, os vieses da técnica de perfil ribossomal foram responsáveis por esses achados controversos.

A partir de uma tecnologia denominada NanoCAGE, que permite a determinação de sítios de início de transcrição (TSS) em uma escala a nível de genômica, foi possível identificar e confirmar que um grande número de mRNAs que não contém o motivo TOP são sensíveis a mTOR (GANDIN et al. 2016). Dentre esses não-TOP mRNAs, uma subclasse de transcritos com 5'UTRs pequenas (< 50 nucleotídeos) foram identificados como sendo traducionalmente regulados via eixo mTORC1/4E-BP/eIF4E, sendo que a maioria desses mRNAs corresponde a genes nucleares com funções mitocondriais, incluindo componentes de complexos da cadeia respiratória (ex. *ATP50*, *ATP5D*, *NDUF6*). Esses transcritos frequentemente possuem um elemento iniciador da tradução de 5'UTR curta (TISU) e possuem a tradução fortemente afetada por alterações em eIF4E, mas não por eIF4A (ELFAKES et al. 2011; GANDIN et al. 2016).

Além disso, os mRNAs modulados por mTOR que não possuem o motivo TOP abrangem os transcritos que possuem a tradução fortemente dependente de mudanças nas atividades de 4E-BPs e/ou níveis de eIF4E (DE BENEDETTI e GRAFF 2004; GRAFF et al. 2008). Apesar de ter um efeito modesto na síntese proteica global, mudanças nos níveis de 4E-BPs e/ou fosforilação das mesmas alteram de forma radical a tradução de um subconjunto de mRNAs que codificam proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular (como *CCND3* e *ODC1*) e

angiogenese (*VEGF*). Esses mRNAs se sobrepõem consideravelmente com aqueles cuja tradução é alterada por mudanças nos níveis de eIF4E, os denominados “mRNAs sensíveis a eIF4E” (GRAFF e ZIMMER 2003; DE BENEDETTI e GRAFF 2004; GRAFF et al. 2008). Tais mRNAs possuem a região 5’UTR altamente estruturada e são mais dependentes da atividade helicásica de eIF4A, que é capaz de promover o desdobramento de estruturas secundárias presentes na região 5’UTR de mRNAs e tem atividade estimulada pelo fator eIF4B. Dessa forma, acredita-se que o recrutamento e atividade de eIF4A ao complexo eIF4F seja responsável pela sensibilidade a altos níveis de eIF4E (FEOKTISTOVA et al. 2013; GARCÍA-GARCÍA et al. 2015). Por outro lado, mRNAs que possuem 5’ UTR contendo 70 - 150 nucleotídeos, incluindo aqueles que codificam proteínas constitutivas (por exemplo actinas e tubulinas) exibem baixa sensibilidade a eIF4E (KOZAK 1987).

Assim, mTOR regula a tradução de mRNAs com características específicas na região 5’ UTR, incluindo diversos mRNAs que não possuem o motivo TOP (ROUX e TOPISIROVIC 2018).

1.5 DROGAS QUE INIBEM mTOR E PROMOVEM RESISTÊNCIA VIA RAS/ERK

Dadas as frequências das alterações nas vias PI3K/ AKT/mTORC1 e Ras/ERK descritas em GBMs (Figura 2) e da importância dos processos celulares regulados pelas mesmas para o desenvolvimento e progressão tumoral, diversos estudos buscaram aplicar os conhecimentos de biologia molecular ao desenvolvimento de terapias direcionadas. Assim, inibidores dessas vias foram, ou ainda são utilizados tanto na prática como em ensaios clínicos para o tratamento de GBMs (AKHAVAN et al. 2010; GRZMIL e HEMMINGGS 2013). Contudo, a regulação fina das vias, os mecanismos de *feedback* e as redes de vias que as mesmas controlam faz com que o sucesso das drogas seja limitado, o que está intimamente relacionado à capacidade dos GBMs de facilmente alterarem suas vias de sinalização para gerar resistência. Em particular, a via de Ras/ERK é considerada como um dos mediadores mais importantes da resistência para GBMs (GRZMIL e HEMMINGGS 2013).

Em GBMs, um estudo clínico de fase 1 em pacientes tratados com rapamicina mostrou que o tratamento daqueles que apresentavam deleção do gene *PTEN* resultou na redução do tamanho do tumor, bem como de sua proliferação, em metade dos casos (CLOUGHESY et al. 2008). Apesar dos resultados aparentemente promissores no estudo mencionado, as desvantagens do uso da droga e os desafios do uso de inibidores de mTOR se apresentaram: os pacientes mostraram altos níveis de AKT ativado e PRAS40, devido à perda do mecanismo de *feedback* negativo regulado via mTORC1, refletindo numa diminuição da sobrevida livre de progressão. De fato, o sucesso excepcional de terapias com drogas derivadas de rapamicina, ou rapálogos, mostrou-se específico para alguns tipos tumorais, principalmente em pacientes com mutações envolvendo os genes da própria via, *TSC1* ou *MTOR* (IYER et al. 2013; WAGLE et al. 2014).

Como consequência do mecanismo de inibição da rapamicina, que não age diretamente no domínio catalítico de mTOR, as funções do complexo mTORC1 são inibidas apenas de forma parcial nos modelos tratados com essa droga. O processo de tradução, por exemplo, é afetado apenas parcialmente após o tratamento com a droga, visto que a mesma inativa 4E-BP1 de forma incompleta, ou seja, não a desfosforila completamente (CHOO et al. 2008; THOREEN et al. 2009). A eficiência de rapálogos no tratamento de cânceres tem sido menor do que esperada já que além da inibição incompleta de 4E-BPs, o fracasso da droga está relacionado à ativação de AKT por meio do rompimento do *loop* de *feedback* mTORC1/S6K/RTK/PI3K e mTORC1/proteína ligada ao receptor fator de crescimento 10 (GRB10)/PI3K (RODRIK-OUTMEZGUINE et al. 2011). De maneira interessante, o tratamento rapamicina a longo prazo pode afetar mTORC2 de maneira indireta, já que a interação entre rapamicina-FKBP12 e mTOR recém sintetizada impede a montagem de mTORC2 (SARBASSOV et al. 2006). Além disso, para compensar a sinalização via mTOR reduzida, os tumores tratados com rapálogos ativam MAPKs de forma dependente de PI3K (CARRACEDO et al. 2008).

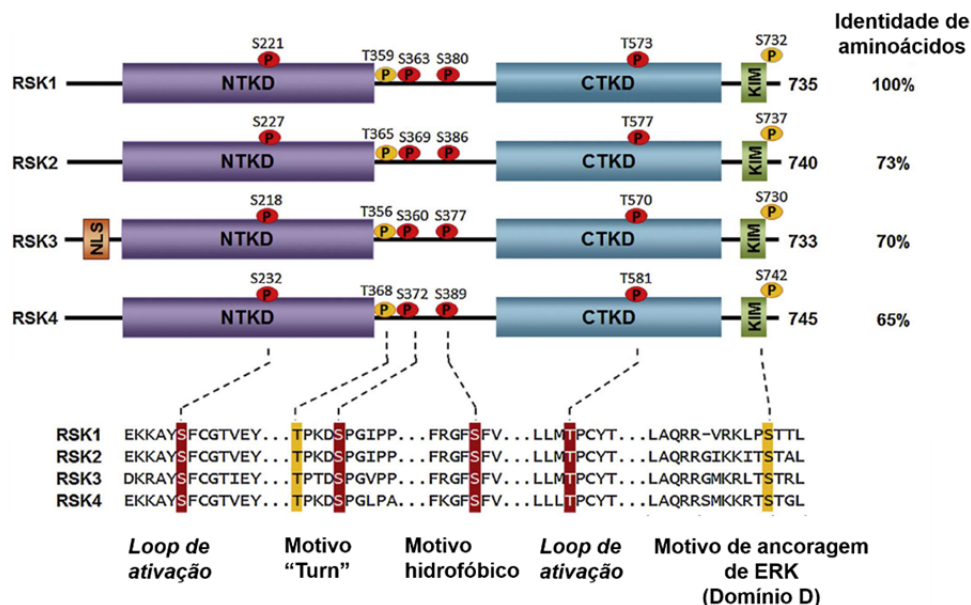
Devido à ineficácia de rapálogos em terapias antitumorais, surgiu a necessidade da busca por drogas de segunda geração, que inibissem completamente os efeitos de mTOR. Nesse sentido, acadêmicos e indústria farmacêutica

desenvolveram compostos que inibem a atividade catalítica de mTOR (o que significa que ambos complexos, mTORC1 e mTORC2, são inibidos). Assim, a segunda classe de inibidores de mTOR caracteriza-se por agir de forma a competir pelo sítio de ligação de ATP da proteína. Nessa categoria de drogas, encaixa-se Torin1, molécula sintetizada a partir de quinolona 1, que bloqueia o acesso de mTORC1 aos sítios de fosforilação de todos os substratos. Nesse caso, contudo, um problema que surge quando são inibidos mTORCs vem da ativação de vias *upstream*. Devido à inibição de mTORC2, a via de sinalização de AKT é inibida. Contudo, a longo prazo, o mecanismo de *feedback* da via supera esse bloqueio e AKT pode ser reativado, devido a perda do *loop* de *feedback* positivo dependente de mTORC2 (RODRIK-OUTMEZGUINE et al. 2011).

Para contornar esses problemas, uma alternativa é a utilização inibidores duplos de PI3K/mTOR como estratégia terapêutica (SAXTON e SABATINI 2017). Essa classe de inibidores surgiu da observação de que inibidores de PI3K também inibiam mTOR, devido a semelhança entre seus domínios catalíticos. Dessa forma, esses inibidores são mais potentes, por inibirem tanto a fosforilação de AKT, como de 4E-BPs. Isso é evidenciado por estudos clínicos, que mostram resultados promissores da utilização de inibidores duplos PI3K/mTOR isoladamente ou com concomitante utilização de inibidores da via de MEK/ERK (AZIZ et al. 2010; KNIGHT et al. 2010; YU et al. 2014).

1.6 A FAMÍLIA DA PROTEÍNA QUINASE RSK

A ativação de ERK1/2 acarreta na consequente fosforilação de seus substratos, que estão presentes em diversos compartimentos celulares (COURCELLES et al. 2013). Dentre os substratos de ERK1/2 encontram-se as RSK, uma importante família de Ser/Thr quinases. Em humanos, a família das RSK é composta por quatro isoformas (RSK1 - 4) altamente homólogas, que apresentam uma identidade de aminoácidos entre 65 e 73% (Figura 8) (ANJUM e BLENIS 2008).



Fonte: adaptado de HOULESA e ROUX (2017).

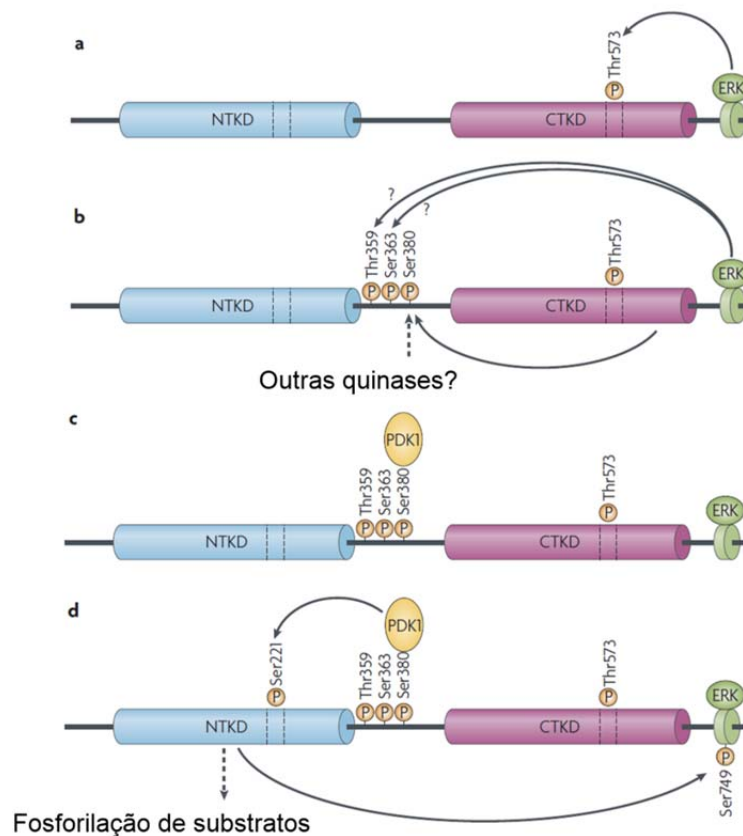
Figura 8 - Estrutura e domínios das RSKs. RSKs são distintas das outras quinases por apresentarem dois domínios quinase distintos funcionais, os domínios N- e C- terminal (NTKD e CTKD), que são conectados por uma região que contém os motivos *turn* e hidrofóbico. Em CTKD, existe uma sequência conhecida como domínio D na qual ocorre a ligação da quinase ERK.

As RSKs são quinases peculiares, pois apresentam, como característica única, dois domínios quinases distintos e funcionais nas regiões N- e C- terminal (NTKD e CTKD, respectivamente), unidos por uma região que contém motivos regulatórios importantes, incluindo os motivos hidrofóbico e *turn* (Figura 8). O NTKD pertence à família de quinases AGC (proteína quinase A, G e C) e é responsável pela fosforilação dos substratos, enquanto o CTKD faz parte da família proteína quinase dependente de Calcio/calmodulina (CaMK) e está relacionado à autofosforilação de RSK, necessária à ativação de NTKD (BJORBAEK et al. 1995; FISHER e BLENIS 1996). RSKs possuem, também, o domínio do tipo D, de interação molecular com ERK1/2, necessário à ligação da molécula e ativação de RSK (SMITH et al. 1999; ROUX et al. 2003). Uma outra autofosforilação de RSK, próxima ao domínio de interação molecular com ERK1/2, promove a dissociação da última (ROUX et al. 2003).

O mecanismo de ativação das RSKs via Ras/ERK é ligeiramente diferente dependendo da isoforma em questão. As RSK1 - 3, localizadas no citoplasma de

células quiescentes em um complexo com ERK1/2, são recrutadas até a membrana plasmática e sofrem subsequente translocação até o núcleo para fosforilar substratos nucleares, após estímulo de fatores de crescimento (RICHARDS et al. 2001). Já RSK4, diferentemente das outras isoformas, possui atividade quinase constitutiva e está localizada predominantemente no citoplasma, não se acumulando no núcleo após estímulo da via que ativa as RSKs. A habilidade das RSK1 - 3 se localizarem no núcleo não é bem compreendida, porém estudos sugerem a presença de uma presumível sequência consenso de sinal de localização nuclear na região C-terminal (EISINGER-MATHASON et al. 2008). Todas as isoformas possuem quatro sítios de fosforilação essenciais a suas atividades (a saber, Ser221, Ser363, Ser380 e Thr573, referente à RSK1 humana) e que são sensíveis ao estímulo com fatores de crescimento (DALBY et al. 1998). A fosforilação desses resíduos leva à ativação completa das RSKs.

A ativação das RSKs (Figura 9) tem início com a fosforilação, promovida por ERK1/2, no resíduo Thr573, localizado no *loop* de ativação do CTKD de RSK. Essa fosforilação inicial proporciona a ativação da quinase e sua subsequente auto-fosforilação no resíduo Ser380, localizado no motivo hidrofóbico inter-domínios. Acredita-se que ERK1/2 também fosforile Ser363, no motivo *turn*, também localizado na região inter-domínios de RSK. A fosforilação de Ser380 pelo CTKD serve como sítio de interação molecular com PDK1, quinase constitutivamente ativada que regula diversas quinases AGC, que se liga e fosforila RSK2 em Ser221, no loop de ativação de NTKD, levando à ativação completa da proteína (FRODIN 2000). Além de ser responsável pela fosforilação dos substratos de RSKs, NTKD também fosforila Ser749 no domínio D de RSKs, que leva à liberação de ERK1/2. De forma relevante, PDK1 não é necessário à ativação de RSK4 para que essa isoforma mantenha sua atividade basal (DÜMMLER et al. 2005).

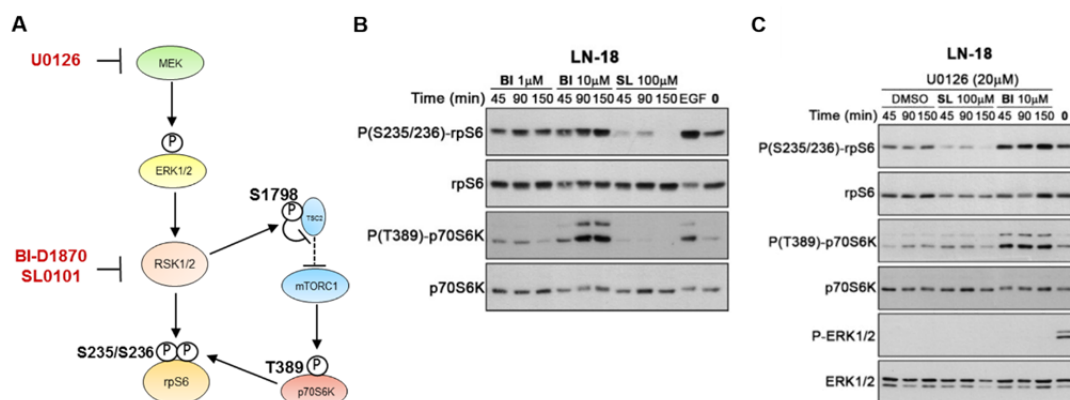


Fonte: Adaptado de ANJUM e BLENIS (2008).

Figura 9 - Ativação das RSKs. A ativação de RSKs depende de uma sequência de fosforilações e auto-fosforilações que resultam na ativação do domínio N-terminal (NTKD). (A - D). A quinase ERK se liga ao domínio D de RSK, fosforila Thr573 e ativa o domínio C-terminal (CTKD). Uma vez ativado, CTKD auto-fosforila RSK em Ser 380, no motivo hidrofóbico, processo necessário para ancoragem de PDK1 em RSK. Uma vez ancorado e ativo, PDK1 fosforila Ser221, ativando o NTKD, responsável pela fosforilação dos substratos dessa proteína.

Diversos inibidores químicos de RSKs, direcionados aos NTKD e CTKD já foram descritos. Esses inibidores incluem SL0101, BI-D1780, que atuam como inibidores competitivos no sítio de ligação de ATP em NTKD, e FMK, que se liga irreversivelmente a um resíduo de cisteína no sítio de ligação de ATP do CTKD de RSK1, RSK2 e RSK4. Tanto SL0101 como BI-D1780 tem efeitos ambíguos reportados na literatura. Por exemplo, SL0101 e análogos podem inibir o crescimento de células de câncer de mama e, por outro lado, promover comportamento invasivo em câncer de pulmão de não pequenas células (SMITH et al. 2007; LUDWIK et al. 2016). Como demonstrado por ROFFÉ et al. (2015), tanto SL0101 como BI-D1780,

apresentam efeitos opostos e inespecíficos sobre a via de mTOR (Figura 10). A definição do papel e dos alvos específicos de cada isoforma é desafiadora, visto que a maioria das abordagens utiliza de inibidores farmacológicos, que além de não serem seletivos para uma única isoforma, apresentam efeitos *off-target* que não podem ser negligenciados. Dessa forma, acreditamos que uma abordagem adequada para a avaliação dos efeitos das isoformas de RSKs seja por meio de geração de células nocaute para as diferentes isoformas, como a adotada neste estudo.



Fonte: adaptado de ROFFÉ et al. (2015).

Figura 10 - Os inibidores das RSK, BI-B1870 (BI) e SL0101 (SL), apresentam efeitos inespecíficos e opostos sobre a via de mTORC1 em LN-18. (A) Esquema ilustrando interação entre as vias de RSKs e mTORC1 e alvos *downstream*. (B) O inibidor BI aumentou a ativação de S6K (p70S6K), enquanto SL inibiu fortemente a fosforilação de rpS6 e p70S6K. (C) Mesmo quando MEK/ERK é inibido por U0126, inibindo, consequentemente, RSK, BI aumentou a ativação de p70S6K, enquanto SL inibiu fortemente a fosforilação de rpS6 e p70S6K. Esses achados confirmam que os inibidores não atuam especificamente sobre RSK.

Semelhantemente à ERK, RSK pode fosforilar reguladores transcricionais e diversos alvos citoplasmáticos, dentre eles substratos que regulam a síntese de proteínas. As RSKs podem regular diversas funções celulares relacionadas à tumorigênese como, por exemplo, proliferação, crescimento celular, sobrevivência e migração (ROMEO et al. 2012). As RSKs também regulam a expressão gênica por meio da fosforilação direta de fatores de transcrição (CHEN et al. 1993; WU e JANKNECHT 2002) e de proteínas reguladoras da tradução, diretamente ou através da ativação da via de mTORC1 (ROUX e TOPISIROVIC 2018).

RSKs podem controlar a proliferação celular de maneira indireta (por meio da modulação de fatores de transcrição) ou direta. RSKs regulam diversos fatores de transcrição envolvidos com controle do ciclo celular e proliferação, incluindo CREB, SRF (serum response factor), ER- α (estrogen receptor alfa), NF-kappaB (nuclear fator kappa-B), ETV1 (ETS translocation variant 1), c-JUN (DOEHN et al. 2009), entre outros. Além disso, RSKs regulam MAD1, um possível supressor tumoral membro da família MYC/MAD/MAX. A fosforilação de MAD1 por RSK1 e p70S6K1 promove sua degradação pelo proteossoma, promovendo proliferação celular dependente de MYC. Já a via direta de controle da proliferação por RSKs ainda não foi bem elucidada, mas estudos com a linhagem MCF-7 e inibidor SL0101 mostraram que houve parada do ciclo celular na fase G1, por meio de inibição da expressão de Ciclina D1 (SMITH et al. 2005).

Em adição ao envolvimento na proliferação celular, a fosforilação de CREB por RSK1 e RSK2 promove sobrevivência de neurônios, por aumentar a transcrição de genes pró-sobrevivência, como membros da família *B-cell lymphoma protein-2* (BCL2: *BCL2*, *BCL-XL* e *MCL1*). Além disso, RSKs modulam diretamente a atividade dos membros da família de BCL2. Ambos RSK1 e RSK2 fosforilam a proteína proapoptótica BAD, aumentando sua capacidade de se ligar e ser inativada por 14-3-3, o que promove sobrevivência celular pois sequestram BAD no citosol, longe das mitocôndrias e membros pró-sobrevivência da família BCL2 (BONNI et al. 1999).

RSKs possuem um papel notável na regulação da tradução de mRNAs. A via direta de regulação da tradução por RSK envolve sua ativação pela via de Ras/ERK e fosforilação de importantes proteínas reguladoras da tradução, como, por exemplo, rpS6, eIF4B, PDCD4 e eEF2K. É importante mencionar que esses substratos podem ser fosforilados nos mesmos resíduos pelas S6Ks, que são alvo direto de mTORC1. A proteína rpS6, uma das 33 proteínas que compreendem a subunidade ribossomal 40S é fosforilada pelas RSKs em dois resíduos adjacentes de serina (a saber, Ser235 e Ser236). As RSKs também são capazes de fosforilar o fator de início da tradução eIF4B em Ser422. A proteína eEF2K, reguladora negativa da elongação da tradução, é fosforilada em Ser366 e assim inativada (WANG et al. 2001).

Além da via direta, a ativação da tradução por RSK pode ocorrer via regulação de mTORC1. Foi proposto que essa regulação ocorreria através da fosforilação da proteína Raptor, que estimula a atividade de mTORC1 (CARRIÈRE et al. 2008) e da fosforilação e inativação do inibidor de mTORC1, TSC2 (tuberina) no resíduo Ser1798 (ROUX et al. 2004). É importante salientar que o alvo da fosforilação de ERK em TSC2 é outro, por isso não são relevantes suas implicações neste estudo. Uma vez ativado, o complexo mTORC1 é capaz de fosforilar as 4E-BPs e S6K, como descrito anteriormente. No entanto, dados do nosso grupo sugerem que a fosforilação de TSC2 pelas RSKs na Ser1798 não parece se corresponder com o estado de ativação de mTORC1 (ROFFÉ et al, 2015), sendo necessária uma reavaliação do mecanismo pelo qual as RSKs modulam a tradução. Além disso, RSKs em parceria com ERK1/2 colaboram com a regulação da biogênese ribossomal, promovendo a fosforilação de TIF1A em Ser633 e Ser649, apesar de esses sítios não estarem dentro das sequências consenso de fosforilação de RSK (ZHAO et al. 2003).

A expressão dos mRNAs das RSK1 - 3 foi observada em todos os tecidos humanos, assim como na região cerebral, com variação em níveis das isoformas, dependendo do tecido, o que sugere a existência de funções isoforma-específicas (ZENIOU 2002; WU et al. 2009). Em relação ao mRNA de RSK4, sua expressão, em níveis muito inferiores às outras isoformas, foi observada em cérebro, coração, cerebelo, rim e músculo esquelético e não foi detectada expressão em pulmão, fígado, pâncreas e tecido adiposo (DÜMMLER et al. 2005).

Em câncer, a expressão e/ou ativação de RSK1 e RSK2 encontra-se aumentada em diversos tipos tumorais, incluindo mama (CUESTA e HOLZ 2016), carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (KANG et al. 2010), próstata (CLARK et al. 2005), leucemia (ELF et al. 2011), pulmão (ABDULRAHMAN et al. 2016), melanoma (GALAN et al. 2014; ROMEO et al. 2013) e mieloma múltiplo (KANG et al. 2007). Por outro lado, níveis de expressão reduzidos das isoformas RSK3 e/ou RSK4 foram observados em diversos tipos tumorais, como câncer de ovário (BIGNONE et al. 2007), colorretal (CAI et al. 2014), leucemia mieloide aguda (RAFIEE et al. 2016) e mama (LI et al. 2014; THAKUR et al. 2008). Contudo, pouco se sabe sobre o papel das RSKs em GBMs. Estudos *in vitro*

reportaram uma possível função de RSK2 na regulação de adesão celular, motilidade e invasão (SHI et al. 2018; SULZMAIER et al. 2016). Contudo, grande parte dos achados basearam-se no uso do inibidor BI-D1870. Além disso, os estudos não levaram em consideração o papel de outras isoformas de RSK, o que leva ao questionamento sobre o real papel da isoforma nos processos descritos. Além disso, no estudo do TCGA foi reportado que o subtipo mesenquimal de GBM apresenta um aumento na fosforilação de RSK1, em relação ao grupo proneural (BRENNAN et al. 2013).

Interessantemente, a partir da análise de amostras de gliomas de diversos graus, nosso grupo observou que os níveis proteicos de RSK1 estão aumentados em um subconjunto de pacientes com GBM, enquanto que os níveis de RSK2 se mantiveram constantes dentre GBMs e amostras de gliomas de menores graus (dados não publicados). A análise da sobrevida desses pacientes mostrou que dentre os pacientes com maiores níveis de RSK1, nenhum apresentava sobrevida longa, indicando que RSK1 estaria relacionada a um pior prognóstico. De maneira interessante, isso não foi observado para a isoforma RSK2.

No caso de linhagens comerciais de GBM, estudos do nosso grupo indicam que a expressão das isoformas RSK3 e RSK4 é baixa ou indetectável nas linhagens analisadas (Figura 11). Além disso, níveis da isoforma RSK1 são variáveis nessas linhagens, sendo os níveis de RSK2 mais uniformes dentre as mesmas (Figura 12). Esses dados embasam a hipótese de que as RSKs poderiam ter funções importantes em subgrupos de GBMs.

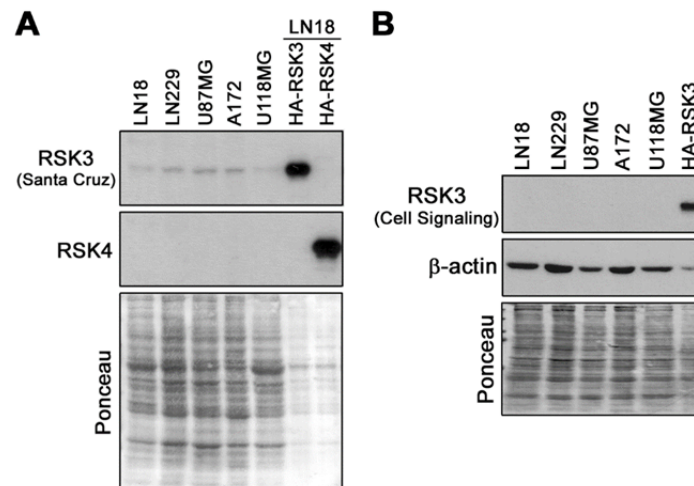


Figura 11 - Níveis das isoformas RSK3 e RSK4 em linhagens de GBMs. Extratos das células de GBM indicadas foram usados para western blot para detectar as isoformas RSK3 e RSK4. Como controle positivo, foram utilizados extratos de células LN-18 que foram transfectadas para expressar HA-RSK3 e HA-RSK4, numa quantidade de extrato três vezes menor em relação às outras linhagens. (A) Foram utilizados os anticorpos da Santa Cruz sc-1431, para RSK3 e sc-100424, para RSK4. Os western blots foram superexpostos para tentar detectar a presença de alguma banda. No caso do anticorpo de Santa Cruz para RSK3, após a alta exposição, bandas fracas apareceram. (B) Para confirmar a especificidade do anticorpo, visto que as bandas observadas em (A) podem ser produto de uma reação não específica revelada com uma alta exposição, usamos o anticorpo #9343 da Cell Signaling anti-RSK3. Não detectou-se RSK3 nessas condições. **Dados do grupo.**

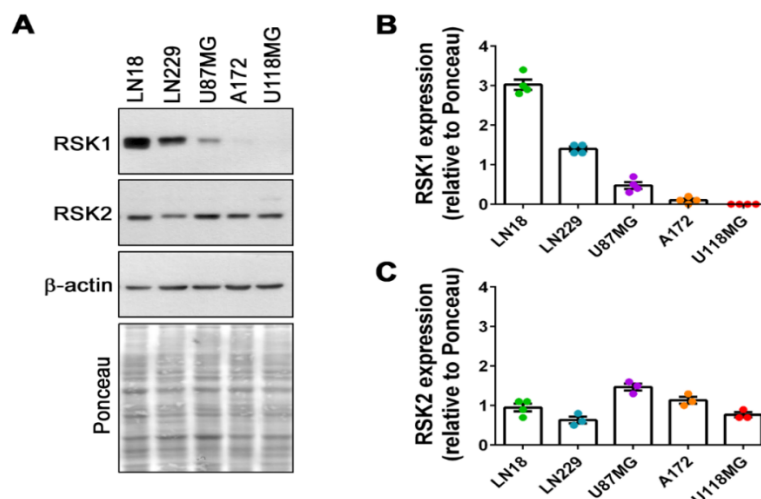


Figura 12 - Níveis das isoformas RSK1 e RSK2 em linhagens de GBMs. (A) Extratos das células de GBM indicadas foram usados para western blot para detectar as isoformas RSK1 e RSK2. Quantificação da expressão de (B) RSK1 e (C) RSK2 entre as diferentes linhagens. No gráfico está representada a média \pm SEM de ao menos 3 experimentos para cada linhagem celular. **Dados do grupo.**

De forma interessante, estudos empregando um *screening* por meio da técnica de CRISPR/Cas9 mostraram que nenhuma das isoformas de RSK, especificamente, seria essencial para crescimento e proliferação celular em câncer (HART et al. 2015; WANG et al. 2015). O estudo foi realizado por meio da construção de uma biblioteca de nocautes, incluindo 176.500 sequências de RNA guia, que se direcionam a 17.661 genes codificantes de proteínas em cinco linhagens celulares (ver seção 3.2, na qual está descrita a técnica de CRISPR/Cas9 para geração de nocautes gênicos). O fato desse estudo não ter encontrado uma relação entre a ausência das RSKs com a redução dos parâmetros de redução da proliferação analisados pode ser explicado pelas funções sobrepostas das isoformas (LARA et al. 2013). Em contrapartida, trabalhos recentes evidenciam que algumas isoformas possuem funções biológicas diferentes. No caso de desenvolvimento de neoplasias, isso ocorre, por exemplo, no envolvimento das isoformas RSK1 e RSK2 com crescimento, sobrevivência e proliferação de células tumorais e no das isoformas RSK3 e RSK4 com possível papel de supressores tumorais (ROMEIO e ROUX 2011). O Quadro 2 compila os estudos que relacionam RSKs a funções relacionadas a tumorigênese, realizados até o momento da escrita desse trabalho. Nela, é possível observar a relevância deste

estudo, já que nenhum estudo que investigue o controle da síntese de proteínas via RSKs em GBMs foi realizado até o momento.

Quadro 2 - Funções das RSKs em câncer

Tipo tumoral	Isoforma(s)	Função estudada/Abordagem	Modelo	Referência
Mama	RSK1 e RSK2	<ul style="list-style-type: none"> • Proliferação • Migração • Inibidor BI-D1870 • shRNA 	Linhas comerciais: MCF7; MDA-MB-231; BT474; MDA-MD-468; MDA-MB-436; MDA-MB-231 e SUM159PT.	(Cuesta & Holz, 2016)
	RSK4	<ul style="list-style-type: none"> • Migração • Invasão • RT-PCR 	Linhas comerciais: MDA-MB-231; 8 pacientes: amostras pareadas (tecido normal/adjacente).	(Jiang et al., 2017)
	RSK4	<ul style="list-style-type: none"> • Relação entre RSK4 com características clínico-patológicas e <i>status</i> da metilação do promotor de RSK4 • RT-PCR • Sequenciamento 	49 pacientes: amostras pareadas (tecido normal/adjacente).	(Li et al., 2014)
	RSK4	<ul style="list-style-type: none"> • Proliferação • Invasão/Migração • Superexpressão RSK4 • siRNA 	Linhas comerciais: MDA-MB-231; T47D; <i>In vivo</i> : rato SCID.	(Thakur et al., 2008)
Colorretal	RSK4	<ul style="list-style-type: none"> • Relação entre RSK4 com características clínico-patológicas • Imunohistoquímica 	Biópsias de 103 pacientes e 46 tecidos adjacentes pareados.	(Cai et al., 2014)
Carcinoma renal e de cólon; Adenoma de cólon	RSK4	<ul style="list-style-type: none"> • Determinação dos níveis de expressão de RSK4 • Senescência/Ciclo celular • RT-PCR • Blot 	30 carcinomas de cólon; 20 carcinomas renais; 7 adenomas de cólon; Linhas comerciais: HCT116 (carcinoma de cólon).	(López-Vicente et al., 2009)
Ovário	RSK3	<ul style="list-style-type: none"> • Proliferação • Ciclo celular • Formação de colônia • RT-PCR • siRNA • Blot 	DNA dos tumores e sangue periférico de 30 pacientes; Linhas comerciais: UCI101, 41M, OAW28	(Bignone et al., 2007)
Leucemia Mielóide Aguda (AML)	RSK4	<ul style="list-style-type: none"> • Determinação dos níveis de expressão de RSK4 • Real time qPCR 	40 pacientes AML e 10 não-AML (grupo controle).	(Rafiee et al., 2016)
Cabeça e pescoço	RSK2	<ul style="list-style-type: none"> • Proliferação • Invasão • Metástase • Imunohistoquímica • Inibidores fmk e BI-D1870 • shRNA 	Linhas: Tu686, 686LN, Tu212 and 212LN, 4A, 4B, 37A, 37B, M4e. Células de pacientes; <i>Xenografts</i> .	(Kang et al., 2010)

Cont/Quadro 2

Tipo tumoral	Isoforma(s)	Função estudada/Abordagem	Modelo	Referência
Próstata	RSK1 e RSK2	<ul style="list-style-type: none"> Determinação dos níveis de RSK1 e RSK2 nos tecidos Proliferação Migração Deteção PSA Blot tecidos Inibidor 3Ac-SL0101 Mutante de RSK2 constitutivamente ativado (Y707A) 	Tecidos malignos de 13 pacientes; 4 tecidos benignos; 7 tecidos saudáveis; Linhagens comerciais: LNCaP, PC-3.	(Clark et al., 2005)
Leucemia Mielóide Aguda (AML)	RSK2	<ul style="list-style-type: none"> Proliferação Apoptose Inibidor fmk 	Linhagens comerciais: Ba/F3, EOL-1, HEL, KARPAS, K562, Molm14, Mv(4;11), Mo91, OPM1, ANBL6; Rato Balb/C RSK2 KO; Células primárias de 6 pacientes.	(Elf et al., 2011)
Pulmão	RSK1	<ul style="list-style-type: none"> Migração siRNA 	Linhagens comerciais: A549, NME35 e H23.	(Lara et al., 2011)
	RSK1 – 4	<ul style="list-style-type: none"> Proliferação Migração Inibidor BI-D1870 	Linhagem comercial A549	(Abdulrahman et al., 2016)
Melanoma	RSK1 – 4	<ul style="list-style-type: none"> Migração Superexpressão RSK1 Inibidor SL0101 Blot 	Linhagens WM35 e WM239	(Larrea et al., 2009)
	RSK1 e RSK2	<ul style="list-style-type: none"> Regulação de PDCD4 Inibidores BI-D1870 e SL0101 RNAi Fosfoproteômica 	Linhagem comercial A375	(Galan et al., 2014)
	RSK1 e RSK2	<ul style="list-style-type: none"> Síntese global de proteínas Estudo do translatoma – microarranjo Inibidores BI-D1870 e SL0101 si e shRNA para RSK1 e RSK2 	Linhagens comerciais: WM852, WM1361, Colo829 e A375	(Romeo et al., 2013)
Próstata, mesotelioma	RSK2	<ul style="list-style-type: none"> Migração shRNA para RSK2 Inibidores fmk e SL0101 	Linhagens comerciais: CHOK1 (ovário de hamster), DU-145 (cancer de próstata humano) e MILL (mesotelioma humano)	(Gawecka et al., 2012)
Mieloma Múltiplo	RSK2	<ul style="list-style-type: none"> Apoptose siRNA Inibidor fmk 	Linhagens comerciais: Ba/F3 (murina) 293T; células de pacientes t(4;14)-positivo.	(Kang et al., 2007)

Cont/Quadro 2

Tipo tumoral	Isoforma(s)	Função estudada/Abordagem	Modelo	Referência
GBM	RSK2	<ul style="list-style-type: none"> Migração Invasão Inibidor BI-D1870 shRNA para RSK1, RSK2, RSK3 e RSK4 	Linhagens comerciais: U-87 MG, U-373 MG; Células primárias de 7 pacientes; Análise de bancos de dados públicos	(Sulzmaier et al., 2016)
	RSK2	<ul style="list-style-type: none"> Migração Inibidor BI-D1870 	Linhagem comercial U-87 MG	(Shi, Yang, Jin, Matter, & Ramos, 2018)
	RSK2	<ul style="list-style-type: none"> Regulação da sinalização via RTKs via interação entre RSK2 e miR-218 Blot 	Linhagens comerciais: U-87MG, U-373, LN-18 e T98G; Células U87-MG DK e EGFRvIII; Tecidos de 30 pacientes	(Mathew et al., 2015)

Na área de câncer, a análise do transloma está sendo utilizada cada vez mais para determinar o perfil de mRNAs traduzidos em vários tipos de tumores. Diversos trabalhos de translômica mostram que certas alterações de expressão gênica eram observadas principalmente no nível da tradução e que os dados de mRNAs associados a polissomos estavam melhor correlacionados com os níveis de proteína, em comparação com a análise padrão do transcriptoma (JECHLINGER et al. 2003; LARSSON et al. 2007). De maneira relevante do ponto de vista clínico e biológico, estudos do nosso grupo mostram que a partir da análise do transloma de GBMs, seria possível separar pacientes em grupos distintos que apresentam diferenças em termos de sobrevividas (dados não publicados). Além disso, a análise do transloma desses pacientes, permite descrever mais acuradamente, do ponto de vista molecular, as vias que estão alteradas nesses GBMs. Em relação às RSKs, foi publicado somente um estudo de translômica em células de melanoma (ROMEO et al. 2013). Contudo, nesse estudo foi utilizado o inibidor de RSK BI-D1870, o qual foi demonstrado por nosso grupo (ROFFÉ et al. 2015) de ter um efeito inespecífico ativador de mTORC1, o que invalidaria as conclusões obtidas.

Visto que a via Ras/ERK é ativada aberrantemente em vários tipos tumorais e contribui com um prognóstico ruim e resistência à quimioterapia (MCCUBREY et al. 2007; ABRAMS et al. 2010), a definição de alvos regulados pelas RSKs, por meio da definição do impacto funcional das isoformas no controle da tradução em GBM, pode ser utilizado como base para levar ao desenvolvimento de terapias direcionadas mais efetivas e com menores índices de resistência.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desvendar o papel da família da RSK, com foco nas isoformas RSK1 e RSK2, no controle da síntese de proteínas em GBM.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Gerar células LN-18 nocaute para as isoformas de RSK, RSK1 e RSK2, através do sistema CRISPR/Cas9.
2. Analisar os mecanismos de controle traducional regulados pelas RSKs nas células LN-18 nocaute para RSKs gerados através do sistema de CRISPR/Cas9, com foco no *crossstalk* entre as vias de Ras/ERK/RSK e PI3K/AKT/mTORC1.
3. Obter o perfil polissomal dos clones de células LN-18 nocaute para RSKs gerados através do sistema de CRISPR/Cas9.
4. Descrever os mecanismos de controle traducional regulados pelas RSKs nas células LN-18 nocaute para RSKs, que são dependentes e independentes de mTORC1.
5. Identificar mRNAs regulados especificamente pelas RSKs nas células LN-18 nocaute para RSKs, por meio da análise do translátoma através da obtenção de microarranjos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CULTURA CELULAR

A linhagem celular de Glioblastoma obtida do biobanco da American Type Collection (ATCC) utilizada nos estudos foi a LN-18 (homem, 65 anos; ATCC CRL-2610). As células foram mantidas em meio DMEM High Glucose (Thermo Fisher Scientific) acrescido de 10% soro fetal bovino (SFB - Thermo Fisher Scientific), 1% piruvato de sódio (Thermo Fisher Scientific) e 40 µg/mL Garamicina (Hipolabor Farmacêutica), em estufa úmida, a 37°C e 5% de CO₂. Para realização dos ensaios de western blot, foram plaqueadas 1,5 x10⁵ ou 2,0 x10⁵ células em placas de 35 ou 60 mm (Corning), respectivamente. Para realização dos ensaios de perfil polissomal, foram plaqueadas 2,5 x10⁶ células em placas de 150 mm (Corning). Para estudos sobre a ativação da tradução via RSKs, as células foram mantidas em meio de cultura depletado de soro fetal bovino (carenciadas) durante 48 horas e foram, então, tratadas com 100 ng/mL PMA (LC Laboratories), que ativa a via Ras/ERK ou com 10% SFB (Thermo Fisher Scientific). PMA é uma molécula que ativa diretamente a enzima proteína quinase C (PKC), ligando-se em seu domínio C1 que, normalmente, necessita de diacilglicerol para a ativação (CASTAGNA et al. 1982). A ativação de PKC leva à ativação de Raf, por meio da proteína de membrana Ras, desencadeando na transdução de sinal via MAPK, que leva à ativação das proteínas quinases ERK1/2 e resulta na fosforilação de múltiplos substratos nucleares e citoplasmáticos (MARQUARDT et al. 1994). Por outro lado, o soro contém diversos fatores de crescimento e citocinas, que são capazes de estimular diversas vias, incluindo as vias Ras/ERK e PI3K/AKT.

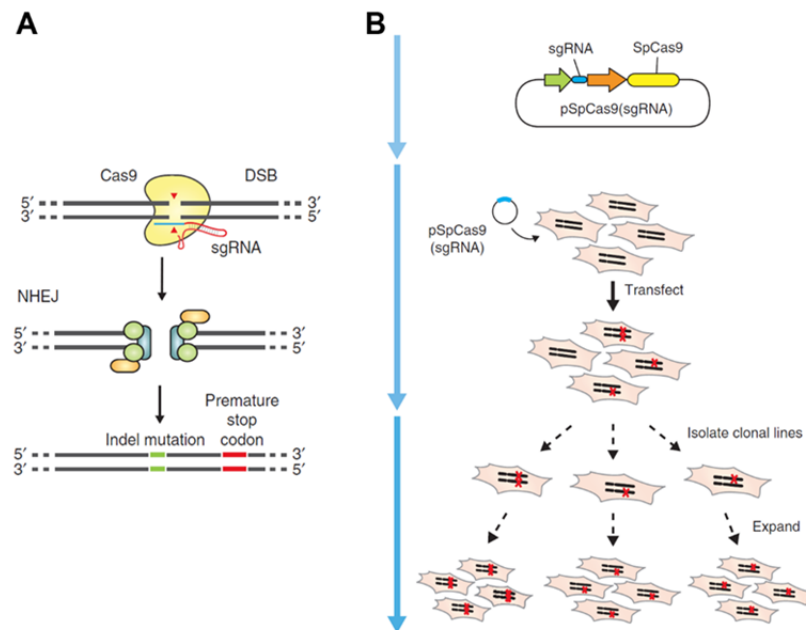
3.1.1 Tratamento das células com inibidores de mTORC1

Com a finalidade de estudar a interação entre as vias das RSKs e de mTORC1, utilizamos os inibidores de mTORC1, rapamicina (Sigma Aldrich) ou Torin1 (Cell Signaling). É importante mencionar que Torin1 é um inibidor do sítio ativo de mTOR e dessa maneira inibe também mTORC2. Para isso, as células foram

carenciadas de SFB e tratadas com 100 nM de rapamicina por 30 minutos em estufa úmida, a 37°C, enquanto as células controle foram tratadas com o veículo DMSO (Sigma Aldrich) sob as mesmas condições. No caso do tratamento com Torin1, as células foram cultivadas como descrito anteriormente e tratadas com 250 nM de Torin1 por 30 minutos em estufa úmida, a 37°C, enquanto as células controle foram tratadas com o veículo DMSO (Sigma Aldrich) sob as mesmas condições. A seguir, a via Ras/ERK/RSK foi estimulada por tratamento com 100 ng/mL PMA ou 10% SFB por 15 minutos em estufa úmida, a 37°C e procedeu-se o preparo dos extratos para análise das proteínas por Western Blotting. Para os experimentos de perfil polissomal, as células foram tratadas com 100 nM rapamicina ou 250 nM de Torin1, conforme descrito acima e estimuladas durante 6 horas com 10% SFB.

3.2 GERAÇÃO DE CÉLULAS LN-18 NOCAUTE ATRAVÉS DO SISTEMA CRISPR/CAS9

A técnica de nocautear genes a partir do sistema CRISPR/Cas9 baseia-se na utilização da endonuclease Cas9, guiada por pequenos RNAs guias (sgRNAs) por meio do pareamento de bases de Watson-Crick (RAN et al. 2013). A edição ocorre em resposta à quebra da dupla fita (DSBs) do DNA em um *locus* genômico alvo através de Cas9 (Figura 13A). Após a clivagem, o *locus* alvo deve ser reparado por uma das duas vias existentes de reparo de DSBs, a saber, junção de pontas não homólogas (NHEJ) ou recombinação homóloga (HR). Na ausência de uma fita molde, DSBs são religadas por meio do processo NHEJ, que é caracterizado por gerar mutações sob as formas de inserção/deleção (indel). Dessa forma, NHEJ pode mediar nocautes, já que as mutações indel que ocorrem em um exon codificador podem levar a mutações de troca de fase de leitura e a códon de parada prematuros.



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

Figura 13 - Esquema do sistema CRISPR/Cas9 para editar o genoma. **(A)** A quebra da dupla fita de DNA é induzida pela nuclease Cas9, direcionada até o sítio gênico de interesse por RNAs guias (sgRNAs). Após a clivagem do DNA, o sistema de reparo via junção de pontas não homólogas (NHEJ) é mobilizado e, eventualmente, levará a inserções ou deleções de bases, que poderão causar mudança no código de leitura ou à geração de códons de parada prematuros, levando à perda de função ou degradação do mRNA. **(B)** O plasmídeo, codificando a Cas9 e sgRNAs, é transfectado nas células, gerando um *pool* de células com diferentes tipos de modificações. Células individuais foram crescidas para formar clones nos quais foram avaliados, neste estudo, os níveis proteicos de RSK1 e RSK2.

Neste trabalho, foi utilizado o plasmídeo contendo a endonuclease Cas9 tipo selvagem de *S. pyogenes* e genes de resistência a puromicina e ampicilina [pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 (Addgene ID: 62988)]. Nele, foram inseridas as sequências que codificam as sgRNAs que guiaram a endonuclease Cas9 ao sítio de interesse no genoma da célula. Com a finalidade de gerar células nocauteadas através do sistema CRISPR/Cas9, as guias utilizadas no estudo foram desenhadas para terem como alvo os primeiros exons dos genes que codificam RSK1 (gene *RPS6KA1*) e RSK2 (gene *RPS6KA3*), sendo essa uma forma de romper com qualquer possível variante resultante de *splicing* que pudesse ser gerada pelo transcrito (é importante ressaltar que em algumas situações é possível também alterar exons em diferentes

partes do gene). Além disso, essa estratégia reduz a chance de que uma proteína truncada, ainda com alguma atividade, seja codificada. O sistema CRISPR/Cas9 derivado de *Streptococcus pyogenes* que necessita de uma sequência PAM (do inglês, *Protospacer Adjacent Motif*) imediatamente posterior à sequência de DNA alvo, caracterizada, nesse sistema, pela sequência 5'-NGG. Dessa forma, os sgRNAs utilizados no estudo foram gerados a partir da ferramenta disponível online em <http://crispr.mit.edu/>. Nele, como entrada, é inserida a sequência de nucleotídeos de DNA da região do genoma que vai ser editada. A ferramenta fornece, então, uma lista de possíveis RNAs guias a partir da sequência de entrada, com valores de especificidade (notas, ou *scores*), que refletem os efeitos *off-target* da guia no genoma humano, sendo esta nota o critério utilizado para escolha das melhores guias (quanto maior *score*, menores as chances de que o sistema CRISPR/Cas9 altere sequências *off-target*). Assim, para cada um dos genes *RPS6KA1* (RSK1) e *RPS6KA3* (RSK2), foram desenhadas duas guias, nomeadas A e B, com as respectivas sequências e scores apresentadas no Quadro 3.

Quadro 3 - Sequências das guias “A” e “B” desenhadas para os genes *RPS6KA1* (RSK1) e *RPS6KA3* (RSK2). As denominações *top* e *bottom* referem-se aos oligos de DNA que são sintetizados para inserir nos plasmídeos correspondentes.

Gene	sg RNA	Região alvo	Sequencia	Score
<i>RPS6KA1</i>	A	Exon 1	5' CAC CGG CAC TAG CTC CAT GAG CGG CC 3' top 5' AAA CGG CCG CTC ATG GAG CTA GTG CC 3' bottom	80
<i>RPS6KA1</i>	B	Exon 3	5' CAC CGG ATC ACG CAC CAC GTC AAG GC 3' top 5' AAA CGC CTT GAC GTG GTG CGT GAT CC 3' bottom	93
<i>RPS6KA3</i>	A	Exon 1	5' CAC CGG AGC CCG TCC GAC AGC GCT G 3' top 5' AAA CCA GCG CTG TCG GAC GGG CTC C 3' bottom	86
<i>RPS6KA3</i>	B	Exon 9	5' CAC CGG CCA GAA GTA GTT AAT CGT CG 3' top 5' AAA CCG ACG ATT AAC TAC TTC TGG CC 3' bottom	97

Os plasmídeos confeccionados foram transfectados nas células LN-18 utilizando-se Lipofectamina 2000® - Invitrogen (5 µl em 3 mL de meio Opti-MEM®) e 4 µg total de DNA por condição. Foram desenhadas as seguintes condições de transfecção (quantidades de DNA, em massa, entre parênteses):

1. Plasmídeo sem resistência (controle de seleção com puromicina);
2. Plasmídeo vazio, ou controle (contendo o vetor sem sgRNA; 4 µg);
3. sgRSK1 A (4 µg);

4. sgRSK2 A (4 μ g);
5. sgRSK1 A (2 μ g) + sgRSK2 A (2 μ g);
6. sgRSK1 B (4 μ g);
7. sgRSK2 B (4 μ g);
8. sgRSK1 B (2 μ g) + sgRSK2 B (2 μ g).

A transfecção foi realizada durante 6h, sendo o meio retirado e trocado por meio normal de cultivo. Decorridas 48h, as células foram tratadas com 1,2 μ L/mL de puromicina (Thermo Fisher Cientific) para seleção das células contendo o plasmídeo. O tempo total de seleção foi de 6 dias, sendo o meio contendo antibiótico trocado a cada 2 dias.

Após a seleção com puromicina, as células foram cultivadas por 24h em meio normal de cultivo e, então, 500 células de cada condição foram plaqueadas em uma placa de 100 mm, que foi deixada em estufa úmida a 37°C até que se formassem colônias derivadas de uma única célula (clone). Após o crescimento das colônias por aproximadamente 10 dias, as colônias individuais foram transferidas para uma placa de 24 micropoços com o auxílio de uma micropipeta. Assim que cada colônia atingiu 80% de confluência, os clones foram expandidos em placas cada vez maiores até que se atingisse quantidade suficiente de material para realização de um extrato proteico, utilizado para detectar os níveis de RSKs por western blot.

3.3 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

As células foram lisadas em tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1% NP40® - Sigma Aldrich; 0,5% deoxicolato de sódio - Sigma Aldrich; Inibidor de fosfatase - Thermo Fisher Scientific; inibidor de protease - Roche), os lisados foram centrifugados a 14.000 rpm por 15 min a 4°C (centrífuga 5427R, Eppendorf) e o sobrenadante foi coletado. A quantificação das proteínas nos extratos foi feita através do método de Bradford, utilizando-se o reagente Protein Assay Dye Reagent Concentrate® (Bio-Rad). Para isso, utilizou-se uma curva-padrão construída com BSA (Sigma Aldrich) e mediu-se as absorbâncias em placa de 96 micropoços a 595 nm em um leitor de placa i-Mark

(Bio-Rad). Após a dosagem, as amostras foram preparadas pela adição de tampão redutor concentrado (4x: 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 5% SDS (Merck); 1 mM EDTA pH 8,5; 5% β -mercaptoetanol (Merck); 20% glicerol; traços de azul de bromofenol).

3.4 WESTERN BLOTTING

A técnica foi utilizada na identificação e avaliação dos níveis de proteínas envolvidas na via RSK, bem como da via mTORC1. A técnica também foi utilizada para avaliar os níveis de fosforilação de proteínas envolvidas no processo de tradução, que em muitos dos casos se relacionam com o estado de ativação e/ou com a função da proteína correspondente.

As amostras preparadas foram aquecidas por 5 minutos a 95°C. A seguir, as amostras foram aplicadas em gel de SDS-PAGE (com porcentagem entre 7% a 13%, dependendo do tamanho das proteínas a serem analisadas) e corridas em tampão de corrida (25 mM Tris-base; 191 mM Glicina (Sigma Aldrich); 0,1% SDS) com voltagem constante, a saber, 65 V durante 25 minutos e 120 V durante 1,5 horas, em fonte PowerPac™ HC High Current Power Supply (Bio-Rad). Após a corrida, foi feita a transferência para membrana de nitrocelulose (Amersham) a 100 V durante 1 hora em tampão de transferência (25 mM Tris-base; 191 mM Glicina; 0,1% SDS; 20% Metanol (Sigma Aldrich)), em fonte PowerPac™ HC High Current Power Supply (Bio-Rad). Procedeu-se, então, com o bloqueio da membrana em solução contendo 5% leite livre de gordura em pó diluído em 0,1% TBS-T (150 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl pH 7,4; 0,1% Tween® (Sigma Aldrich)) por 1 hora. Foi colocado o anticorpo primário de escolha (diluídos em TBS-T contendo 5% BSA, Quadro 4) *overnight*. Após esse período, adicionou-se o referente anticorpo secundário acoplado à peroxidase por 1 hora à temperatura ambiente (anti-mouse ou anti-rabbit, Amersham), diluídos em TBS-T contendo 5% leite em pó livre de gorduras. Por fim, a membrana foi revelada com kit de quimioluminescência (Pierce™ ECL Western Blotting Substrate) em filme fotográfico (Amersham Hyperfilm ECL). As proteínas de interesse foram detectadas utilizando os anticorpos primários contra as proteínas apresentadas no Quadro 4.

Quadro 4 - Anticorpos utilizados para Western Blotting.

Proteína	Marca/ Catálogo	Diluição	α -Secundário
P(Ser380)-RSK1	Cell Signaling/ #9341	1:1000	Rabbit
RSK1	Santa Cruz/ sc-231	1:5000	Rabbit
P(Ser227)-RSK2	Cell Signaling/ #3556	1:1000	Rabbit
RSK2	Novus Biologicals/ NBP1-85552	1:2000	Rabbit
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	1:2000	Rabbit
P(Ser235/236)-rpS6	Cell Signaling/ #4856	1:1000	Rabbit
rpS6	Santa Cruz/ sc-74459	1:5000	Mouse
P(Thr389)-p70S6K1	Cell Signaling/ #9234	1:500	Rabbit
p70S6K1	Cell Signaling/ #2708	1:1000	Rabbit
P(Thr37/46)-4E-BP1	Cell Signaling/ #9459	1:1000	Rabbit
4E-BP1	Cell Signaling/ #9644	1:1000	Rabbit
P(Ser422)-eIF4B	Cell Signaling/ #3591	1:1000	Rabbit
eIF4B	Santa Cruz/ sc-390912	1:1000	Mouse

A quantificação dos níveis proteicos foi feita a partir de análises densiométricas das bandas obtidas utilizando o software Image J®, seguindo o protocolo descrito em (FERREIRA e RASBAND 2012). Os níveis das proteínas fosforiladas foram relativizados pelos níveis das correspondentes proteínas totais.

3.5 ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

Com a finalidade de avaliar a proliferação das células LN-18 nocautes para RSKs, foi utilizado o BrdU Cell Proliferation Kit Assay (Cell Signaling). A técnica baseia-se na captação do análogo da timidina, bromo deoxiuridina (BrdU) durante a replicação do DNA. A detecção de BrdU é realizada a partir de um método colorimétrico, no qual são utilizados anticorpos específicos anti-BrdU e anti-mouse IgG acoplado à enzima Horseradish Peroxidase (HRP), cujo produto com o substrato apresenta coloração. Dessa forma, é possível inferir sobre atividade proliferativa das células, refletida num aumento da magnitude da coloração, conforme aumenta a incorporação da molécula. O experimento seguiu o protocolo sugerido pelo

fabricante. Brevemente, $3,0 \times 10^3$ células foram plaqueadas em placas de 96 poços e carenciadas durante 48 horas. Decorrido este período, as células foram pré-tratadas com 250 nM Torin1 (Cell Signaling) ou com o veículo DMSO (Sigma Aldrich) por 30 minutos, em estufa úmida a 37 °C e, a seguir, incubadas por 16 horas com 10% SFB (Thermo Fisher Scientific), em estufa úmida a 37 °C. As células foram, então, incubadas com BrdU durante 4 horas, para ocorrer incorporação do nucleosídeo, em estufa úmida a 37 °C e seguiu-se o protocolo do kit. A absorbância das amostras foi medida em leitor de microplacas a 450 nm (SpectraMax®, Molecular Devices). Foi realizada a quantificação de no mínimo três experimentos individuais, realizados em duplicatas experimentais.

3.6 PERFIL POLISSOMAL

A obtenção e análise de perfis polissomais tem como objetivo central determinar a parcela de mRNAs que estão sendo ativamente traduzidos nas condições estudadas. Além disso, é possível obter a taxa de tradução a partir da análise do perfil, por meio da razão entre as áreas abaixo dos picos polissomais e do pico 80S. Dessa forma, quanto maior a relação polissomos/80S, maior a taxa de tradução de uma determinada célula, como observado em decorrência de estímulos que ativem a tradução (Figura 14). No caso, tem-se interesse em observar como se altera a tradução geral em células LN-18 selvagens e nocauteadas para as isoformas RSK1 e RSK2, bem como realizar a translátômica das células.

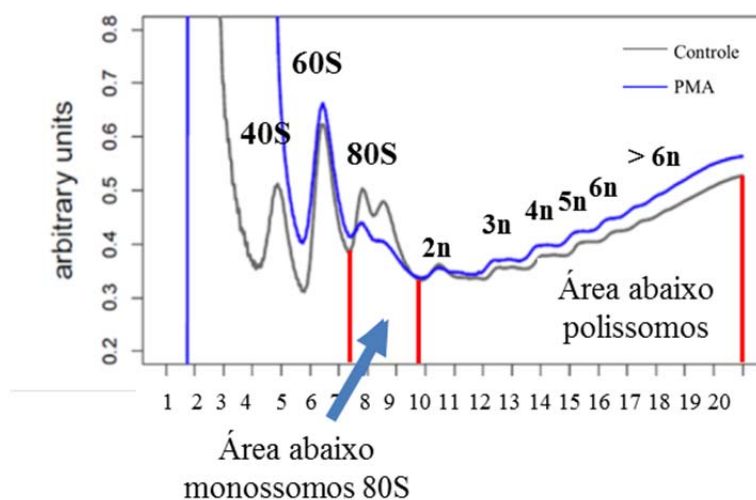
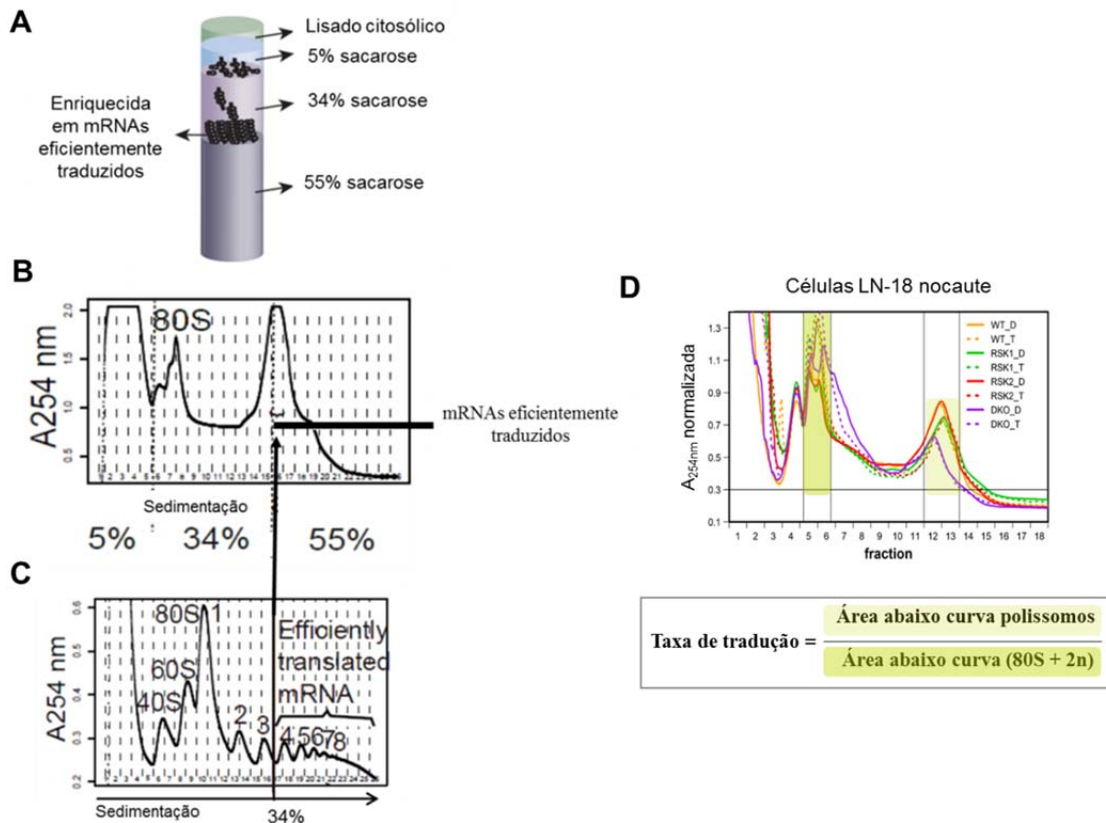


Figura 14 - Perfil polissomal de LN-18 utilizando gradiente linear 5 - 50%. O extrato foi obtido conforme descrito e aplicado em um gradiente linear de sacarose 5% - 50%. Após ultracentrifugação, a leitura do gradiente a 254 nm mostra picos correspondes às subunidades ribossomais 40S, 60S, dos monossomos 80S (apresentada com um pico duplo) e polissomos (picos > 2n). Na figura, observa-se que após estímulo com PMA, a área abaixo da curva correspondente aos polissomos aumenta, na proporção que a área abaixo do monossomos 80S diminui, quando comparado ao perfil de células não tratadas, indicando aumento na taxa de tradução das células.

Nesse sentido, neste trabalho, utilizamos duas técnicas para separação dos polissomos em gradientes de sacarose, de acordo com diferentes objetivos experimentais. A primeira técnica baseia-se na separação em um gradiente de sacarose linear, no qual pode-se resolver num mesmo perfil os picos das subunidades ribossomais 40S e 60S e o pico dos monossomos (80S). No entanto, nesse gradiente, os picos dos polissomos não são totalmente resolvidos e as frações de mRNAs ativamente traduzidos distribuem-se em diversas frações, sendo uma técnica útil, em nosso caso, à descrição das taxas de tradução das células. A outra técnica baseia-se na separação dos polissomos em um gradiente não-linear otimizado, no qual separam-se os mRNAs eficientemente traduzidos (associados com >3 ribossomos) em uma ou duas frações, facilitando sua posterior purificação (Figura 15).



Fonte: adaptado de LIANG et al. (2017).

Figura 15 - Perfil polissomal utilizando gradiente não-linear otimizado. (A) Após obtenção e aplicação do extrato em um gradiente não-linear de sacarose, com camadas 5%, 34% e 55%, conforme descrito, a ultracentrifugação resulta na sedimentação das frações de mRNAs eficientemente traduzidos ($>3n$) concentrada na interfase entre as soluções 34% e 55%. (B) A leitura do gradiente a 254 nm mostra picos correspondentes aos monossomos 80S e aos polissomos. Na figura, mostra-se que as frações de mRNAs eficientemente traduzidos correspondem às frações contidas a partir do centro do pico polissomal, conforme demonstrado em LIANG et al. (2017) e ilustrado na figura por meio da comparação entre posições dos picos em gradiente linear (B e C). Notar que o número de frações de mRNAs eficientemente traduzidos coletadas a partir do gradiente não-linear é bem inferior às correspondentes ao gradiente linear. (D) A taxa de tradução de tradução é calculada através da obtenção da relação entre as áreas abaixo da curva referente aos polissomos e a referente a $(80S + 2n)$.

Para a realização dos experimentos, as células referentes aos clones gerados com a guia “A” (a saber, “sgRSK1 A d”; “sgRSK2 pool a-d”; “sg RSK1/2 A a”, na Figura 17) foram plaqueadas e carenciadas para que a confluência fosse de 60 - 80% ao dia do preparo do extrato. As células foram, inicialmente, tratadas com o antibiótico cicloheximida (CHX - Sigma Aldrich; 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 7 minutos; em estufa

úmida a 37 °C), que inibe a translocação do ribossomo e, desta forma, paralisa os ribossomos nos mRNAs na fase de elongação. A seguir, procedeu-se com a lavagem das células em PBS contendo 100 µg/mL CHX, a remoção das células das placas de cultivo com auxílio de um raspador de células (*cell scraper*) e a centrifugação das mesmas a 4°C por 3 minutos a 500 xg (centrífuga 5427R, Eppendorf). Para lise celular, incubou-se as células no gelo com tampão de lise para polissomos (20 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 10 mM MgCl₂, 1% Triton X-100® - Sigma Aldrich; 1 mM DTT - Sigma Aldrich; 100 µg/ml CHX - Sigma Aldrich; 40 unidades/mL RNasin - Promega; e inibidor de protease livre de EDTA - Thermo Fisher Cientific) durante 10 minutos. Após a lise das células, o material foi centrifugado a 4°C por 10 minutos a 10.000 xg (centrífuga 5427R, Eppendorf) para sedimentação dos núcleos e restos celulares. Parte do sobrenadante foi coletada para posterior análise de RNA total e outra parte foi coletada e depositada cuidadosamente no gradiente de sacarose, preparado de acordo com o interesse do experimento, conforme descrito abaixo.

3.6.1 Perfil polissomal - Gradiente linear

Os gradientes lineares 5 - 50%, foram preparados a partir dos tampões de gradiente de sacarose (20 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 1 mM DTT; em % de sacarose indicadas) e obtidos como descrito a seguir. Ao tubo de ultracentrífuga Open-Top Polyclear (Seton Scientific), foi acoplado um cilindro de gradiente (Biocomp), cujo nível superior serviu como molde para desenhar uma linha (equivalente a aproximadamente 5,5 mL), que guiou as adições dos tampões de sacarose. Primeiramente, com o auxílio de uma seringa, foi adicionada a solução de 5% até a linha marcada e, posteriormente, abaixo da solução de 5%, a solução de 50% foi adicionada até que a interfase das soluções atingisse a linha. A seguir, os tubos foram fechados e colocados em um equipamento que faz gradientes automaticamente por meio de rotações em ângulos pré-definidos (Gradient Master™ Base Unit, Science Services). Após aplicação dos extratos nos gradientes, os mesmos foram centrifugados a 4°C por 2,5 horas a 39.000 rpm em rotor SW41Ti (Beckman Coulter), o que garante que os mRNAs associados a ribossomos estarão separados

daqueles solúveis. A absorvância a 254 nm foi detectada em fluxo continuo (BioLogic LP, Bio-Rad) e as frações foram coletadas.

3.6.2 Perfil Polissomal - Gradiente não linear (“Two-Step”)

Com a finalidade de obter um gradiente de sacarose otimizado para o isolamento de polissomos ativamente traduzidos, utilizamos o protocolo descrito por LIANG et al. (2017). Foram preparados tampões de gradientes com concentrações de sacarose de 5%, 34% e 55%. A seguir, foram preparados os gradientes, conforme descrito. Ao tubo de ultracentrífuga Open-Top Polyclear (Seton Scientific), foi acoplado um cilindro de gradiente (Biocomp), cujo nível superior serviu como molde para desenhar uma linha (equivalente a aproximadamente 5,5 mL), que guiou as adições dos tampões de sacarose. Primeiramente, adicionou-se, com uma pipeta de 1000 μ L, 2 mL da solução de gradiente 5%. A seguir, com o auxílio de uma seringa adicionou-se, abaixo da solução 5%, a solução 34% até que a superfície da solução de 5% atingisse a linha desenhada. Por fim, a solução de 55% foi adicionada com o auxílio de uma seringa até que a interfase das soluções de 55% e 34% atingisse a linha. A seguir, os extratos polissomais foram aplicados no gradiente e centrifugados a 4°C por 2 horas a 35.000 rpm em rotor SW41Ti (Beckman Coulter). A absorvância a 254 nm foi detectada em fluxo continuo (BioLogic LP, Bio-Rad) e as frações foram coletadas. O perfil descrito acima apresenta picos correspondentes às subunidades (60S + 80S) e aos polissomos, conforme mostrado na Figura 15B. As frações que contém RNA polissomal ativamente traduzidos, ou seja, associados a mais de três ribossomos ($n > 3$), correspondem às frações contidas no centro do pico polissomal e respectivas frações mais densas.

3.7 TRANSLATÔMICA

3.7.1 Desenho experimental Translatômica

Apresentamos, na Figura 16, o desenho experimental para a realização da translatômica das células selvagens e nocautes para RSKs. Para os experimentos, as células referentes aos clones gerados com a guia “A” (a saber, “sgRSK1 A d”; “sgRSK2 pool a-d”; “sg RSK1/2 A a”, na Figura 17) foram carenciadas por 48 horas,

pré-tratadas com 250 nM de Torin1 por 30 minutos e estimuladas com SFB por 6 horas. Parte do extrato foi guardado para extração de mRNA total e o restante foi aplicado no gradiente de sacarose otimizado. Após a ultracentrifugação, os perfis polissomais foram gerados e os mRNAs polissomais eficientemente traduzidos foram obtidos. A seguir, mRNAs totais e polissomais referentes a cada condição foram isolados e suas qualidades foram checadas para posterior análise por microarranjos.

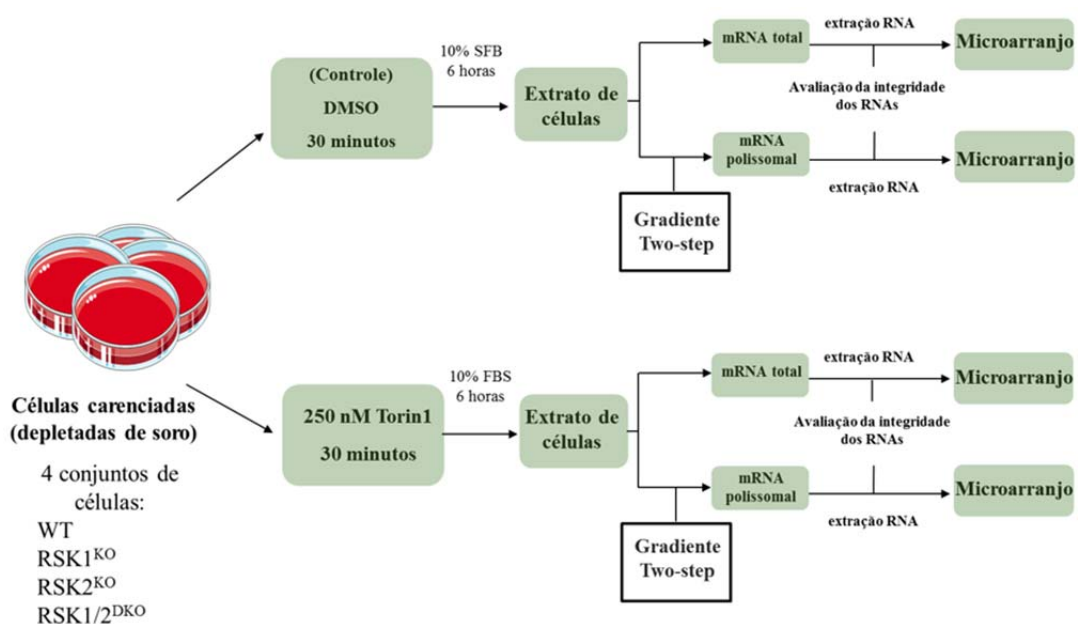


Figura 16 - Desenho experimental para translatoômica. As células WT, RSK1^{KO}, RSK2^{KO} e RSK1/2^{DKO} foram carenciadas de soro por 48 horas e pré-tratadas com 250 nM de Torin1 ou veículo (DMSO) por 30 minutos e estimuladas com 10% SFB durante 6 horas. Foram obtidos extratos de mRNA total e polissomais, os quais foram aplicados em gradiente não linear de sacarose (*Two-step*) para obtenção de mRNAs eficientemente traduzidos. Os mRNAs foram extraídos, suas integridades foram avaliadas e os mRNAs total e polissomal referente a cada condição foram analisados por microarranjos de DNA.

3.7.2 Isolamento de RNA total e polissomal

Os extratos referentes aos RNAs totais e polissomais foram extraídos utilizando o kit comercial Direct-zolTM RNA MiniPrep (Zymo Research). O volume do extrato contendo RNA total foi elevado a 500 uL com nuclease-free water (Sigma) e as frações referentes aos RNAs polissomais ativamente traduzidos (fração contida no centro do pico e uma fração mais densa) foram reunidas em um único

tubo. O procedimento foi realizado conforme protocolo sugerido pela empresa. Para isso, o reagente TRI-Reagent® (Sigma Aldrich) foi adicionado na proporção 3:1 aos tubos contendo RNA total ou polissomal e homogeneizado. A seguir, um volume igual de etanol 100% (Sigma Aldrich) foi adicionado diretamente às amostras e as misturas foram homogeneizadas. As amostras foram, então, adicionadas à coluna Zymo-Spin IIC™ com o tubo coletor e centrifugadas. A coluna foi retirada e transferida para um novo tubo coletor e o filtrado foi descartado. As amostras foram tratadas com DNase e, a seguir, a coluna foi pré-lavada com Direct-zol™RNA e centrifugada, repetindo-se a lavagem. A solução RNA Wash Buffer foi utilizada para lavar a coluna, que foi centrifugada. Por fim, a coluna foi transferida para um tubo RNase-free e 30 µL de nuclease-free water (Sigma) foram adicionados para eluição do RNA. A quantificação do RNA foi realizada no aparelho NanoVue Plus™ (GE Healthcare, 289560-57), de acordo com instruções do equipamento.

3.7.3 Avaliação da integridade de RNA total e polissomal

Com a finalidade de averiguar a integridade dos RNAs totais e polissomais, foram utilizados o kit RNA 6000 Pico Chips (Agilent Technologies) e o equipamento 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies), segundo instruções do fabricante. A técnica baseia-se na corrida eletroforética das amostras em um microchip composto por capilares preenchidos por um gel, no qual os componentes das amostras separam-se por peso molecular e são detectados por meio de fluorescência induzida por laser. O resultado é visualizado na forma de um eletroferograma, gerado e analisado automaticamente pelo aparelho, que detecta, desta forma, fragmentos correspondentes à degradação do RNA presente na amostra. A quantidade dos rRNAs 28S, 18S e 5S pode ser inferida através da análise densiométrica dos picos e as informações são utilizadas no algoritmo que calcula o valor da integridade de cada amostra (ou RIN). O valor de RIN varia de 1 a 10, sendo 1 o valor correspondente a uma amostra de baixa integridade e 10, de altíssima (SCHROEDER et al. 2006). Nos experimentos de translatômica, foram utilizadas amostras que apresentaram alta integridade, ou seja, RIN>8.

3.7.4 Ensaios de Microarranjo de DNA

A plataforma Clariom™ D human microarray (Thermo Fisher Scientific) foi utilizada para analisar a expressão de mRNA total e polissomal de acordo com as instruções do fabricante. Os arquivos CEL foram processados utilizando o *software* Transcriptome Analysis Console (TAC) 4.0.1 (Thermo Fisher Scientific). Os microarranjos foram sumarizados e normalizados a nível de expressão gênica utilizando o algoritmo SST-RMA, fornecido pelo *software* TAC. Todos os experimentos preencheram os critérios de qualidade do fabricante. Expressão normalizada e valores DABG foram recuperados nos arquivos CHP utilizando o pacote “affxparser” e os clusteres de transcritos em que ao menos uma amostra mostrou valores de $DABG \geq 0.05$, foram excluídos. Os dados foram anotados utilizando os dados de anotações de “clariomdhumantranscriptcluster.db”. Somente clusteres de transcritos com um correspondente ID de RefSeq para proteína (NP) foram utilizados e clusteres de transcritos para o mesmo gene foram colapsados utilizando o pacote WGCNA (LANGFELDER e HORVATH 2008).

3.7.5 Análise de Componentes Principais

A Análise de Componentes Principais (PCA) é uma técnica estatística útil na determinação de variáveis relevantes em conjuntos de dados multidimensionais, que podem explicar diferenças nas observações, sendo útil na simplificação da análise e visualização de dados.

3.7.6 Análise do Translatoma

Os dados normalizados de mRNA total e polissomal foram utilizados como entrada para o pacote anota2seq (OERTLIN et al. 2018). Anota2seq permite a identificação de diferenças na eficiência traducional que afetam os níveis proteicos. Neste estudo, avaliamos os efeitos de Torin1 para cada tipo celular particular e realizamos comparações entre os quatro tipos uns contra os outros na presença de DMSO ou Torin1. Corremos o algoritmo utilizando um tipo celular como referência para todas as comparações em cada corrida/análise. O critério de filtro no anota2seqSelSigGenes foi: $\maxSlope = 2$, $\minSlope = -1$, $\delta PT = \log_2(1.2)$ para tradução e $\maxSlope = 1$, $\minSlope = 0$, $\delta TP = \log(1.2)$ para *buffering*; $\delta P =$

$\log(1.5)$, $\text{deltaT} = \log(1.5)$, $\text{maxRvmPAdj} = 0.15$ e $\text{minEff} = \log(1.2)$. Com esses parâmetros, para considerar que um mRNA seja regulado por tradução se fazem necessários: 1) passar um *threshold* de $\log_2(1.2)$ para o efeito traducional e 2) a presença do mRNA nos polissomos passar deve passar um *threshold* de $\log_2(1.5)$ no mesmo sentido que o efeito na tradução. Para mRNAs regulados por *buffering*, a magnitude dos *thresholds* é a mesma, porém nesse caso se considera a mudança no mRNA total.

As informações das replicatas biológicas foram incluídas no modelo para considerar o efeito de *batch*, como recomendado.

3.7.7 Análise GOstats

Para identificar os processos biológicos (BPs) afetados por mudanças nos níveis de mRNAs polissomais dentre as células e/ou tratamentos, o mRNA traduzido de saída do pacote *anota2seq* para cada contraste/comparação foi utilizado como entrada para o pacote GOstats (FALCON e GENTLEMAN 2007). O universo para GOstats foi definido como todos os mRNAs anotados do microarranjo, com um termo GO associado para BP. O algoritmo foi configurado para a opção de “*conditional*” e o valor de corte para *pvalue* foi para 0,001. O resultado foi filtrado para manter termos GO com menos de 500 genes (a fim de reduzir termos GO muito genéricos) e mais de 10 genes (a fim de evitar processos muito específicos) para considerar os processos biológicos mais informativos. Para as figuras, eliminamos termos GO nos quais todos os genes estavam contidos em termos GO com menor *pvalue*.

4 RESULTADOS

4.1 CÉLULAS LN-18 NOCAUTE PARA RSK1 E RSK2

Em humanos, são expressas 4 isoformas da família RSK: RSK1, RSK2, RSK3 e RSK4. Estudos prévios realizados pelo grupo mostraram que nas linhagens de GBM estudadas, LN-18, LN-229, U87MG, A172 e U118MG, a isoforma RSK4 não é detectada (Figuras 11 e 12). Os dados em relação à isoforma RSK3 indicam que a mesma, se é expressa, apresenta níveis proteicos extremamente baixos. Dessa maneira, este estudo das isoformas das RSK se restringiu às isoformas RSK1 e RSK2, simplificando as análises. Com isso, um dos objetivos do estudo visou à obtenção de células nocaute para as isoformas RSK1 e RSK2. Para tal finalidade, foi escolhida a linhagem LN-18, que é a que apresenta maiores níveis de RSK1, quando comparada às outras linhagens de GBM mencionadas.

A etapa de geração de células nocaute nesse trabalho foi realizada em continuidade ao trabalho de mestrado da ex aluna do grupo, Luana Campos Soares (dissertação defendida sob o título de “Estudo Do Papel de RSK na Sinalização Celular em Glioblastoma”, no ano de 2016). Em seu trabalho de dissertação, Soares (2016) implementou a tecnologia de geração de nocautes para RSKs através da tecnologia CRISPR/Cas9, gerando células nocaute para RSK1, RSK2 e nocautes duplos para RSK1 e 2. Contudo, apesar de terem sido utilizados dois sgRNAs (RNAs guia) diferentes, direcionados a cada isoforma, a eficiência da obtenção de nocautes para a proteína RSK1 não foi satisfatória, visto que foi obtido apenas um clone com uma das guias utilizadas. Nesse sentido, esse trabalho complementa o estudo anterior para a geração e disponibilização de outras células nocaute para RSKs, a partir da tecnologia CRISPR/Cas9. Assim, a partir do sistema CRISPR/Cas9 (Figura 13), foram obtidas células LN-18 nocaute para as proteínas RSK1 (RSK1^{KO}), RSK2 (RSK2^{KO}) e nocautes duplos para RSK1 e 2 (RSK1/2^{DKO}, ou DKO) a fim se estabelecer um modelo robusto para o estudo das alterações moleculares associadas às diferentes isoformas, com foco no processo traducional. Além disso, as células transfectadas com o plasmídeo vazio foram obtidas e são referidas como WT. Uma

das principais preocupações quando se emprega a técnica de CRISPR/Cas9, especialmente quando se usa a Cas9 do tipo selvagem, é a possibilidade de efeitos *off-target* (ZHANG et al. 2015). O algoritmo utilizado no desenho das sgRNA ajuda a encontrar as sequências que minimizam a possibilidade de alterar uma sequência *off-target*, no entanto, as possibilidades de que isso aconteça ainda existem. Por isso, no estudo, utilizaram-se dois sgRNAs (guias) diferentes para cada isoforma, com o intuito de que os resultados obtidos com uma pudessem ser confirmados com outra, assumindo que as chances de que duas guias com sequências diferentes resultem nos mesmos efeitos *off-targets* são extremamente baixas. Em geral, observamos diferentes eficiências entre as guias para gerar células nocaute (Quadro 5). Contudo, não foi possível obter células RSK1/2^{DKO} com a guia B, o que limitou nossos estudos na comparação de dois conjuntos completos de células nocaute gerados com guias distintas.

Quadro 5 - Porcentagem de colônias nocaute obtida por guia utilizada.

Isoforma	sgRNA	Colônias Testadas	Colônias Nocaute	Porcentagem (%)
RSK1	A	29	1	3,44
RSK2	A	34	4	11,6
RSK1/2	A	33	2	6,06
RSK1	B	31	2	6,45
RSK2	B	26	1	3,84
RSK1/2	B	27	0	0,00

A Figura 17 apresenta um exemplo dos clones obtidos conforme descrito e testados por western blot, na qual podem ser observados clones nocautes para RSK1 e RSK2 gerados com as duas guias (Figuras 17 A e B) e clones nocaute para ambas RSK1 e RSK2 com uma das guias, a saber, sgRNA A (Figura 17C). Observamos diferentes efeitos do sistema CRISPR/Cas9 para gerar células nocaute para RSKs. Assim, existiram células em que, a princípio, não houve alteração no gene da isoforma correspondente de RSK, apresentando níveis comparáveis com as células selvagens, por exemplo, RSK2^{KO}, clones “sgRSK2 A i” ou “sgRSK2 B b” (Figura 17B). Observamos, também, clones que apresentam níveis reduzidos das RSKs em relação às células selvagens, indicando que possivelmente um alelo foi alterado ou

que um mRNA ou proteína instável foi gerado (por exemplo, em Figura 17A, RSK1^{KO}, clones “sgRSK1 A b”). Além disso, proteínas aberrantes que apresentam, por exemplo, peso molecular menor que a proteína selvagem (produto de uma possível deleção *in-frame* produzida pelo sistema CRISPR/Cas9), podem ter sido originadas, como no caso das duas bandas do clone “sgRSK1 B b” (Figura 17A), cujo padrão de bandas proteicas poderia ser interpretado como sendo resultado de uma mutação *in-frame* em um alelo, sendo que o outro alelo permaneceu sem modificações (selvagem). Dadas essas informações, os clones escolhidos para experimentos posteriores foram aqueles que não apresentaram bandas detectáveis das isoformas de RSK correspondentes, ou seja, clone “sgRSK1 A d” em Figura 17A; clones “sgRSK2 A a,b,c,d” e clone “sgRSK2 B a” em Figura 17B; clones “sgRSK1/2 A b,d” em Figura 17C.

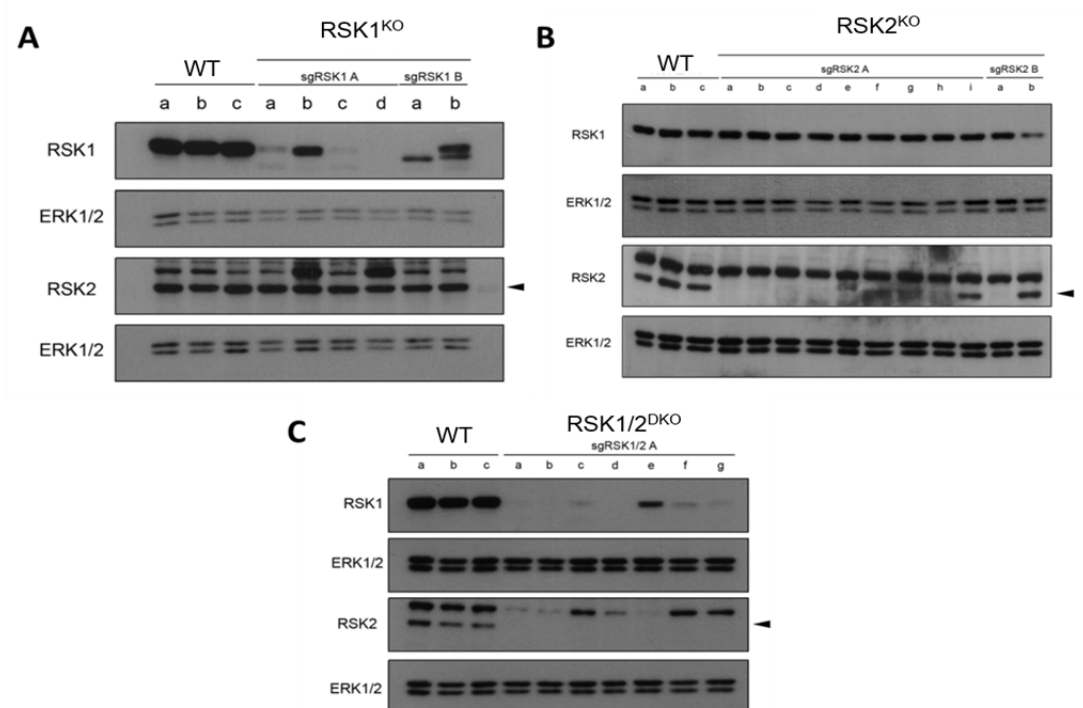


Figura 17 - Clones de células LN-18 nocautes para RSK1 e RSK2 obtidos através do sistema CRISPR/Cas9. Células LN-18 foram transfectadas com plasmídeo contendo o sistema CRISPR/Cas9 junto com os sgRNAs indicados (A ou B) e selecionadas com puomicina. Extratos proteicos dos controles (WT) e clones (A) RSK1^{KO}, (B) RSK2^{KO} e (C) RSK1/2^{DKO}, foram usados para western blot, revelado contra as proteínas RSK1, RSK2 e ERK1/2, utilizada como proteína normalizadora.

4.2 VIAS DE SINALIZAÇÃO NAS CÉLULAS NOCAUTE PARA AS RSK

Uma vez obtidas as células nocaute para as RSK, analisamos os efeitos nas vias de sinalização reguladas pelas mesmas. Especial ênfase foi atribuída à análise dos substratos estudados no paper ROFFÉ et al. (2015) e na dissertação de SOARES (2016) com o intuito de validar as observações obtidas. Além disso, uma vez que buscamos compreender a contribuição do *crosstalk* entre a via das RSKs com a via mTORC1 em direção à tradução, foram feitos estudos nos quais os clones deficientes em RSKs foram tratados com o inibidor de mTORC1, rapamicina, e tiveram a via Ras/ERK/RSKs estimuladas por PMA (Figura 18).

A primeira observação se deu em relação à ativação de ERK nas células nocaute para RSKs. Nota-se que a depleção das RSKs não alterou os níveis de ERK1/2 total e ativada nessas células (Figura 15). Isso é relevante, pois indica que, nessas células, as RSKs não sejam tão relevantes para controlar o mecanismo de *feedback* da cascata das MAPK, sendo este essencialmente regulado por ERK. Nesse caso, ERK pode fosforilar e inibir, por exemplo, SOS, Raf e MEK1, diminuindo, dessa forma, a sinalização da via para compensar a ausência de RSK (DHILLON et al. 2007).

Em relação à detecção da ativação das RSKs nas células nocaute tratadas com PMA, é importante salientar que os anticorpos utilizados para detectar a ativação de RSK1 (no resíduo Ser380) e de RSK2 (no resíduo Ser227) não são específicos para as isoformas em questão. Essa dificuldade se deve ao alto grau de homologia entre as isoformas (Figura 8). Assim, o anticorpo contra a proteína RSK1 fosforilada em Ser 380 também detecta RSK2 fosforilada em um resíduo homólogo, a saber, Ser386. Dessa forma, a presença de bandas no western blot de P(S380)-RSK1 para as células RSK1^{KO} reflete a presença de RSK2 fosforilada nas amostras estimuladas com PMA. De maneira semelhante, o anticorpo contra RSK2 fosforilada em Ser227 detecta o resíduo homólogo Ser221 de RSK1.

4.2.1 Validação do Envolvimento de RSK na Fosforilação de TSC2

Assim como nos estudos de ROFFÉ et al. (2015) e SOARES (2016), a fosforilação de TSC2 no resíduo Ser1798 por RSK também foi avaliada neste estudo. A fosforilação de TSC2 é chave para a ativação de mTORC1 e é um dos elos propostos entre as vias Ras/ERK/RSK e PI3K/AKT/mTORC1, por isso entender a implicação biológica da fosforilação em Ser1798 por RSK tem grande importância. No trabalho de ROFFÉ et al. (2015), foram utilizados siRNAs para as isoformas RSK1 e RSK2 (siRSK1/2) como modelo para estudo da fosforilação de TSC2 no resíduo Ser1798. Nesse trabalho, os autores mostram que a depleção concomitante de RSK1 e RSK2 diminui a fosforilação de TSC2 em Ser1798 e propõem a relevância da avaliação do alvo para avaliar o nível de atividade de RSKs nas células. De forma interessante, neste estudo observamos que as células RSK1^{KO} geradas através do sistema CRISPR/Cas9 tratadas com PMA possuem deficiência na fosforilação de TSC2 no resíduo de Ser1798 (Figura 18B). De forma curiosa, o mesmo não foi observado para as células RSK2^{KO} (Figura 18C). Esse resultado, somado ao trabalho anterior do grupo (SOARES 2016), sugere que a fosforilação de TSC2 em Ser1798 nas células LN-18 seja realizada de maneira preferencial pela isoforma RSK1 e é explorado na próxima seção. Finalmente, outra observação relevante refere-se aos efeitos semelhantes observados nos clones que foram gerados com guias distintas, já que se entende que seja essencial validar os resultados obtidos com sgRNAs distintos.

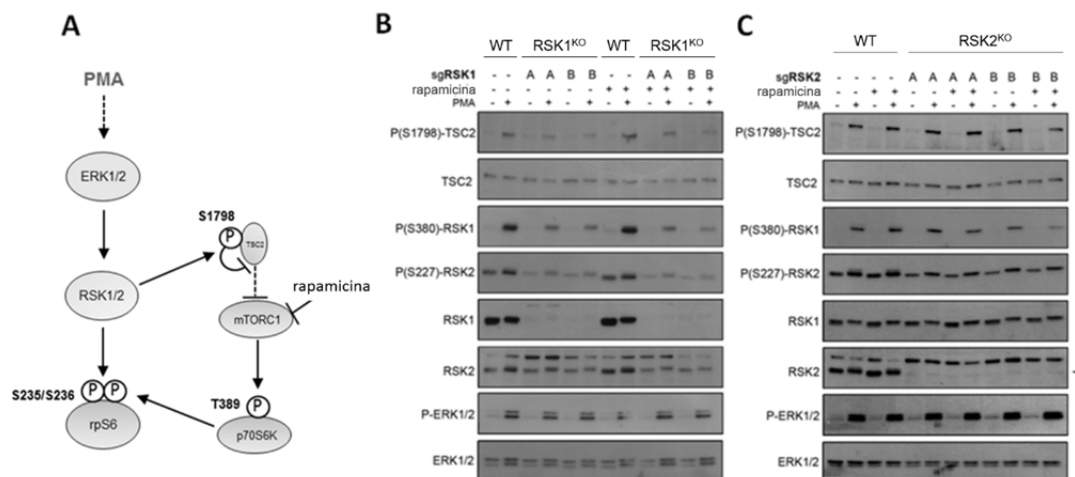


Figura 18 - Sinalização via RSKs e mTORC1 em células LN-18 nocaute para RSK1 ou RSK2 feitas com sgRNAs diferentes. (A) Esquema simplificado ilustrando a interação entre as vias de RSKs e mTORC1. Destaca-se a fosforilação de TSC2 no resíduo Ser1798 por RSK, que levaria à inativação do complexo e consequente ativação de mTORC1. (B e C) Células LN-18 foram transfectadas com plasmídeos contendo dois sets diferentes de sgRNAs para RSK1 e RSK2 (A e B). Clones de célula nocautes para RSK1 e RSK2 provenientes dos dois sistemas foram carenciadas por 48 horas e depois tratadas com 100 ng/mL de PMA por 15 minutos. Quando indicado, as células foram pré-tratadas por 30 minutos com 100 nM do inibidor de mTORC1, rapamicina. Os extratos foram usados para western blot e incubados com os anticorpos indicados. Observar que os anticorpos para P(S380)-RSK1 reconhece a fosforilação de um resíduo análogo em RSK2 e P(S227)-RSK2 reconhece a fosforilação de um resíduo análogo em RSK1.

4.2.2 Efeitos do Nocaute de RSK1 na via de mTORC1

Uma vez que dados do grupo sugerem que a fosforilação de TSC2 em Ser1798 seja dependente de RSK1 e que observamos que clones $RSK1^{KO}$ apresentavam níveis de fosforilação de TSC2 no resíduo Ser1798 inferiores em relação a clones $RSK2^{KO}$, realizamos experimentos para verificar o comportamento das proteínas envolvidas nas vias de sinalização que controlam a tradução em clones $RSK1^{KO}$ gerados com duas guias diferentes. Nesse sentido, buscamos avaliar se a fosforilação de TSC2 no resíduo Ser1798 implicaria na ativação das proteínas envolvidas com a regulação da tradução via Ras/ ERK/RSKs e/ou PI3K/AKT/mTORC1. Assim, avaliamos a fosforilação de rpS6 nos resíduos Ser235/236 (alvos de ambos RSK e S6K1) e de 4E-BP1 nos resíduos Thr37/46 (alvo de mTORC1).

De fato, clones RSK1^{KO} gerados com duas guias distintas apresentaram deficiência na fosforilação de TSC2 no resíduo Ser1798 (Figura 19). Contudo, os alvos abaixo da via, como rpS6 e 4E-BP1, não se alteraram significativamente. A falta de correlação entre a ausência de RSK e o nível de ativação dessas proteínas poderia ser explicado pelos altos níveis basais da via PI3K/AKT/mTORC1 nas células LN-18, o que pode implicar no fato de que a contribuição das RSKs para essas fosforilações seja muito baixo ou ausente. No mais, esses resultados corroboram os achados de ROFFÉ et al. (2015) e levantam o questionamento sobre o envolvimento da via Ras/ERK/RSK no controle da síntese de proteínas via mTORC1, reforçando a relevância desse estudo.

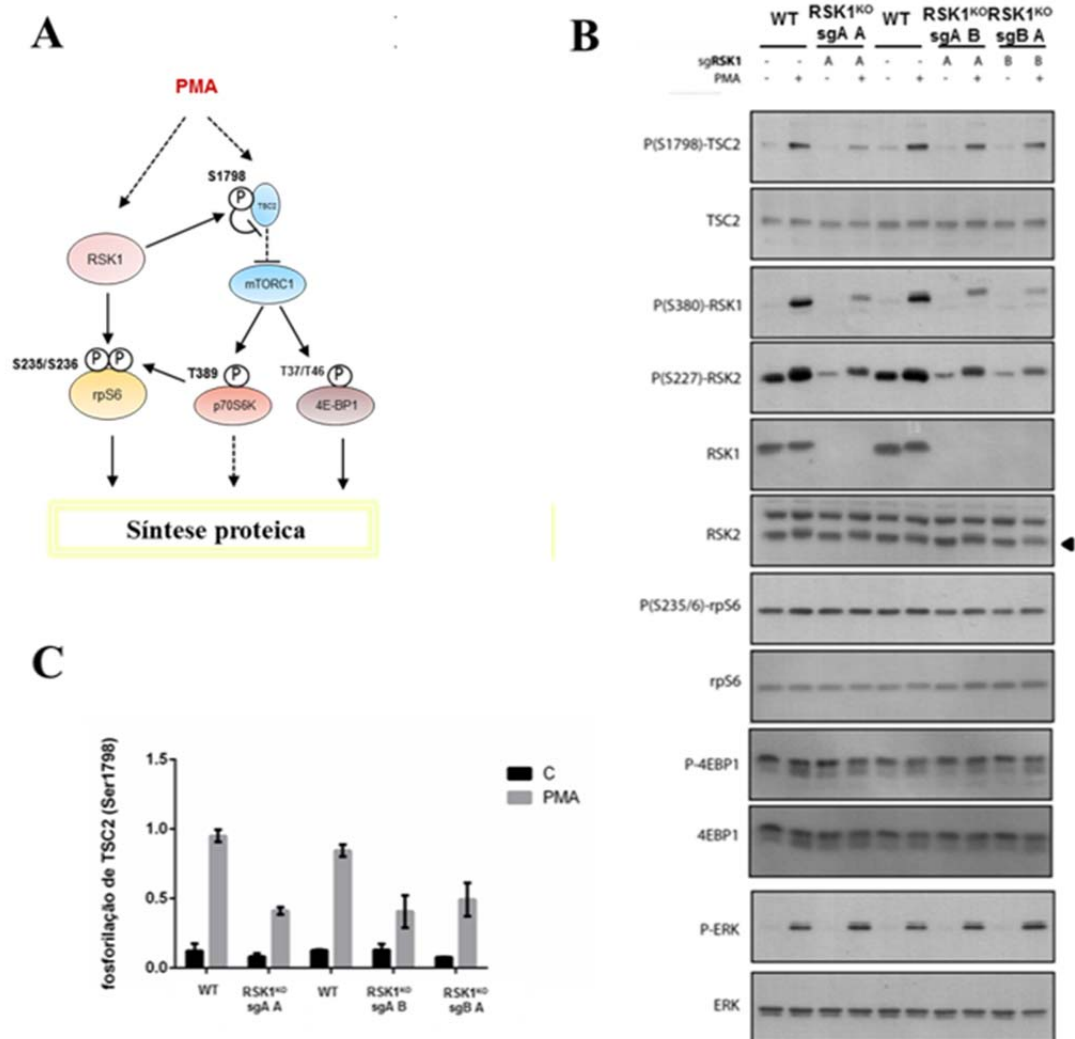


Figura 19 - Sinalização via RSKs e mTORC1 em células LN-18 nocautes para RSK1 feitas com sgRNAs diferentes. (A) Esquema simplificado ilustrando a interação entre as vias de RSKs e mTORC1. Destaca-se a fosforilação de TSC2 no resíduo Ser1798 por RSK, que levaria à inativação do complexo e consequente ativação de mTORC1. (B) Clones de células nocautes para RSK1 provenientes do sistema CRISPR/Cas9, gerados com dois sets diferentes de sgRNAs (A e B) foram carenciados por 48 horas e depois tratados com 100 ng/mL de PMA por 15 minutos. Os extratos foram usados para western blot e incubados com os anticorpos indicados. Observar que os anticorpos para P(S380)-RSK1 reconhece a fosforilação de um resíduo análogo em RSK2 e P(S227)-RSK2 reconhece a fosforilação de um resíduo análogo em RSK1. (C) A análise densiométrica das proteínas estudadas revelou que o alvo P(Ser1798)-TSC2 altera-se significativamente na ausência de RSK1, enquanto níveis de proteínas abaixo da via mostrada em (A) não alteram-se significativamente. Os experimentos foram realizados em triplicatas biológicas. A média e o SEM estão indicados.

4.3 A FOSFORILAÇÃO DE eIF4B NAS CÉLULAS NOCAUTE

A fim de estudar o comportamento de outros alvos de RSKs que controlam a tradução, avaliamos a fosforilação de eIF4B no resíduo Ser422. eIF4B é uma proteína de ligação a RNA, que interage com eIF3 ligado ao ribossomo por meio de interações proteína-proteína e é importante no auxílio da atividade helicásica de eIF4A, que desenovela estruturas secundárias inibitórias na região 5'-UTR de alguns mRNAs (ROGERS et al. 2001; HARMS et al. 2014; GANDIN et al. 2016).

Tanto RSK como S6K podem fosforilar e ativar eIF4B no resíduo Ser422 (SHAHBAZIAN et al. 2006). Enquanto a fosforilação pelas RSK é resultante da ativação da via Ras/ERK, a de S6K depende da via de PI3K/AKT. Assim, para avaliar a contribuição das RSK na fosforilação de eIF4B, as células foram estimuladas por PMA, que estimula principalmente Ras/ERK ou por SFB, que estimula ambas as vias. De forma importante, observamos que células RSK1/2^{DKO} apresentaram níveis de fosforilação de eIF4B muito menores em relação às células selvagens e aos nocautes individuais (Figura 20). Isso sugere que as isoformas RSK1 e RSK2 possuem função redundante em relação à fosforilação de eIF4B. Além disso, de forma interessante, quando nenhuma das isoformas está presente, os baixíssimos níveis de ativação de eIF4B, tanto com o estímulo com PMA, como por SFB, sugerem que o eixo mTORC1/S6K seja menos importante que o ERK/RSK nessas células. De fato, em seu trabalho, Roffé et al. (2015), reportam que não se observou redução na fosforilação de eIF4B em células LN-18 que tiveram a via de mTORC1 inibida por rapamicina. Por outro lado, a inibição concomitante por inibidores químicos de RSK (a saber, SL0101 e BI-D1870) resultou em menores níveis de ativação de eIF4B.

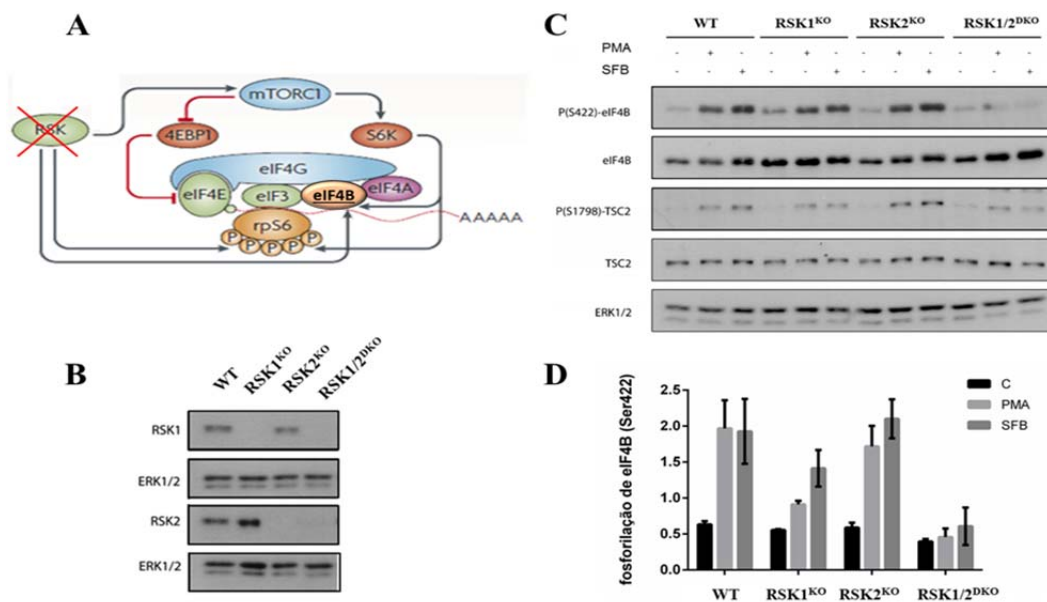


Figura 20 - Análise dos níveis de fosforilação de eIF4B, alvo de RSKs, nas células LN-18 nocaute para RSKs. (A) Esquema ilustrando interação entre as vias de RSKs e mTORC1 no controle da tradução dependente de *cap*. Destacamos o alvo eIF4B na figura. Adaptado de ANJUM e BLENIS (2008). (B) Níveis de RSKs detectados nos clones nocautes utilizados nos experimentos. Notar que foram corridos géis separados para detectar RSK1 e RSK2. (C) Células WT, RSK1^{KO}, RSK2^{KO} e RSK1/2^{DKO} foram carenciadas por 48 horas e tratadas com 100 ng/mL de PMA ou 10% SFB por 15 minutos. Os extratos foram utilizados para western blot e incubados com os anticorpos indicados. (D) Análise densiométrica dos níveis de fosforilação de eIF4B em Ser422 nos clones mostra que células RSK1^{KO} e RSK1/2^{DKO} apresentam deficiência na fosforilação de eIF4B. Experimentos realizados em triplicatas biológicas. A média e o SEM estão indicados.

4.4 EFEITOS DA INIBIÇÃO DE mTORC1 NAS CÉLULAS NOCAUTE PARA RSK

Visto o potencial das RSKs como reguladores da síntese de proteínas, buscamos investigar qual seria a contribuição das mesmas na regulação da tradução de mRNAs dependente ou independentemente da via de mTORC1, por meio da translatoômica das células. Dessa maneira, buscamos analisar os efeitos das RSKs quando mTORC1 está ativo ou inativo. Para isso, comparamos os efeitos de dois inibidores de mTORC1 com mecanismos de ação diferentes, rapamicina e Torin1. A rapamicina é um inibidor alostérico de mTORC1 e obstrui apenas parcialmente os substratos do sítio ativo. A Torin1 é um inibidor competitivo do sítio ativo da

quinase mTOR e inibe a atividade da mesma. Por ser um inibidor de sítio ativo de mTOR, tanto o complexo mTORC1 e mTORC2 são inibidos. Avaliamos os efeitos dos dois inibidores nas células nocaute para RSK através da determinação da fosforilação dos dois substratos principais de mTORC1, 4E-BP1 e S6K1. Tanto o tratamento com rapamicina como com Torin1 resultou na inibição completa da fosforilação de S6K1 por mTORC1 (Figura 21). Por outro lado, enquanto o tratamento com Torin1 foi capaz de induzir a desfosforilação completa de 4E-BP1, rapamicina afetou parcialmente a fosforilação do alvo. Isso se deve ao fato de que apenas dois dos quatro sítios de fosforilação de 4E-BP1 são sensíveis ao tratamento com rapamicina (CHOO et al. 2008; THOREEN et al. 2009). Como consequência da ausência de fosforilação em 4E-BP1, a proteína pode sequestrar seu ligante eIF4E e, dessa forma, diminuir a taxa de tradução das células. Assim, os efeitos de Torin1 na tradução devem ser mais proeminentes, em relação aos da rapamicina.

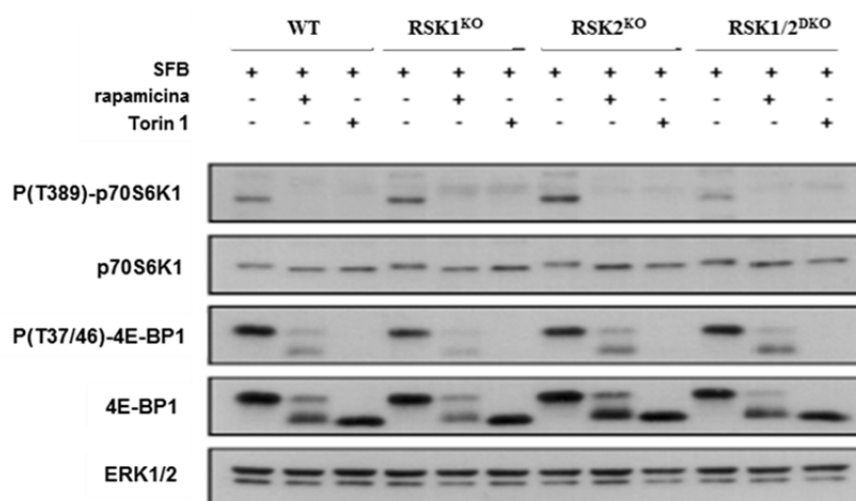


Figura 21 - Comparação dos efeitos dos inibidores de mTOR, rapamicina e Torin1 em células nocaute para as RSKs. Para os experimentos, células WT, RSK1^{KO}, RSK2^{KO} e RSK1/2^{DKO} foram carenciadas de soro por 48 horas e pré-tratadas com 100 nM de rapamicina ou 250 nM de Torin1 e estimuladas com 10% SFB durante 6 horas. Os extratos proteicos foram utilizados para western blot e incubados com os anticorpos indicados. Notar que as 4E-BPs migram no SDS-PAGE dependendo do estado de fosforilação, ou seja, quanto mais fosforiladas, mais alta a banda correspondente. O tratamento com Torin1 promove a desfosforilação total de 4E-BP1, enquanto, a desfosforilação na presença de rapamicina é incompleta.

4.5 COMPARAÇÃO ENTRE O TRATAMENTO COM AS DROGAS RAPAMICINA E TORIN1 PARA ESTUDOS SOBRE A TRADUÇÃO

Em um estudo piloto, as células selvagens e nocautes para as RSK foram tratadas com o inibidor de mTORC1, rapamicina, e foram corridos os perfis polissomais das mesmas. Com esse experimento (Figura 22), pudemos notar alguns pontos importantes que aprimoraram o desenho experimental para a realização da translatoômica das células. O primeiro ponto refere-se aos altos níveis de tradução observados nas células LN-18 carenciadas. Comparando-se as curvas dos perfis plotados nas figuras, é possível verificar que o tratamento com soro não induz a tradução a níveis elevados, conforme esperávamos no caso de células que foram previamente depletadas de fatores de crescimento (notar que as áreas abaixo das curvas em preto e azul resultariam em taxas de tradução muito semelhantes). Isso pode indicar que, nessas células, a tradução não depende fortemente de fatores de crescimento. Outro ponto importante refere-se à inibição da tradução por rapamicina, que não desempenhou efeitos inibitórios suficientemente elevados que nos permitiriam estabelecer um modelo adequado em relação à identificação de mRNAs regulados por RSKs de forma dependente ou independente de mTORC1.

De maneira inesperada, nas células LN-18, o pico referente ao monossomo 80S aparece dividido em dois em todos os perfis polissomais realizados. Uma possível justificativa pode estar relacionada a algum defeito na ligação das subunidades menores, ou no caso em que os níveis das mesmas não existam estequiometricamente no momento da tradução (por exemplo, como ocorre em linhagens que apresentam defeitos na maturação da subunidade 60S ou com níveis reduzidos dessa subunidade) (ROTENBERG et al. 1988; KEMMLER et al. 2009). Nesse caso, em termos biológicos, o mRNA estaria associado a mais de um PIC 43S, que estaria esperando 60S, “atrasando”, assim, a montagem completa do monossomo 80S num mRNA que já está sendo traduzido por um ribossomo.

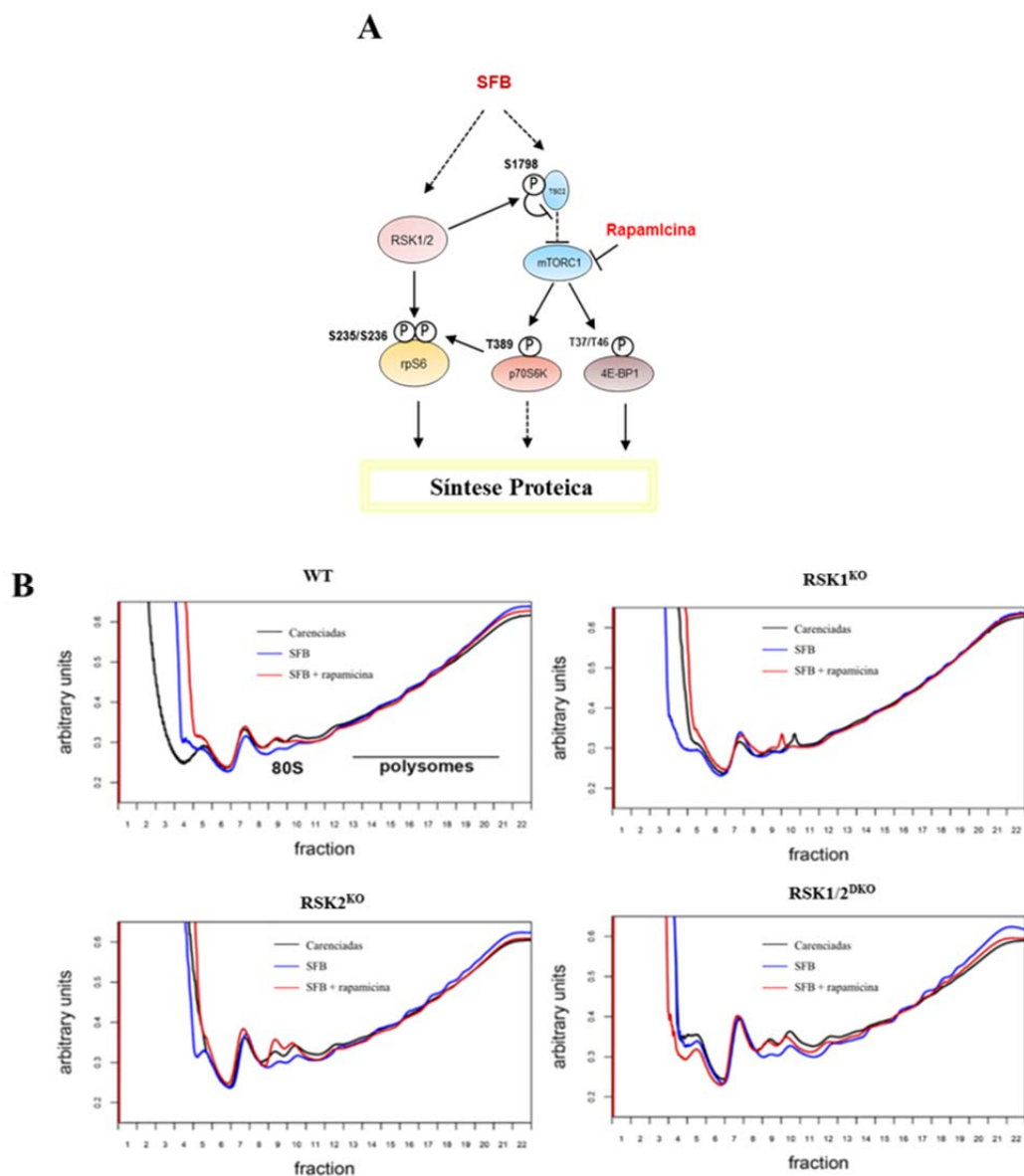


Figura 22 - Perfil polissomal de células LN-18 nocautes para RSKs. (A) Esquema ilustrando a interação entre as vias de RSKs e mTORC1 convergindo no controle da síntese proteica. No esquema, é possível observar que SFB ativa as vias de Ras/ERK/RSKs e PI3K/AKT/mTORC1. (B) Perfil polissomal de células WT, RSK1^{KO}, RSK2^{KO} e RSK1/2^{DKO} em gradiente 5-50% de sacarose. Para o experimento, as células foram carenciadas de soro por 48 horas (linha preta), tratadas com 10% de SFB (linha azul) ou pré-tratadas com 100 nM de rapamicina, por 30 minutos, seguido pelo tratamento com 10% de SFB por 6 horas (linha vermelha). Para estimar o nível de tradução de cada célula é necessário observar a razão entre a área abaixo do pico dos polissomos e a área abaixo do pico de 80S (no caso das LN-18 o pico aparece dividido em dois), como indicado no primeiro painel. Notar que a região polissomal dos perfis apresenta comportamento ascendente, devido à pouca quantidade de material utilizada com a consequente absorção de UV por algum componente das soluções do gradiente.

Visto que o processo de tradução é afetado parcialmente após o tratamento com rapamicina, como resultado da incompleta desfosforilação de 4E-BP1 (Figura 21), comparamos os efeitos a nível traducional de rapamicina com o inibidor catalítico de mTOR, Torin1. Por meio de ensaios de perfil polissomal, observamos as diferenças entre os efeitos da inibição da tradução por rapamicina ou Torin1 (Figura 23). Uma vez que Torin1 é capaz de induzir a desfosforilação de 4E-BP1 completamente e rapamicina apenas parcialmente (Figura 21), isso se refletiu, conforme esperado, em uma maior inibição da tradução, já que eIF4E, nesse caso, estaria ligando-se a 4E-BP1 e não a eIF4G, no qual participaria do complexo de união ao *cap*, eIF4F.

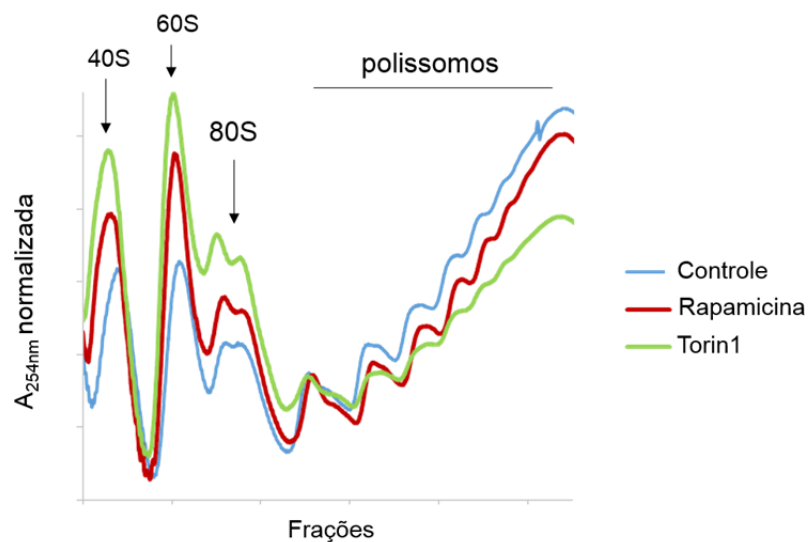


Figura 23 - Comparação dos efeitos à nível de traducional dos inibidores de mTOR, rapamicina e Torin1. Para os experimentos, células WT, RSK1^{KO}, RSK2^{KO} e RSK1/2^{DKO} foram carenciadas de soro por 48 horas e pré-tratadas com 100 nM de rapamicina ou 250 nM de Torin1 e estimuladas com 10% SFB durante 6 horas. Os extratos polissomais foram aplicados em gradiente 5-50% de sacarose. Na figura, apresenta-se o perfil polissomal de células WT tratadas com DMSO (em azul), Rapamicina (em vermelho) ou Torin1 (em verde). Notar que as células tratadas com Torin1 apresentam menor taxa de tradução, já que na medida em que a área dos polissomos diminui, a 80S aumenta em relação ao controle.

4.6 PERFIL POLISSOMAL OTIMIZADO PARA TRANSLATÔMICA DE CÉLULAS NOCAUTE PARA AS RSKs

Em um trabalho recente, nosso grupo colaborou com a otimização de um gradiente para obtenção de perfis polissomais que facilitassem os passos subsequentes na análise do transloma de tumores (LIANG et al. 2017). Para analisar o efeito das isoformas das RSKs no transloma de células de GBM, utilizamos esse gradiente otimizado. Além disso, para determinar os efeitos das RSKs dependentes e independentes de mTORC1, as células foram tratadas com Torin1. Inicialmente, verificamos a fosforilação dos alvos de mTORC1, 4E-BP1 e S6K1, nas células selvagens e nocautes para RSKs (Figura 24A). De forma adequada, o tratamento com Torin1 causou a total desfosforilação dos alvos.

Além de permitir obter o mRNA ativamente traduzido, os perfis polissomais nos permitiram estimar os níveis de tradução de cada tipo celular, através da quantificação da relação da área do pico dos polissomos em relação à área abaixo os picos de $80S + 2n$ (mRNA associado com 2 ribossomos), Figura 15D. Pudemos observar que a tradução é menor quando as duas isoformas das RSKs estão ausentes (Figuras 24B - F). Um ponto interessante é que nas células DKO, a fosforilação de 4E-BP1 é similar à fosforilação das células selvagens e nocautes simples, indicando que a diminuição nos níveis de tradução dessas células não é o resultado de uma inativação de mTORC1, sugerindo que outros mecanismos dependentes de RSK são importantes, como por exemplo a fosforilação de eIF4B. O tratamento com Torin1 reduziu a tradução em todas as células, sendo que os níveis de tradução das células DKO foram menores que nas outras células após o tratamento com Torin1.

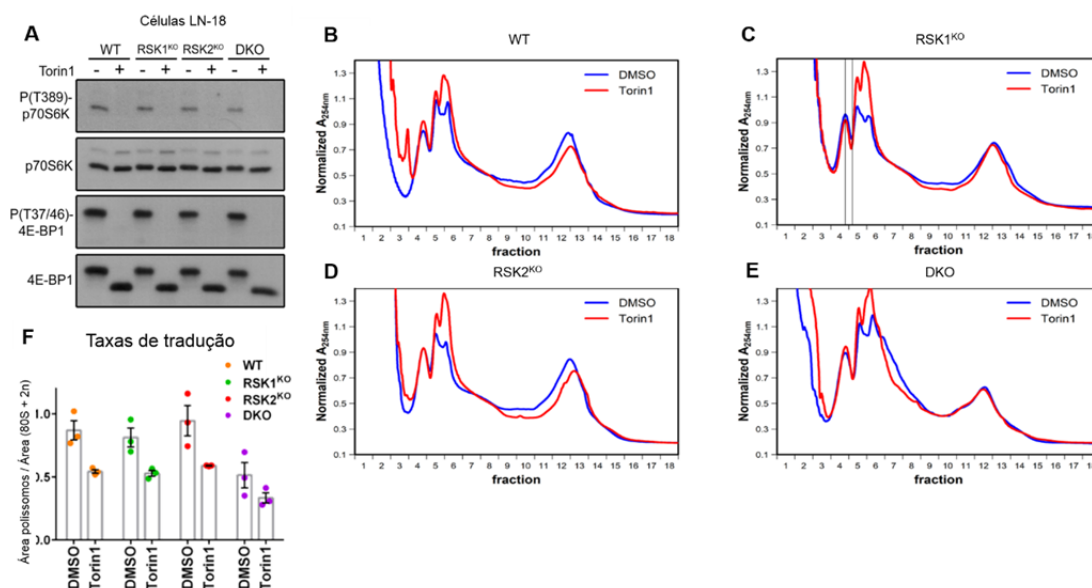


Figura 24 - Perfis polissomais em gradiente não-linear otimizado para obtenção de mRNAs eficientemente traduzidos. Para os experimentos as células foram carenciadas de soro por 48 horas e pré-tratadas com 250 nM de Torin1 e estimuladas com 10% SFB durante 6 horas. (A) Os extratos proteicos foram utilizados para western blot e incubados com os anticorpos indicados. Os extratos de polissomos foram aplicados no gradiente não linear e ultracentrifugados. Foram obtidos os perfis para (B) WT; (C) RSK1^{KO}; (D) RSK2^{KO} e (E) DKO. (F) Foi realizada a quantificação das áreas abaixo dos polissomos e dos picos 80S + 2n e as taxas de tradução para cada condição foram calculadas conforme descrito na Figura 15D. (n = 3)

4.7 TRANSLATÔMICA DAS CÉLULAS LN-18 NOCAUTE

4.7.1 Análise da Integridade dos mRNA Totais e Polissomais

A partir do pico dos polissomos (> 3n), os mRNA associados com os polissomos (ativamente traduzidos) e o respectivo mRNA total da alíquota do extrato que não foi aplicada no gradiente foram purificados. A qualidade dos mRNAs total e polissomal obtidos foi de altíssima qualidade, com a maioria dos RIN possuindo valores máximos (RIN = 10), como mostrado na Figura 25. As amostras de mRNAs foram, então, enviadas para a AFIP (<https://www.afip.com.br/principal.asp?pCanalRH=1>) para correr os chips do microarranjo ClariomTM D Assay, human (Affymetrix).

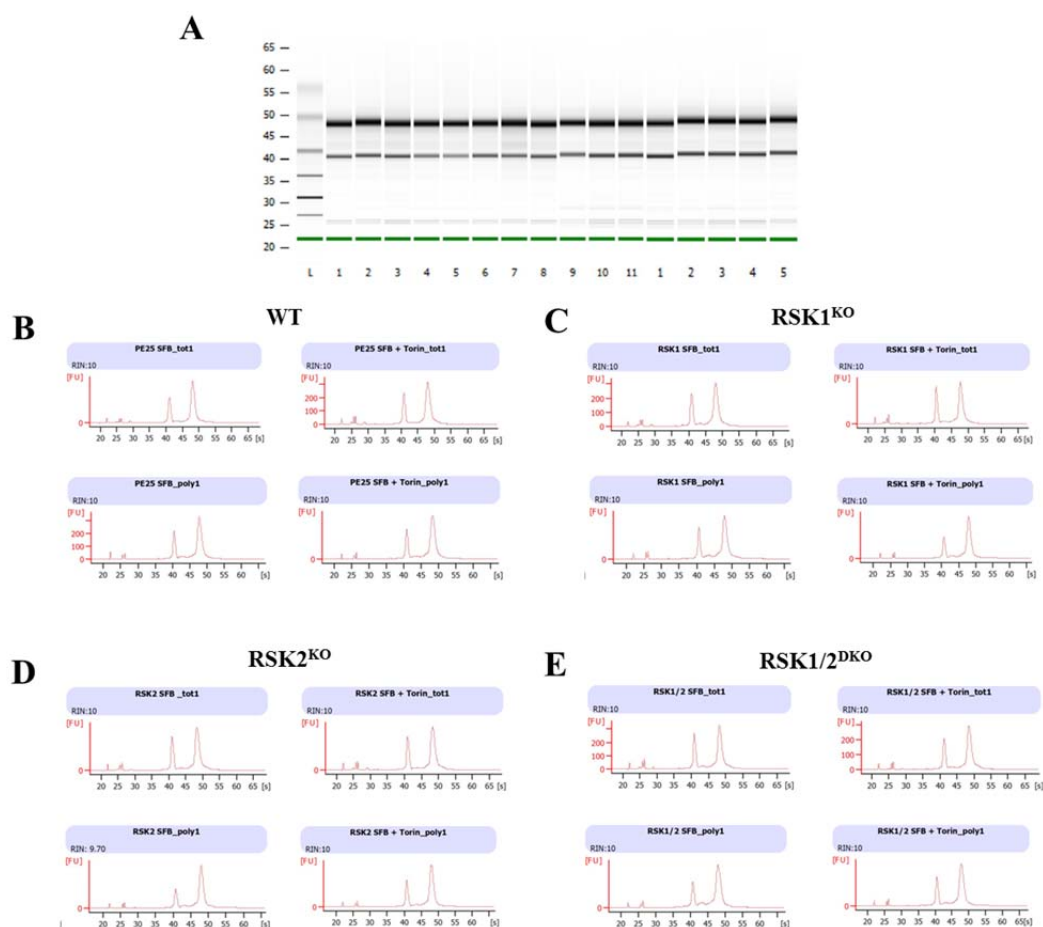


Figura 25 - Análise da qualidade dos RNAs totais e polissomais isolados. Após extração, a análise dos RNAs utilizados nos experimentos de microarranjo foi realizada através de Bioanalyzer. Em (A) Apresenta-se um gel ilustrativo das corridas dos fragmentos de RNA presentes nas amostras. A seguir, mostram-se os picos e respectivos valores de RIN de RNAs totais e polissomais para os clones (B) WT; (C) RSK1^{KO}; (D) RSK2^{KO}; (E) RSK1/2^{DKO}. Os valores de RIN foram altos, mostrando a alta qualidade dos RNAs isolados.

4.7.2 Análise de Componentes Principais

Os arquivos CEL resultantes dos microarranjos passaram todos os controles de qualidade (checado através do software Transcriptome Analysis Console da Affymetrix). Os microarranjos foram sumarizados e normalizados através de SST-RMA. Para avaliar se a variação contida nos quatro primeiros componentes possui informações relevantes sobre as amostras, as mesmas foram projetadas em gráficos plotados de PC1 \times PC2; PC1 \times PC3; PC2 \times PC3 e PC3 \times PC4 (Figura 26 A - D). Nesse sentido, observamos que o primeiro componente (PC1), é definido principalmente pela origem do RNA, ou seja, total ou polissomal e explica mais de

40% da variância original das amostras, sendo que PC2, é definido pelo tratamento com Torin1 e retém 16,82% da variância original. Finalmente, diferenças entre células DKO e as demais define PC3. Em uma menor proporção, PC4 foi definido pela variação observada quando são comparadas células RSK1^{KO} com células WT e RSK2^{KO}.

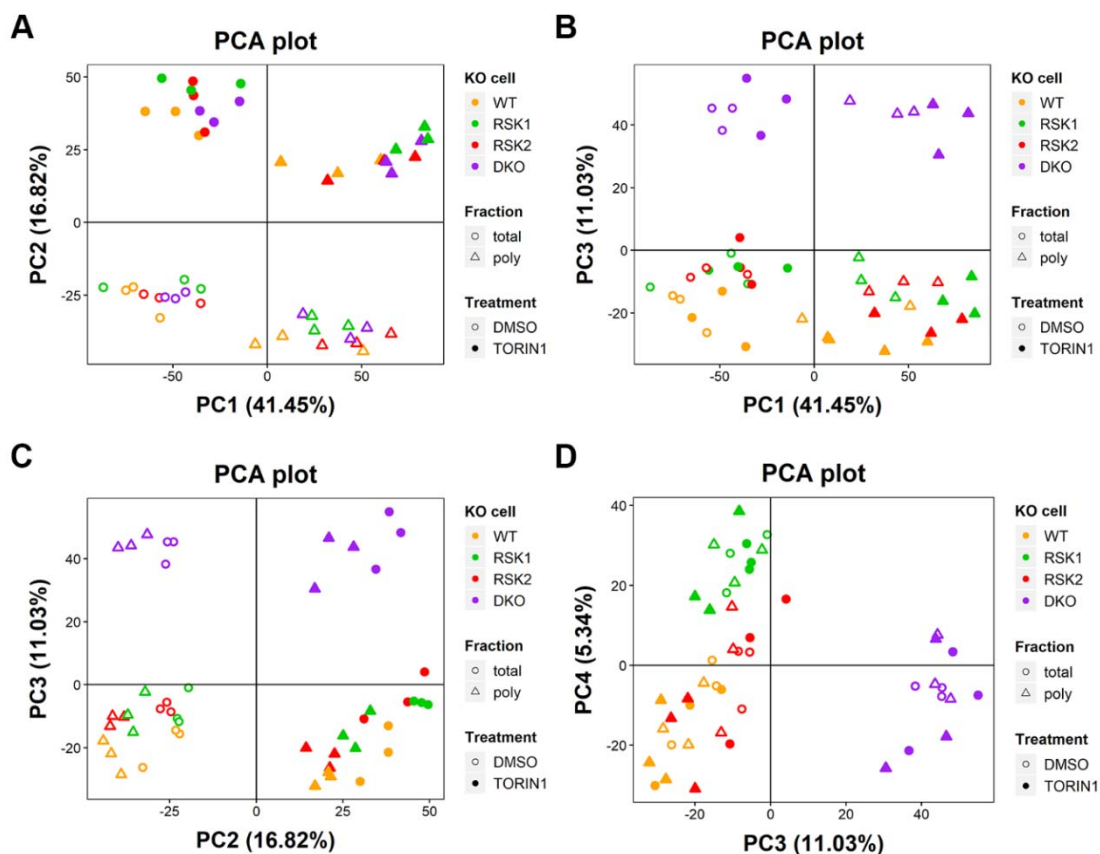


Figura 26 - Análise de Componentes Principais (PCA) da translatoômica das células LN-18 nocaute. Os dados obtidos da análise dos microarranjos de mRNAs totais e polissomais das células LN-18 selvagens (WT), nocautes para RSK1, RSK2 e DKO foram inicialmente analisados por PCA. Em (A - D) observamos que PC1 separa as amostras em RNAs totais e polissomais; PC2 separa as amostras tratadas com Torin1 das tratadas com o veículo (DMSO); PC3 separa as DKO das demais; PC4 separa células RSK1 de células WT e RSK2. Os dados foram filtrados para eliminar mRNAs com intensidade e variância abaixo do primeiro quartil. A porcentagem da variância explicada é indicada para cada componente principal (PC).

4.7.3 Análise dos Efeitos da Depleção das Isoformas de RSK nos mRNAs Traduzidos

Primeiramente, analisamos os mRNAs traduzidos eficientemente (mRNA polissomal) das células para obter um panorama das mudanças associadas à perda das isoformas de RSK, por meio do pacote anota2seq para R (OERTLIN et al. 2018). A análise dos genes diferencialmente expressos referentes ao mRNA polissomal foi determinada através de várias comparações (contrastes) entre os diferentes tipos de células e tratamentos. É importante mencionar que os contrastes foram determinados com base na comparação do efeito das células com perda de RSK e/ou inativação de mTOR em relação às células contendo RSK e/ou ativação de mTOR. Por exemplo, um dos contrastes analisados foi células RSK1^{KO} relativo a células WT, em condições de mTOR ativado (DMSO). A nomenclatura para esse contraste seria RSK1_WT_D (D utilizado para indicar que foi na presença de DMSO). Os mRNAs perdidos nesse contraste, em teoria, seriam os mRNAs cuja expressão depende da presença de RSK1. Os contrastes nos quais comparamos o efeito de Torin1 (mTOR inativo) relativo a DMSO (mTOR ativo) foram indicados segundo o tipo da célula estudada seguido de “_TD” (por exemplo, RSK2_TD quando a célula estudada foi RSK2^{KO}). Outra vez, os mRNAs perdidos nesse contraste, em teoria, seriam os mRNAs cuja expressão depende de mTOR ativado.

A partir dos dados para as células selvagens e nocautes tratadas com Torin1 ou com DMSO, obtivemos os mRNAs cuja tradução diminui de forma dependente de mTORC1 e chamamos este grupo de comparação de “Contraste 1” (WT_TD, RSK1_TD, RSK2_TD and DKO_TD). A seguir, as células nocautes tratadas com DMSO foram comparadas com as WT tratadas com DMSO e este grupo foi chamado de “Contraste 2” (RSK1_WT_D, RSK2_WT_D and DKO_WT_D). No “Contraste 3”, comparamos as células nocautes tratada com Torin1 com WT tratada com Torin1 (RSK1_WT_T, RSK2_WT_T e DKO_WT_T). No “Contraste 4”, células DKO tratadas com DMSO foram comparadas com os nocautes individuais, também tratados com DMSO (DKO_RSK2_D e DKO_RSK1_D). Por fim, no “Contraste 5” células DKO tratadas com Torin1 foram comparadas às células nocautes individuais tratadas com Torin1 (DKO_RSK2_T e DKO_RSK1_T). Os contrastes 4 e 5 reforçam a relevância das isoformas, assim, por exemplo, em DKO_RSK2_D,

avaliamos a relevância da isoforma RSK1 na presença da via de mTOR ativada e, de maneira similar, em DKO_RSK1_D avaliamos a relevância da isoforma RSK2, sob as mesmas condições.

A regulação negativa de mRNAs nas células nocautes para RSKs pressupõe que a presença da isoforma ausente seria necessária à tradução daqueles mRNAs. Assim, mRNAs que tiveram regulação negativa (*downregulation* ou reprimidos) em cada célula devido ao tratamento com Torin1 foram comparados (“Contraste 1”). Encontramos que o número de mRNAs polissomais cuja expressão diminuiu foi maior em células RSK1^{KO} (Figura 27A, a saber, RSK1_TD = 2118; WT_TD = 1321; DKO_TD = 1320; RSK2_TD = 1027). De maneira interessante, comparando-se o “Contraste 2”, encontramos que células que não apresentam nem RSK1, nem RSK2, quando tratadas com DMSO (ou seja, quando mTORC1 está ativado) apresentaram mais do que o dobro de mRNAs cuja expressão foi diminuída em relação à perda individual de RSK1 ou RSK2, como mostrado na Figura 27B (a saber, DKO_WT_D = 2354; RSK1_WT_D = 997; RSK2_WT_D = 828). Esse resultado indica que existem mRNAs que podem ser regulados redundantemente por uma ou outra isoforma.

Surpreendentemente, a análise dos mRNAs do “Contraste 3” revelou que com Torin1, o número de mRNAs reprimidos em RSK1^{KO} é comparável ao observado nas células DKO, enquanto que nas RSK2^{KO} não se observam os mesmos efeitos, como mostrado na Figura 27C (a saber, DKO_WT_T = 2510; RSK1_WT_T = 2271; RSK2_WT_T = 81). Na figura 27D, observamos que RSK1 regula 1570 mRNAs, quando mTORC1 está inativo, diferentemente do que ocorre nas células RSK2^{KO}, nas quais apenas 12 mRNAs seriam regulados pela isoforma RSK2 (Figura 27E). Esse achado indica que quando mTORC1 é inibido, RSK1 é capaz de manter a tradução desses mRNAs, sendo que RSK2 não tem o mesmo efeito sobre a tradução desses mRNAs, nas mesmas condições.

A deleção das duas isoformas de RSK resultou no maior número de mRNAs reprimidos quando comparados aos WT. Contudo, mais do que 2/3 desses foram perdidos tanto no tratamento com DMSO, como com Torin1, como mostrado na Figura 27F. Isso explicaria a razão pela qual o número de mRNAs perdidos na comparação DKO_TD ser menor do que em RSK1_TD (Figura 27A).

As comparações DKO_RSK2 e DKO_RSK1 indicam os efeitos da perda de RSK1 e RSK2 na ausência da outra isoforma, respectivamente. O tratamento com DMSO mostra que a maioria dos mRNAs diminuídos por RSK1 ou por RSK2 são os mesmos, o que revela redundância das funções das isoformas nessa condição (Figura 27G). Contudo, a soma dos genes regulados por RSK1 ou RSK2 individualmente foi menor do que metade dos mRNAs regulados pela presença de ambas as isoformas juntas, ou seja, $DKO_WT_D = 2354$ versus $DKO_WT_D \cap (DKO_RSK2_D \cup DKO_RSK1_D) = 1131$, como mostrado na Figura 27G. Com o tratamento com Torin1, RSK1 por si só foi responsável pela modulação de 60% dos mRNAs modulados pelas duas isoformas, enquanto RSK2, por 30% (Figura 27H). As Figuras 27I e 27J mostram, também, que RSK1 isoladamente reprime mais mRNAs do que RSK2.

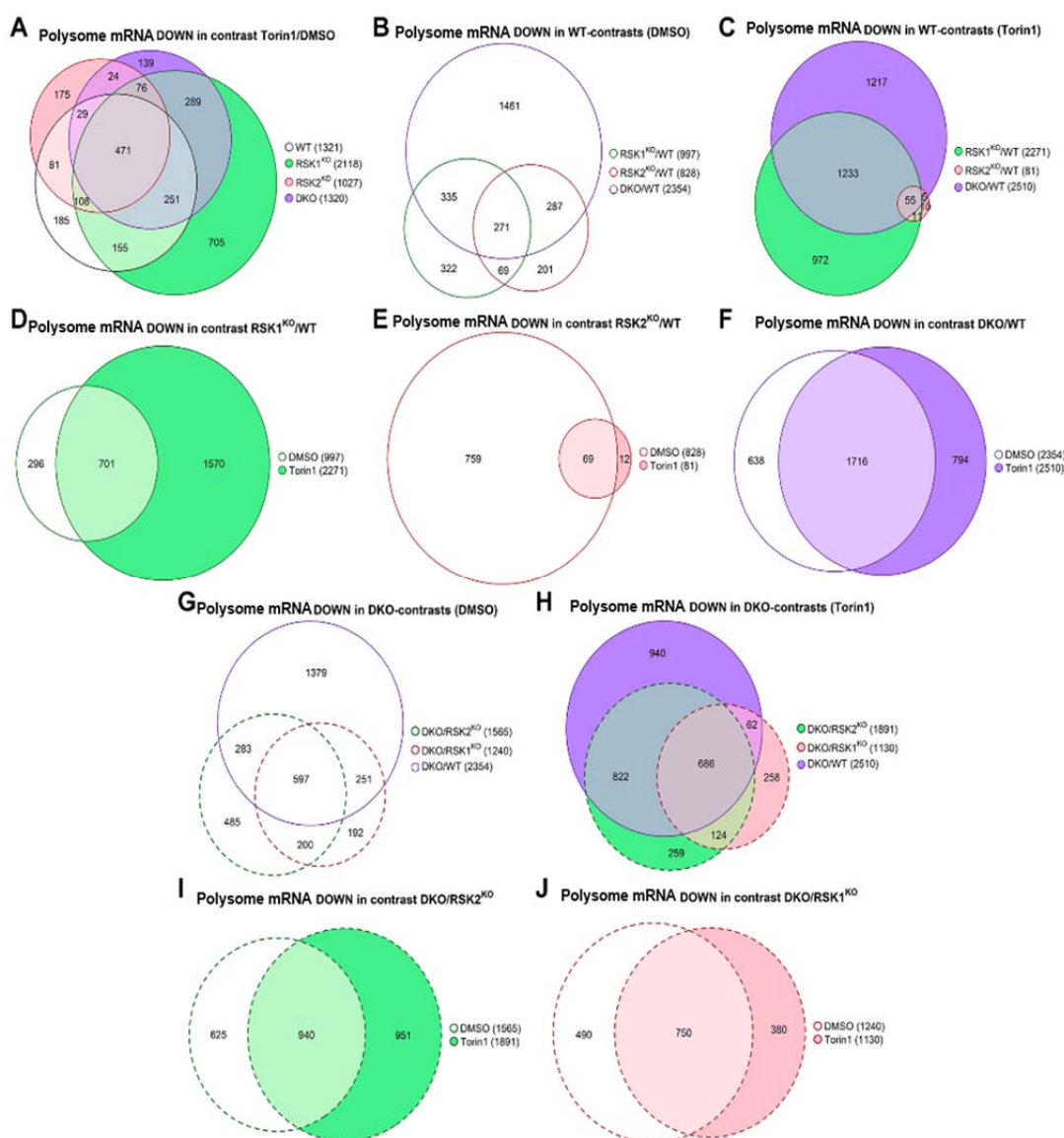


Figura 27 - Análise dos mRNAs polissomais reprimidos (*downregulated*) pela perda das isoformas de RSK ou tratamento com Torin1. Diagramas de Venn para mRNA traduzido (polissomal) nas seguintes comparações/contrastes: (A) WT_TD; RSK1_TD; RSK2_TD e DKO_TD. (B) RSK1_WT_D; RSK2_WT_D e DKO_WT_D. (C) RSK1_WT_T; RSK2_WT_T e DKO_WT_T. (D) RSK1_WT_D e RSK1_WT_T. (E) RSK2_WT_D e RSK2_WT_T. (F) DKO_WT_D e DKO_WT_T. (G) DKO_WT_D, DKO_RSK2_D (perda de RSK1) e DKO_RSK1_D (perda de RSK2). (H) DKO_WT_T, DKO_RSK2_T e DKO_RSK1_T. (I) DKO_RSK2_D e DKO_RSK2_T. (J) DKO_RSK1_D e DKO_RSK1_T. O número total de mRNAs regulados em cada contraste está indicado entre parenteses.

A seguir, procedemos com a análise dos mRNAs polissomais que tiveram ativação (*upregulation*) utilizando as mesmas comparações dos “Contrastes 1 - 5”. A Figura 28A mostra que no “Contraste 1”, praticamente 50% dos mRNAs com ativação após o tratamento com Torin1 são independentes de RSK (a saber, WT_TD = 50%; RSK1_TD = 44%; RSK2_TD = 45%; DKO_TD = 46%) em confronto com os dados obtidos para mRNAs que são reprimidos (na Figura 27A, WT_TD = 36%; RSK1_TD = 22%; RSK2_TD = 46%; DKO_TD = 36%).

O número de mRNAs ativados nas comparações entre células nocaute contra células WT, que estaria relacionado com um efeito repressor mediado pelas isoformas das RSKs, foi consistentemente menor do que os regulados negativamente, como observado comparando as Figuras 28B - F e Figuras 27B - F. Contudo, um comportamento similar das células DKO foi observado: a perda concomitante de RSK1 e RSK2 resultou num aumento maior da tradução de mRNAs, quando comparado à perda das isoformas individuais tanto nas células tratadas com DMSO quanto com Torin1. Em relação às comparações DKO_RSK1 e DKO_RSK2 com tratamento com DMSO, encontramos que a soma dos genes regulados por RSK1 ou RSK2 isoladamente foi de 84% dos mRNAs regulados pela presença de ambas as isoformas juntas, ou seja, $DKO_WT_D = 888$ versus $DKO_WT_D \cap (DKO_RSK2_D \cup DKO_RSK1_D) = 681$, como mostrado na Figura 28G. Na presença de Torin1, a contribuição foi de 68% e, nesse caso, RSK2 parece ser mais importante para regulação positiva de genes do que RSK1, como observado nas Figuras 28H - J.

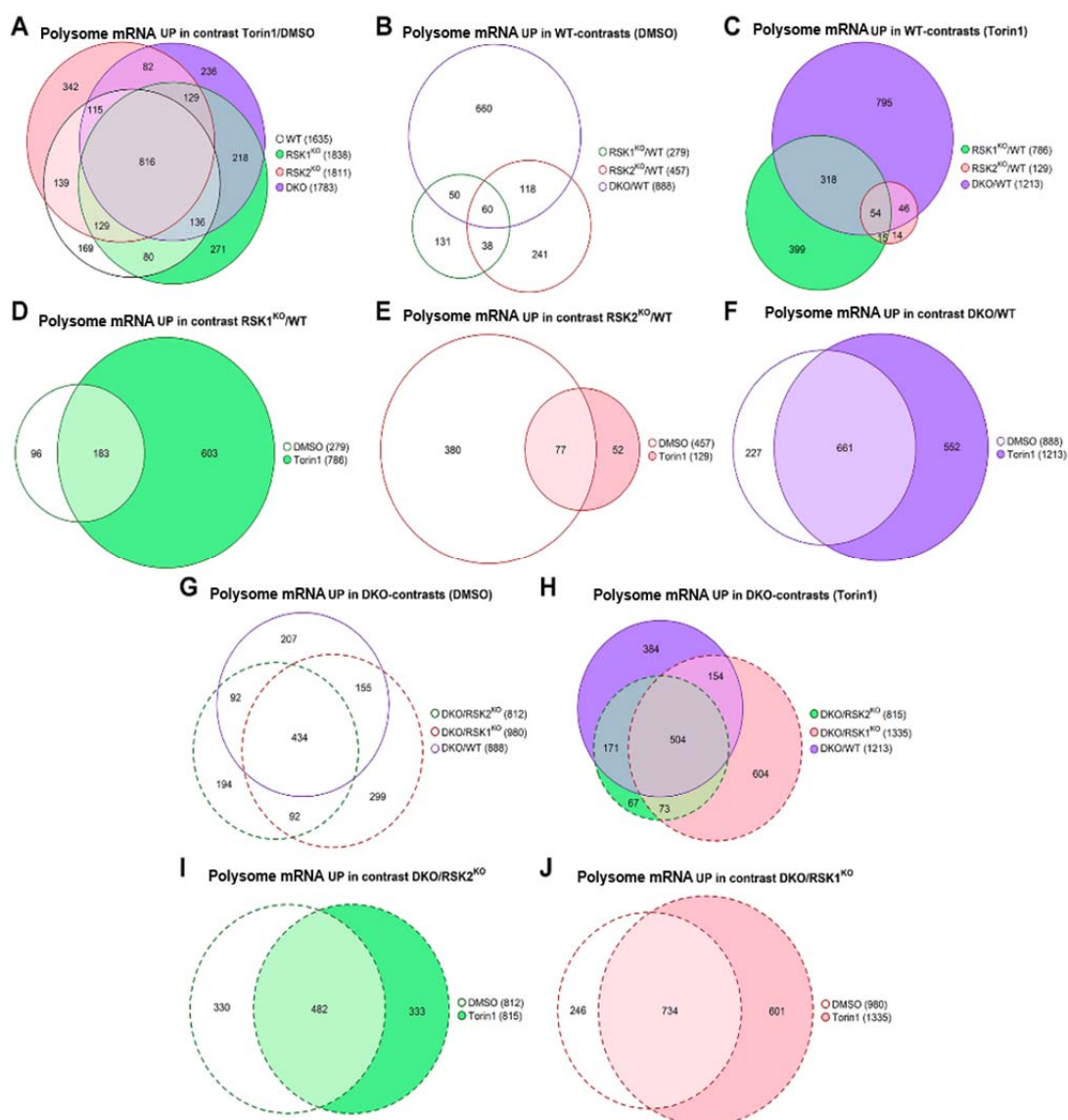


Figura 28 - Análise dos mRNAs polissomais ativados (*upregulated*) pela perda das isoformas de RSK ou tratamento com Torin1. Diagramas de Venn para mRNA traduzido (polissomal) nas seguintes comparações/contrastes: (A) WT_TD; RSK1_TD; RSK2_TD e DKO_TD. (B) RSK1_WT_D; RSK2_WT_D e DKO_WT_D. (C) RSK1_WT_T; RSK2_WT_T e DKO_WT_T. (D) RSK1_WT_D e RSK1_WT_T. (E) RSK2_WT_D e RSK2_WT_T. (F) DKO_WT_D e DKO_WT_T. (G) DKO_WT_D, DKO_RSK2_D (perda de RSK1) e DKO_RSK1_D (perda de RSK2). (H) DKO_WT_T, DKO_RSK2_T e DKO_RSK1_T. (I) DKO_RSK2_D e DKO_RSK2_T. (J) DKO_RSK1_D e DKO_RSK1_T. O número total de mRNAs regulados em cada contraste está indicado entre parenteses.

A partir dos dados da expressão diferencial dos mRNAs traduzidos nas comparações dos “Contrastes 1 - 5”, conforme descrito acima, analisamos os processos biológicos associados a cada um deles, a partir do pacote GStats. Conforme esperado, o tratamento com Torin1 reprimiu mRNAs associados a processos metabólicos, tanto em células WT como em nocautes para RSKs (Figura 29). Por outro lado, nas células RSK1^{KO}, Torin1 diminuiu a tradução de mRNAs relacionados a processos que envolvem proteínas ribossomais, como iniciação da tradução. Isso significa que quando a via de mTORC1 é inativada, RSK1 seria capaz de manter o funcionamento de tais processos nas células (Figura 29B).

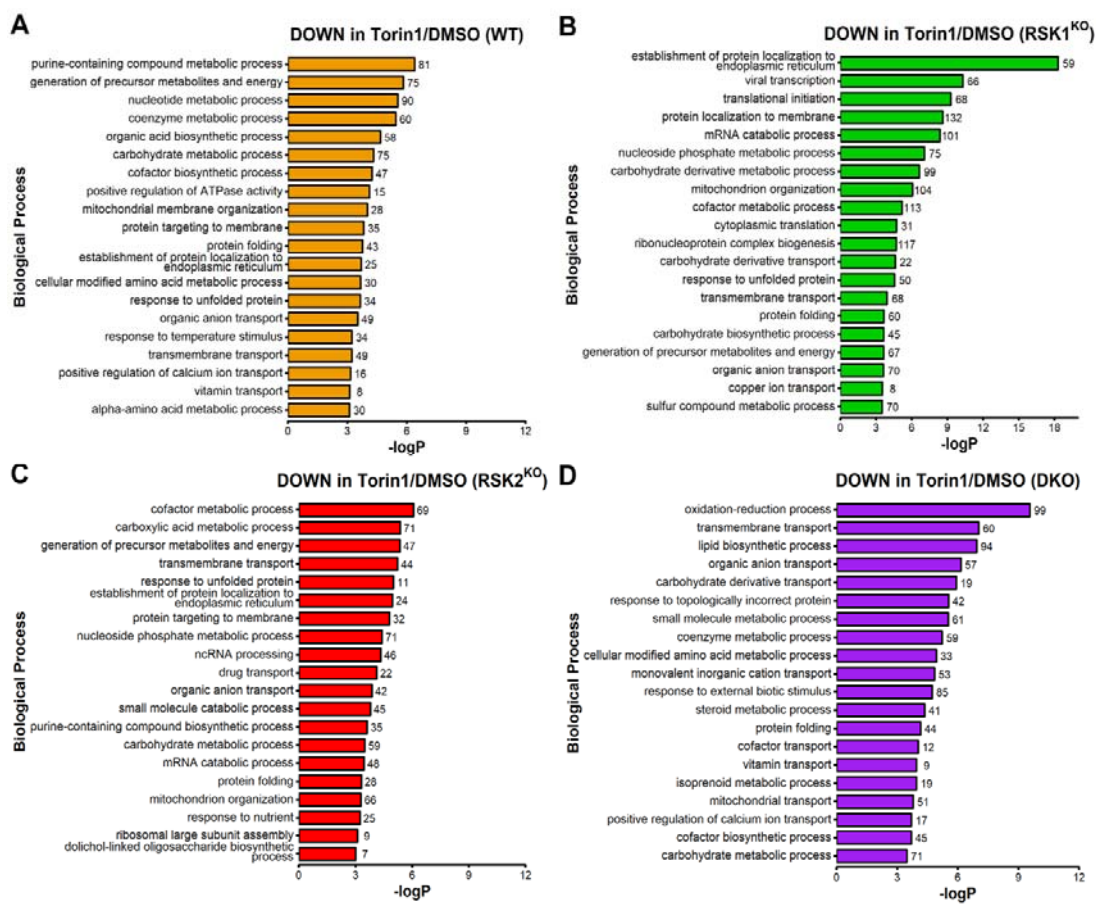


Figura 29 - Processos biológicos reprimidos devido ao tratamento com Torin1. GStats foi utilizado para determinar os processos biológicos associados à regulação negativa dos mRNAs traduzidos nas seguintes comparações/contrastes: (A) WT_TD; (B) RSK1_TD; (C) RSK2_TD e (D) DKO_TD. O número de mRNAs regulados em cada processo é mostrado ao lado da respectiva barra.

A seguir, analisamos as comparações de células nocautes para RSK *versus* células WT (Figura 30). Essa análise mostrou que mRNAs relacionados a processos relacionados tanto com a divisão, como ciclo celular e quanto à cromatina são enriquecidos em células RSK1^{KO} e DKO, mas não em células RSK2^{KO} (Figuras 30A, C e E). Assim, a presença de RSK1, mas não RSK2, seria importante na regulação dessas funções. O tratamento com Torin1 (Figuras 30B, D e F) reprimiu processos relacionados a cadeia de transporte de elétrons apenas quando da ausência de RSK1.

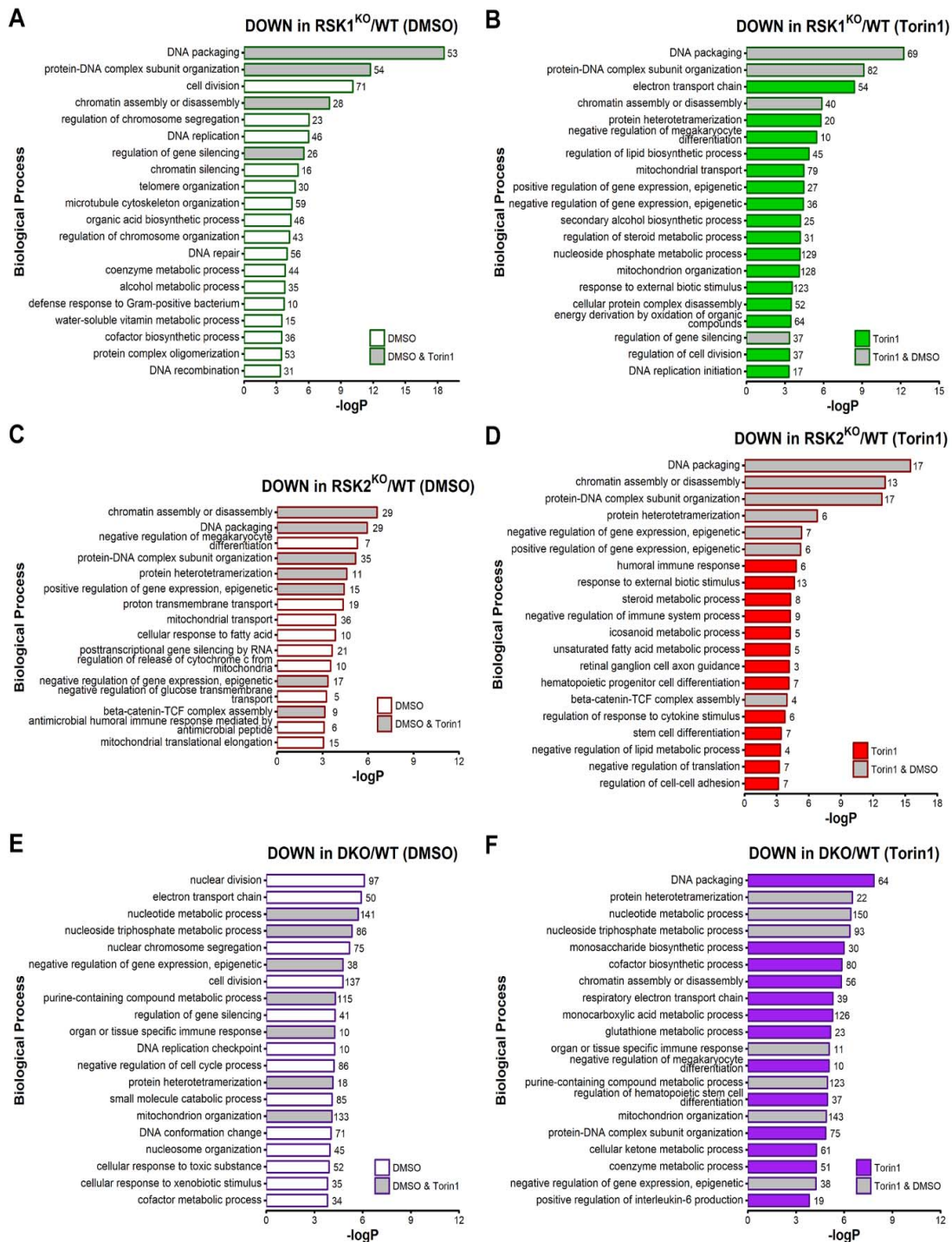


Figura 30 - Processos biológicos reprimidos devido à perda de isoformas de RSK, relativo às células WT. Gostats foi utilizado para determinar os processos biológicos associados à repressão dos mRNAs traduzidos nas seguintes comparações/contrastos: (A) RSK1^{KO}_WT_D; (B) RSK1^{KO}_WT_T; (C) RSK2^{KO}_WT_D; (D) RSK2^{KO}_WT_T; (E) DKO_WT_D e (F) DKO_WT_T. O número de mRNAs regulados em cada processo é mostrado ao lado da respectiva barra. Barras em cinza indicam os processos que são modulados na presença de ambos DMSO e Torin1 no mesmo tipo celular.

A análise das comparações de DKO_RSK1 (relevância de RSK2 ao processo) e DKO_RSK2 (relevância de RSK1 ao processo) (“Contrastes 4 e 5”), apresentada na Figura 31 confirma que RSK1, mas não RSK2, é importante para divisão e ciclo celular. Dessa forma, RSK1 sozinho seria suficiente para regular esses processos, mesmo quando a via de mTOR está ativada (Figura 31A e B).

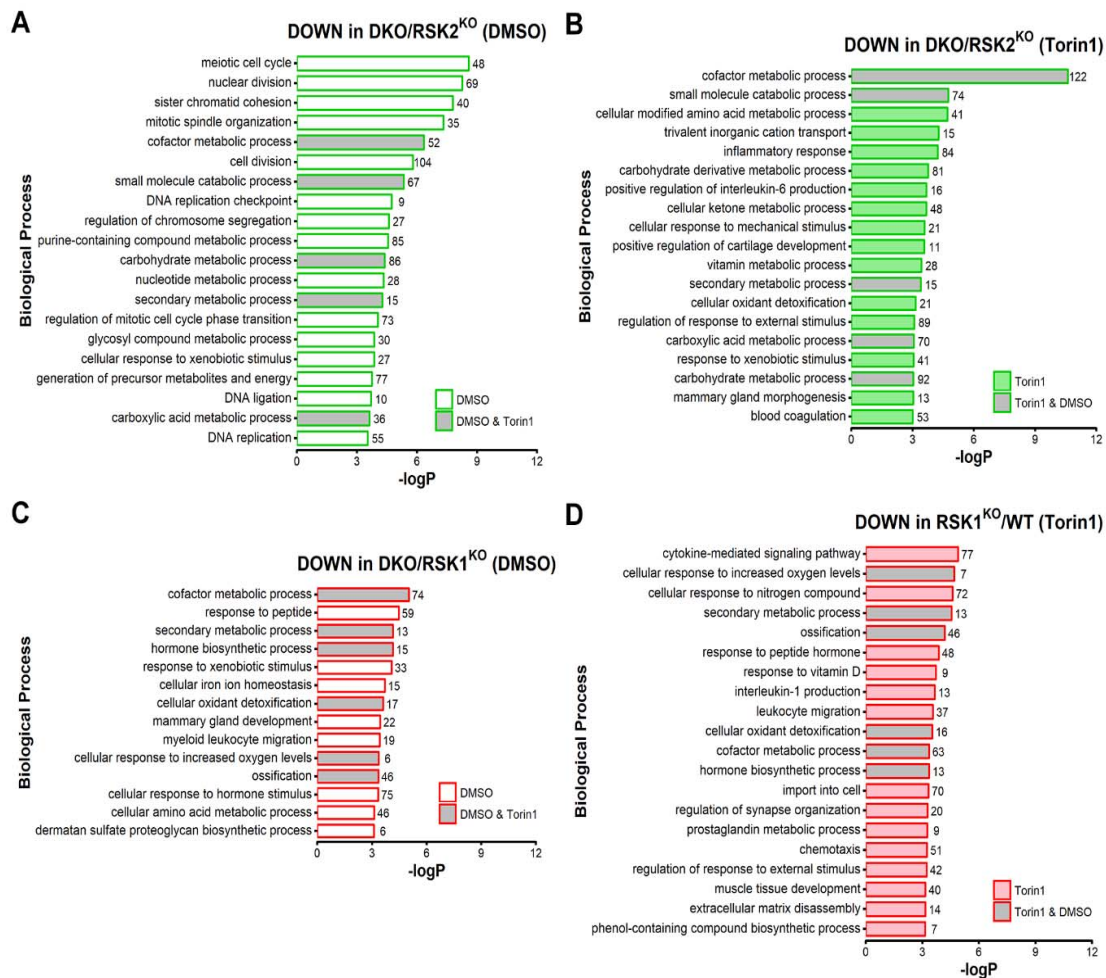


Figura 31 - Processos biológicos reprimidos devido à perda de isoformas de RSK, relativo às células nocaute individuais. GOstats foi utilizado para determinar os processos biológicos associados à repressão dos mRNAs traduzidos nas seguintes comparações/contrastes: (A) DKO_RSK2_D; (B) DKO_RSK2_T; (C) DKO_RSK1_D e (D) DKO_RSK1_T.

O número de mRNAs regulados em cada processo é mostrado ao lado da respectiva barra. Barras em cinza indicam os processos que são modulados na presença de ambos DMSO e Torin1 no mesmo tipo celular.

Paradoxalmente, nossos resultados indicam que o tratamento com Torin1 induz ao enriquecimento de mRNAs associados a processos relacionados a via das MAPK somente em células WT (Figura 32). A perda de RSK1 nas células RSK1^{KO} e DKO tratadas com Torin1 está associada ao enriquecimento de mRNAs associados a divisão e ciclo celular (Figura 32B e D), processos que, como vimos nas Figura 30, são regulados negativamente nas comparações RSK1_WT_D e DKO_WT_D (Figuras 30A e E). Esses achados, aparentemente controversos, estão relacionados à complexa regulação de alguns mRNAs como, por exemplo, dos que codificam histonas. A tradução de mRNAs de histonas é resistente ao tratamento com Torin1, significando que a inibição de mTORC1 não afeta sua tradução. Isso sugere outro mecanismo de regulação traducional, que não envolve mTORC1. No caso de nossos resultados, encontramos que RSK1, na presença de Torin1, estaria relacionada a repressão de mRNAs associados a divisão e ao ciclo celular (Figuras 32B e D). Dado como exemplo a regulação de mRNAs de histonas, é possível que RSK1 esteja envolvido nesse outro mecanismo de regulação traducional, relacionado a tradução desse conjunto de mRNAs. Reforçando isso, encontramos que RSK1, na presença da via de mTOR ativada (Figuras 30A e E) é capaz de manter a tradução de mRNAs relacionados à divisão e ciclo celular. Assim, RSK1 funcionaria como um repressor da tradução desses mRNAs, quando existe inativação de mTORC1 e como ativador da tradução dos mesmos, na presença da via de mTOR ativada, funcionando, dessa forma, em outro mecanismo de regulação, independente de mTORC1. Por outro lado, encontramos que a isoforma RSK2 está associada com o enriquecimento de mRNAs associados a processos de desenvolvimento vascular, estando, assim, funcionando como um repressor da tradução desses mRNAs, visto que esse processo foi encontrado ativado tanto em RSK2_TD como em DKO_TD (Figuras 32C e D).

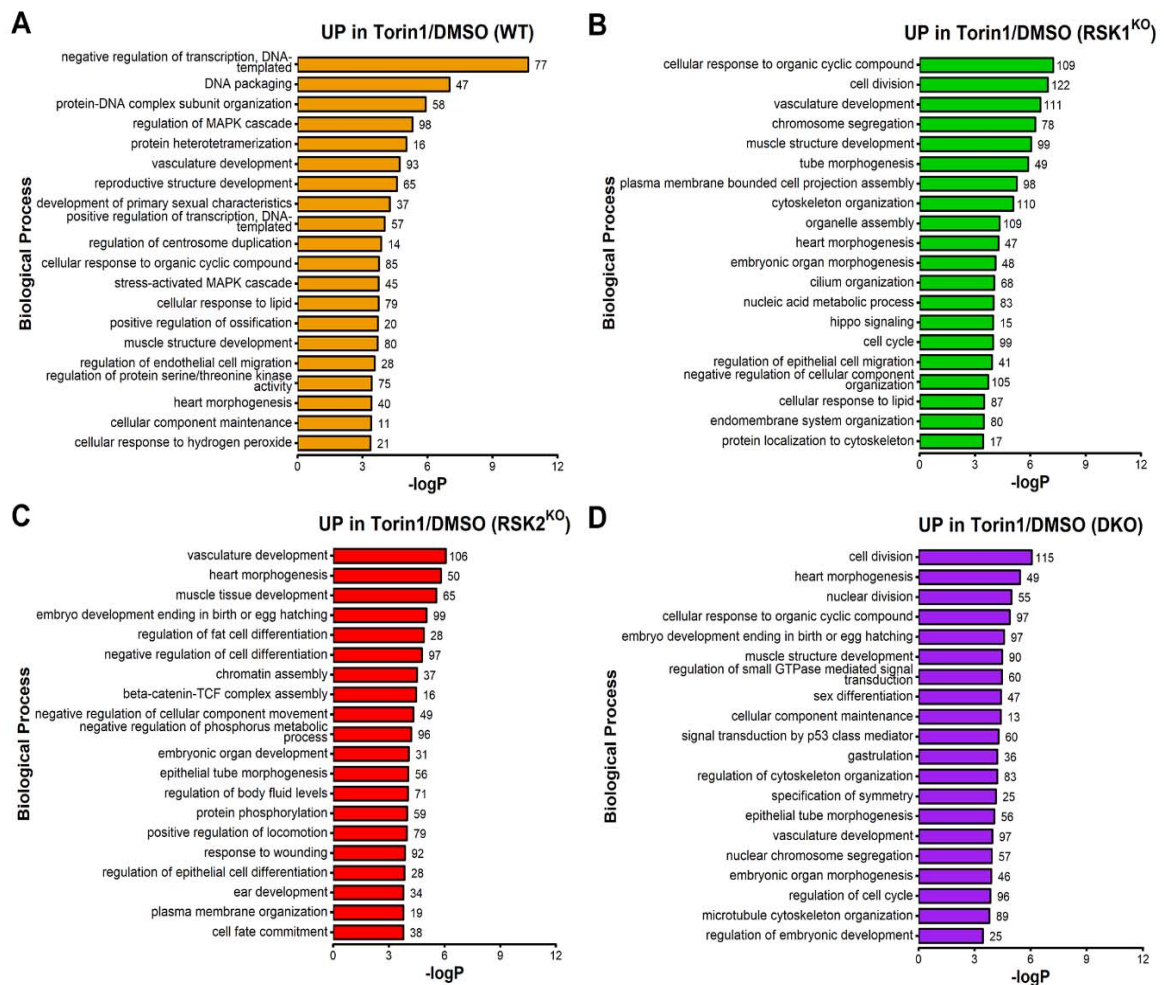


Figura 32 - Processos biológicos enriquecidos devido ao tratamento com Torin1. GStats foi utilizado para determinar os processos biológicos associados ao enriquecimento dos mRNAs traduzidos nas seguintes comparações/contrastes: **(A)** WT_TD; **(B)** RSK1_TD; **(C)** RSK2_TD e **(D)** DKO_TD. O número de mRNAs regulados em cada processo é mostrado ao lado da respectiva barra.

De maneira interessante, a perda de RSKs está associada ao enriquecimento de mRNAs associados a processos como adesão celular, migração e matriz extracelular, indicando que as isoformas reprimem mRNAs associados a tais processos nessas células (Figuras 33 e 34).

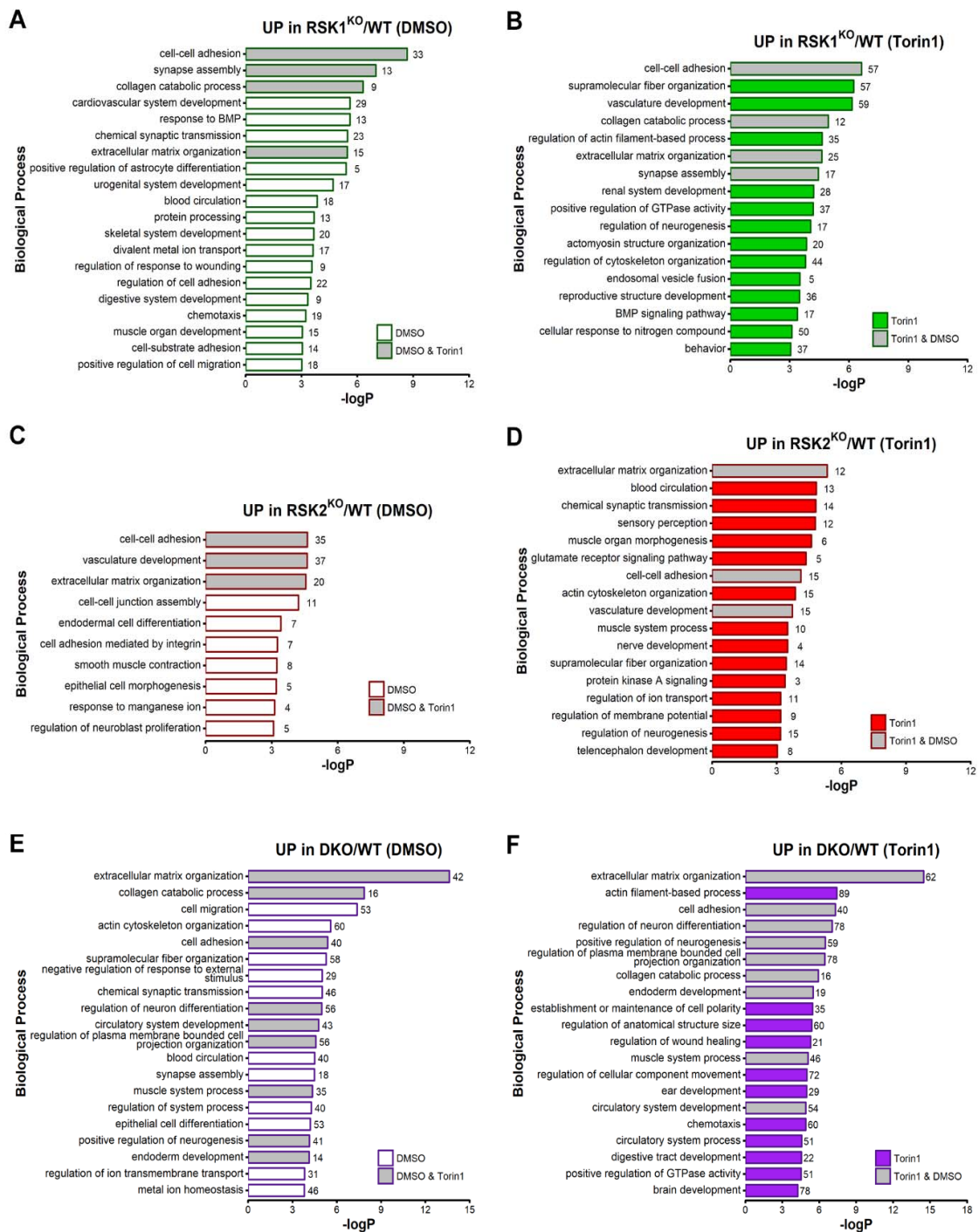


Figura 33 - Processos biológicos enriquecidos devido a perda de isoformas de RSK, relativo às células WT. Gostats foi utilizado para determinar os processos biológicos associados ao enriquecimento dos mRNAs traduzidos nas seguintes comparações/contrastes: (A) RSK1_WT_D; (B) RSK1_WT_T; (C) RSK2_WT_D; (D) RSK2_WT_T; (E) DKO_WT_D e (F) DKO_WT_T. O número de mRNAs regulados em cada processo é mostrado ao lado da respectiva barra. Barras em cinza indicam os processos que são modulados na presença de ambos DMSO e Torin1 no mesmo tipo celular.

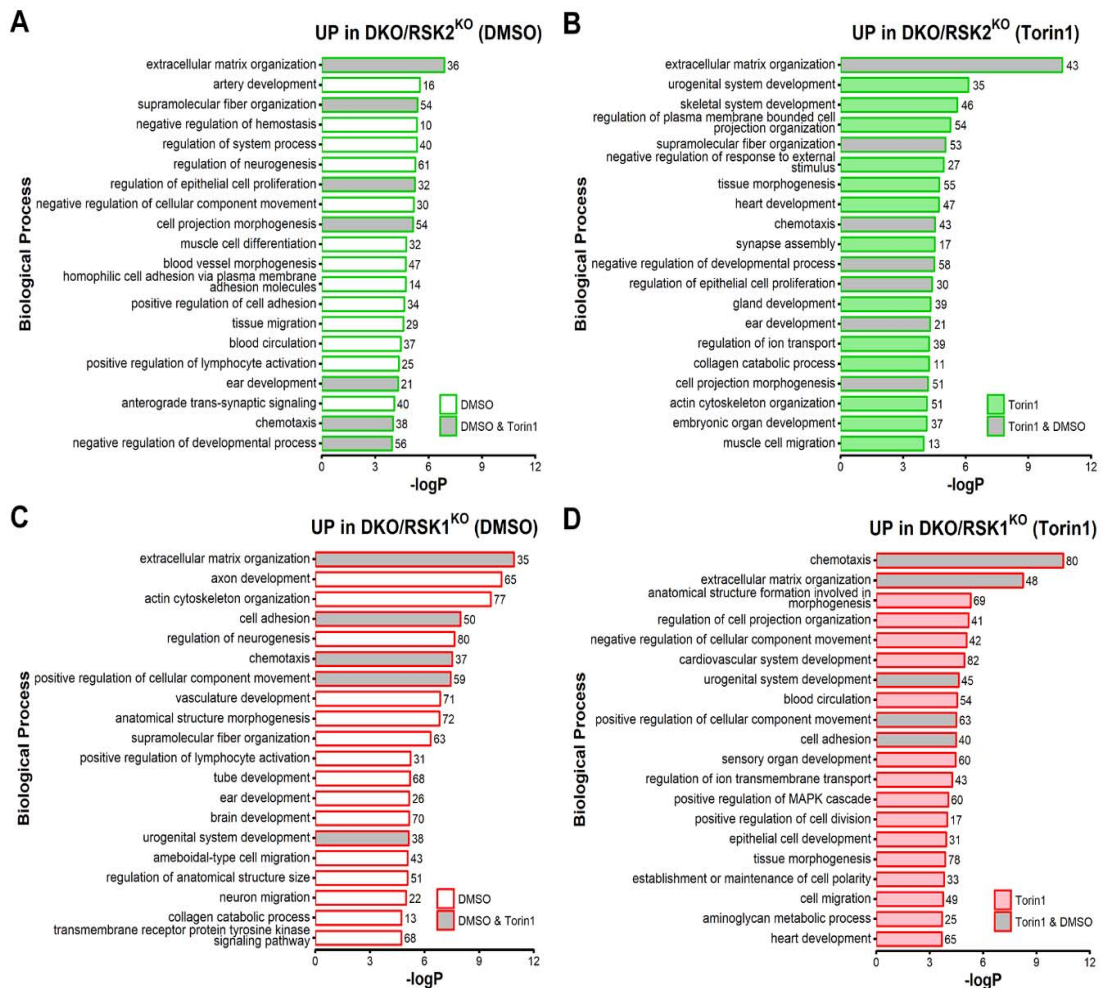


Figura 34 - Processos biológicos enriquecidos devido a perda de isoformas de RSK, relativo às células nocaute individuais. GOSTATS foi utilizado para determinar os processos biológicos associados ao enriquecimento dos mRNAs traduzidos nas seguintes comparações/contrastes: (A) DKO_RSK2_D; (B) DKO_RSK2_T; (C) DKO_RSK1_D e (D) DKO_RSK1_T. O número de mRNAs regulados em cada processo é mostrado ao lado da respectiva barra. Barras em cinza indicam os processos que são modulados na presença de ambos DMSO e Torin1 no mesmo tipo celular.

Dentre os principais processos biológicos alterados nos diferentes contrastes analisados (Figura 35), citamos os processos envolvendo interações entre DNA e proteínas, bem como divisão celular (Figura 35B).

4.7.4 Determinação de Formas de Regulação que Resultam em Mudanças dos mRNAs traduzidos

O pacote *anota2seq* permite a análise da expressão gênica diferencial e classificação desses genes em módulos regulatórios (OERTLIN et al. 2018). Assim, mRNA polissomal (ou mRNAs eficientemente traduzidos) pode ser classificado em tradução (em que a mudança de mRNAs polissomais é mais importante do que a correspondente mudança na transcrição) ou em abundância (em que transcrição e tradução contribuem em níveis comparáveis para a expressão genica). Por sua vez, mRNA total (ou mRNAs que são transcritos) podem ser classificados em abundância ou em *buffering* (“tamponamento”), em que mudanças na transcrição não resultam em mudanças nos níveis de mRNAs traduzidos, o que implica em uma correspondente modulação nas taxas de tradução.

Células $RSK1^{KO}$ tratadas com Torin1 mostraram um número de mRNAs regulados negativamente pela tradução em uma proporção maior do que o dobro daqueles regulados negativamente em células WT (mostrado em verde, nas Figuras 36A e B). Já nas células $RSK2^{KO}$ e DKO, os efeitos da repressão de mRNAs por meio da tradução sob tratamento com Torin1 é bem inferior ao de $RSK1^{KO}$ (mostrado em verde, nas Figuras 36C e D). Dessa forma, tem-se que a isoforma RSK1 seria necessária à regulação da tradução desses mRNAs.

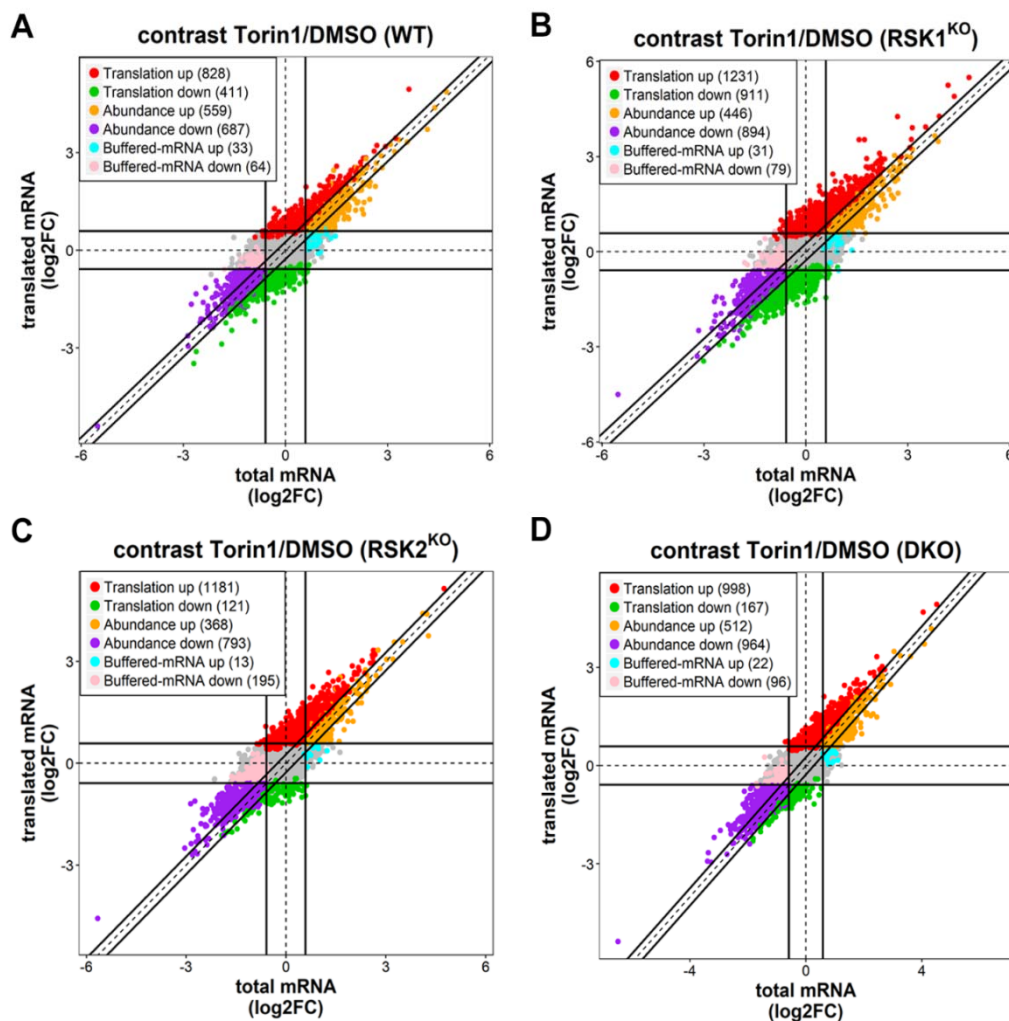


Figura 36 - Classificação dos mRNAs diferencialmente expressos devido ao tratamento com Torin1 nos módulos regulatórios. Foi utilizado o algoritmo Anota2seq para classificar os dados do transloma nos módulos regulatórios. (A) WT_TD; (B) RSK1_TD; (C) RSK2_TD e (D) DKO_TD.

A seguir, analisamos os efeitos da deleção das isoformas de RSK. Em células nocaute tratadas com DMSO, a perda concomitante de ambas as isoformas resulta na repressão, mediada pela tradução, de mais de 2/3 dos mRNAs reprimidos em células nocaute individuais (DKO_WT_D = 1120; RSK2_WT_D = 371; RSK1_WT_D = 217), como observado na Figura 37A - C. Além disso, células sem RSK1 e RSK2 (DKO) mostraram grande redução em mRNAs reprimidos por abundância, quando comparadas a perda das isoformas individuais, o que reforça o possível papel das RSKs como importantes mediadoras da regulação da expressão gênica. O número de

mRNAs regulados negativamente pela tradução em células RSK1^{KO} tratadas com Torin1 foi mais do que 6,5 vezes maior quando comparado com as mesmas células, tratadas com DMSO, o que indica que RSK1 pode regular a tradução quando mTOR está inativo (comparar Figuras 37A e D). O mesmo não foi observado para células RSK2^{KO}, comparando as Figuras 37B e E. Células DKO tratadas com Torin1 mostraram uma diminuição da expressão de mRNAs tanto por tradução, como por abundância em comparação com células selvagens tratadas com Torin1, em níveis semelhantes aos observados com DMSO (Figura 37F), reiterando a importância das RSKs na regulação da síntese de proteínas. A análise dos efeitos das isoformas individuais de RSK por meio da comparação entre os contrastes DKO/RSK2^{KO} (relevância de RSK1) e DKO/RSK1^{KO} (relevância de RSK2) confirma que RSK1 é necessária para a regulação da tradução de mais mRNAs do que RSK2, principalmente quando mTORC1 se encontra inativado (comparar Figuras 38A e B com 38C e D).

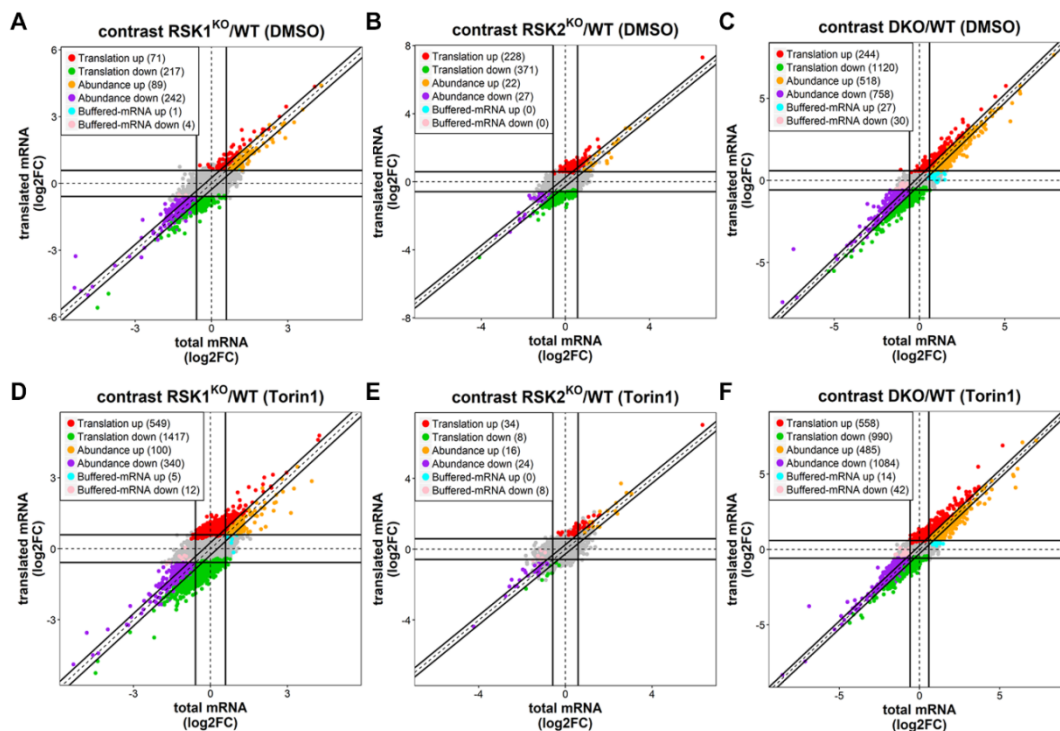


Figura 37 - Classificação dos mRNAs diferencialmente expressos devido a perda das isoformas de RSK, relativo a WT, nos módulos regulatórios. O algoritmo Anota2seq foi utilizado para classificar os dados do translatoema nos módulos regulatórios. (A) RSK1_WT_D; (B) RSK2_WT_D; (C) DKO_WT_D; (D) RSK1_WT_T; (E) RSK2_WT_T; (F) DKO_WT_T.

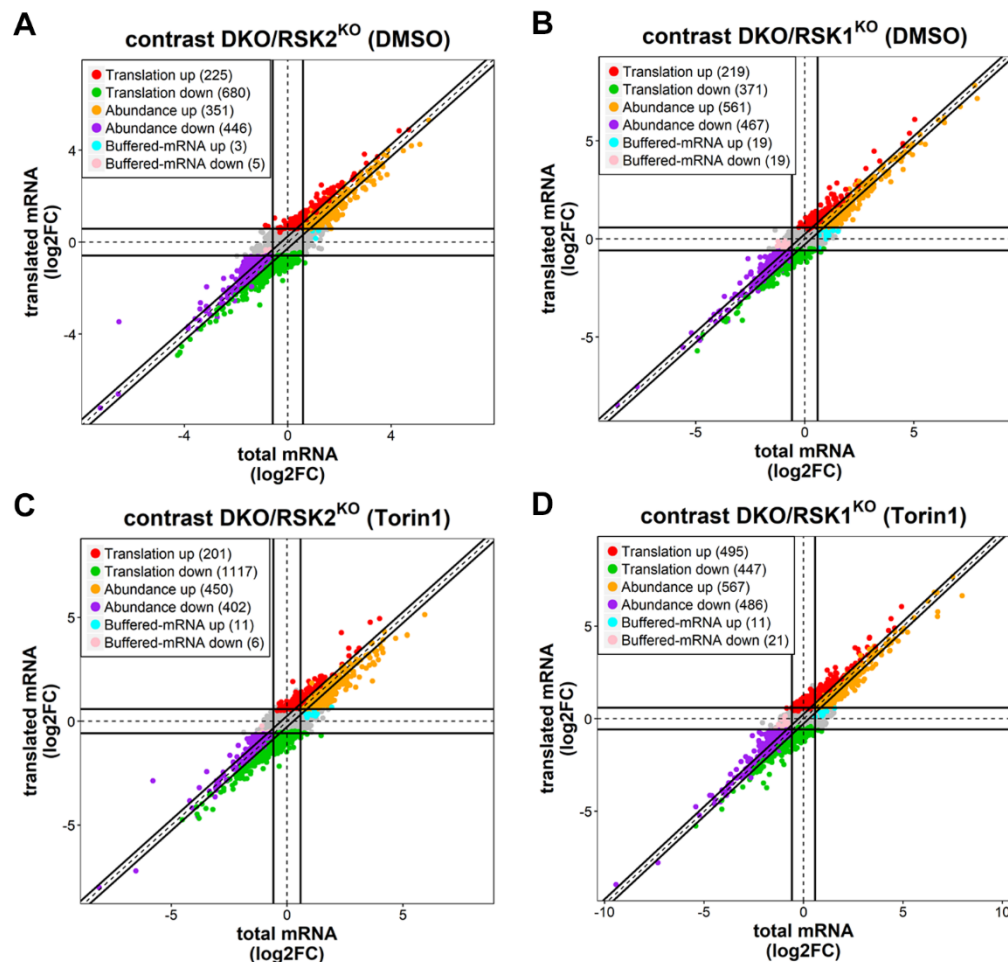


Figura 38 - Classificação dos mRNAs diferencialmente expressos devido a perda das isoformas de RSK, relativo aos nocautes individuais, nos módulos regulatórios. O algoritmo Anota2seq foi utilizado para classificar os dados do translatoema nos módulos regulatórios. (A) DKO_RSK2_D (avalia o efeito da perda de RSK1); (B) DKO_RSK1_D (avalia o efeito da perda de RSK2); (C) DKO_RSK2_T (avalia o efeito da perda de RSK1) and (D) DKO_RSK1_T (avalia o efeito da perda de RSK2).

4.7.5 Definição de módulos de Regulação da Expressão Genica Dependente das Isoformas de RSK

Em seguida, classificamos os mRNAs cuja expressão se modificou nas células nocaute em módulos baseados nas comparações dos Contrastes. Para os mRNAs que foram regulados negativamente (*downregulation* ou reprimidos) pela tradução, observamos que a grande maioria é sensível a perda de RSK1 na presença de Torin1. Na Figura 39A, encontramos que os quatro primeiros módulos (linhas horizontais), que compreendem 1176 mRNAs foram: 1) RSK1_WT_T, 2)

RSK1_TD, 3) RSK1_WT_T e RSK1_TD e 4) DKO_RSK2_T. Em relação aos mRNAs regulados negativamente pela abundância, os módulos que contém mais mRNAs regulados incluem células DKO e, especialmente, comparações entre tratamento com Torin1 *versus* DMSO, como mostrado na Figura 39B. Para exemplificar, na Figura 39B, o quarto módulo é representado pelas comparações de quatro tipos celulares tratados com Torin1, que indica que esses mRNAs são regulados essencialmente por mTOR e não por RSK. Em relação aos módulos que contém mRNAs ativados (*upregulation*) pela tradução, os mesmos são enriquecidos nos contrastes que consideram o tratamento com Torin1 *versus* DMSO e, de forma marcante, o módulo com mais mRNAs é RSK2_TD (Figura 39C), o que indica que perder RSK2 traz consequências diferentes de perder RSK1 (comparar com Figura 39A). Nesse caso, isso significaria que RSK2 tem efeitos associados à repressão da tradução de mRNAs, enquanto RSK1 tem efeitos associados à ativação de outros mRNAs. De maneira interessante, a comparação WT_TD, mas não as RSK1_TD, RSK2_TD ou DKO_TD contém o maior número de mRNAs regulados positivamente por abundância (Figura 39D).

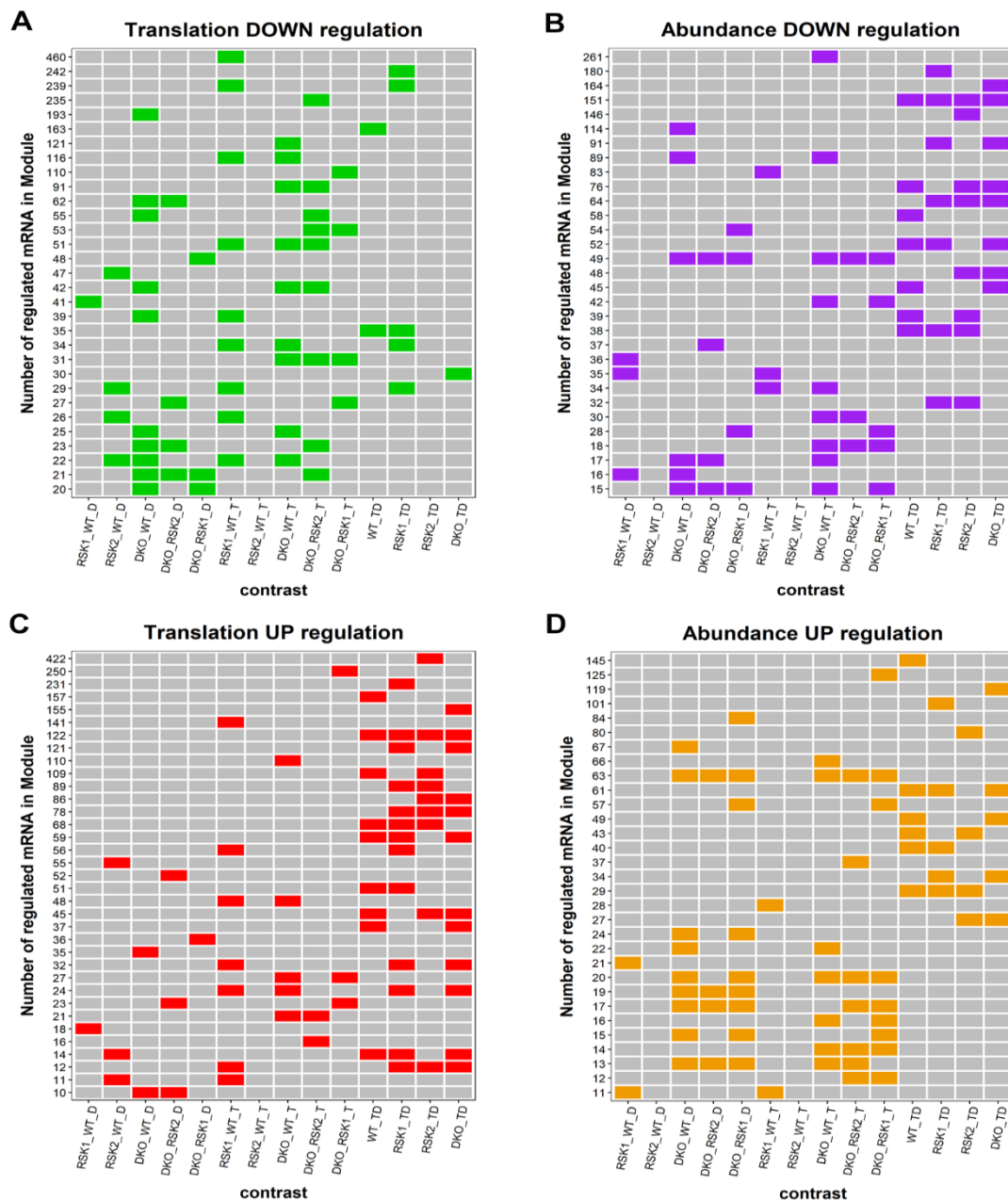


Figura 39 - Definição dos módulos de expressão gênica dependente das isoformas de RSK. Um mRNA é classificado em um módulo com base nos contrastes/comparações nas quais é regulado e nos módulos regulatórios que medeiam essa regulação. (A) Regulação negativa (*downregulation*) por tradução; (B) regulação negativa (*downregulation*) por abundância; (C) regulação positiva (*upregulation*) por tradução e (D) regulação positiva (*upregulation*) por abundância. Os módulos foram ordenados de acordo com o número de mRNAs que os compõem. Os gráficos mostram os 40 primeiros módulos. O número de mRNAs que os compõem estão indicados à esquerda.

4.7.6 Família de Genes são Enriquecidas em Módulos Regulatórios Específicos

Os módulos regulatórios foram verificados com base em famílias de genes conhecidas. Proteínas ribossomais são codificadas por mRNAs que são regulados traducionalmente por mTORC1 e possuem, em sua maioria, motivo 5'TOP. Nas nossas análises, constatamos que a maioria desses mRNAs são regulados negativamente (*downregulation*) pela tradução em células RSK1^{KO} tratadas com Torin1 (segundo módulo da Figura 39A - RSK1_TD), enquanto apenas uma fração é sensível a Torin1 em células WT e RSK2^{KO} (Figura 40A). Isso sugere que RSK1 estaria estimulando a tradução de TOP mRNAs em condições em que mTORC1 está inativo, sugerindo um mecanismo de resistência isoforma-específico.

O efeito de RSK1 nos mRNAs que codificam proteínas ribossomais não foi observado para mRNAs que codificam proteínas ribossomais mitocondriais, como mostrado na Figura 40B. Também observamos que um grupo de mRNAs que codifica a família de proteínas de choque térmico (HSPs) é regulado por abundância de maneira dependente de mTORC1 e independente de RSK, visto que todos os tipos celulares são sensíveis ao tratamento com Torin1 (Figura 40C). Um dos mais inesperados achados desse estudo está relacionado à regulação de mRNAs que codificam histonas. Observamos que a expressão desses mRNAs é claramente dependente de RSK1, mesmo quando mTORC1 está inativado. De forma interessante, a expressão de proteína que se liga ao motivo *stem-loop* de mRNAs de histonas (SLBP) e é responsável por coordenar a biossíntese de histonas e o ciclo celular (MARZLUFF et al. 2008) está reduzida na comparação DKO_WT_T. Surpreendentemente, vimos que a expressão de diversos mRNAs que codificam histonas é regulada positivamente (*upregulation*) sob tratamento com Torin1, apenas na presença de RSK1 (Figura 40D), reforçando os achados das Figuras 30 e 32, além de sugerir que, de fato, RSK1 estaria mediando a tradução desses mRNAs de maneira independente de mTORC1.

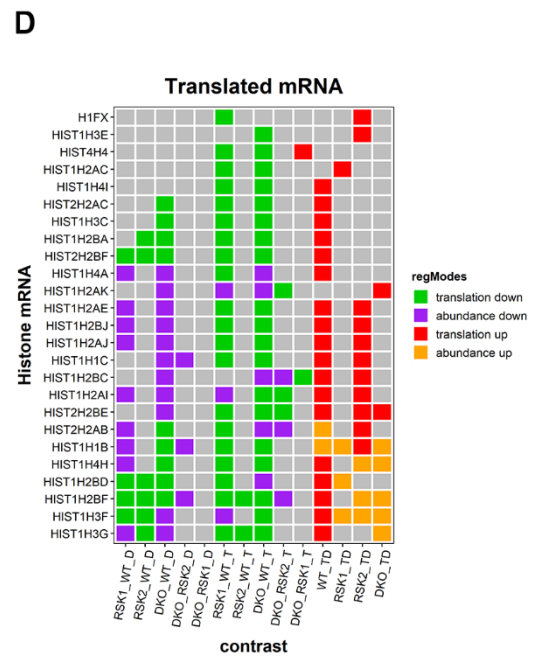
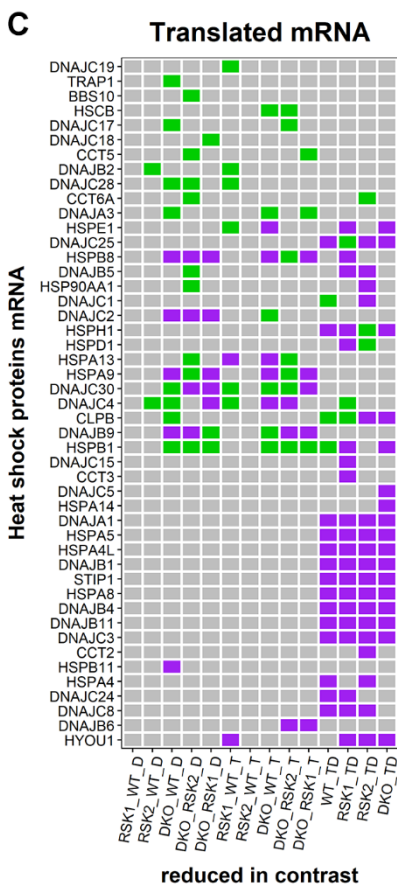
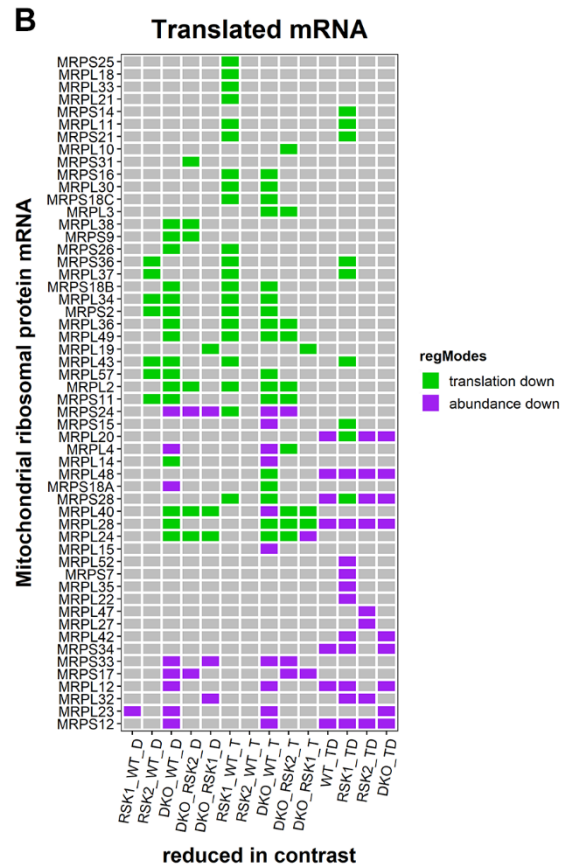
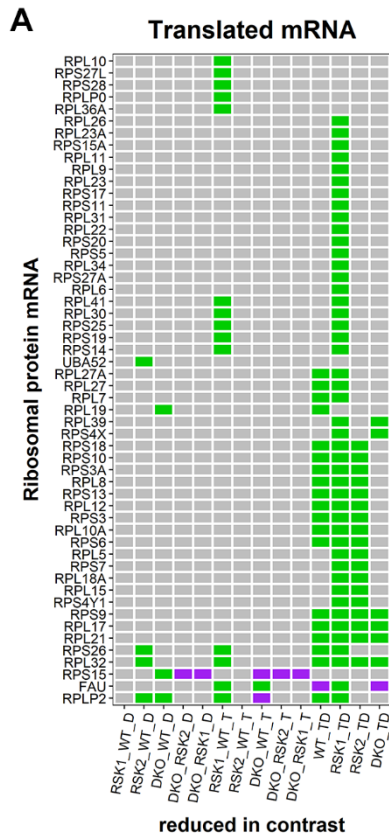


Figura 40 - Análise das famílias de genes nos módulos regulatórios relacionados à RSK. Famílias de genes, definidas pelo HGNC, foram analisadas de acordo com suas regulações nos contrastes. Para as seguintes famílias: **(A)** proteínas ribossomais; **(B)** proteínas ribossomais mitocondriais e **(C)** proteínas de choque térmico (o gene relacionado STIP1 foi incluído), todos os mRNAs que são regulados negativamente em ao menos um contraste/comparação foram incluídos. Para a família de histonas **(D)**, os mRNAs regulados positiva (upregulation) e negativamente (downregulation) nos contrastes/comparações foram incluídos.

4.8 O PAPEL DE RSK NA PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS NOCAUTE

Neste trabalho, também buscamos avaliar a proliferação celular das células nocautes para RSKs. Os resultados da transcriptômica indicaram que a perda de RSK1 estava associada com uma menor expressão de genes relacionados com ciclo celular. Além disso, visto que RSKs podem controlar a proliferação celular de maneira indireta (por meio da modulação de fatores de transcrição) ou direta, investigamos os efeitos da perda das diferentes isoformas das RSKs em relação à proliferação celular, medindo a incorporação de BrdU. Tendo em vista o possível envolvimento da regulação pelas RSKs da via de mTORC1, usamos Torin1 para determinar os efeitos dependentes e independentes dessa regulação. A ausência das isoformas RSK1, RSK2 e o duplo nocaute não alterou significativamente a proliferação celular (Figura 41). Observamos uma tendência para menor proliferação das células nocaute, que, contudo, não foram estatisticamente significativas. A falta de significância obtida está relacionada, presumivelmente, ao número insuficiente de experimentos realizados. De maneira interessante, no trabalho de dissertação de Soares (2016), foi observado que o crescimento de células selvagens era maior do que o das células nocaute de RSK após o sexto dia de crescimento. Assim, de forma complementar àquele estudo, nossos dados reforçam a possível existência de uma deficiência na proliferação das células nocaute de RSK.

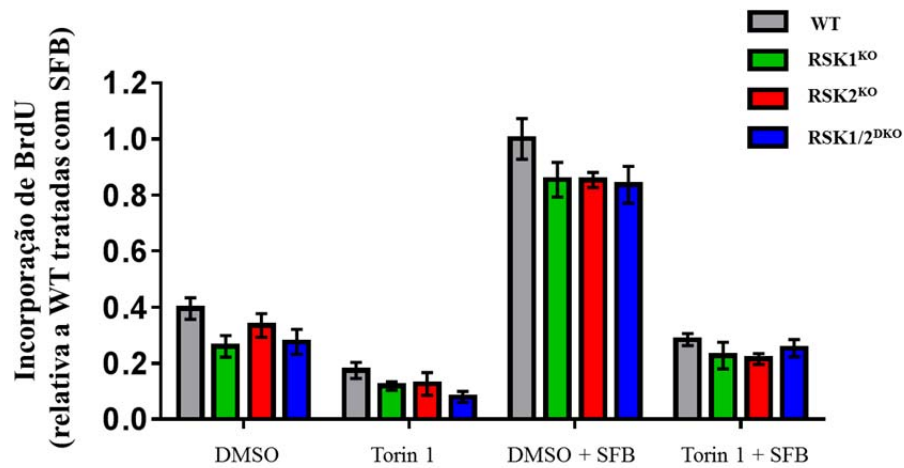


Figura 41 - Ensaio de proliferação nas células LN-18 nocautes para as RSKs. Os valores de absorbância obtidos foram relativizados para as células WT incubadas com veículo (DMSO) e SFB. O gráfico representa a media \pm SEM de ao menos 3 experimentos por condição. Não observamos diferenças significativas entre as células WT e as células nocautes para as diferentes condições.

5 DISCUSSÃO

Devido à necessidade iminente de se fornecer um tratamento individualizado aos pacientes com GBMs, diversos estudos buscaram caracterizar esses tumores a nível celular e molecular. Nesse sentido, são desenvolvidos inúmeros trabalhos, que visam à compreensão da biologia tumoral de GBMs e estudos clínicos, que buscam a incorporação dos achados biológicos em novas abordagens terapêuticas. Somado a isso, as análises provenientes dos dados do TCGA e de outras análises de larga escala demonstraram que GBMs são tumores altamente heterogêneos a nível molecular e podem ser subclassificados em diferentes entidades biológicas, de acordo com as alterações moleculares relacionadas à tumorigênese e progressão tumoral. No entanto, apesar de todos esses esforços, até o momento, muito pouco foi levado para a clínica e aos pacientes, tanto no que se refere à determinação de fatores preditivos sólidos que melhorassem o processo de tratamento, como na própria definição de novos tratamentos. Assim, a linha de tratamento padrão dos pacientes com GBM permanece a mesma.

A desregulação de diversas vias de transdução de sinal em GBMs sugere que a utilização de inibidores de quinases tem potencial para o tratamento da doença. Contudo, o insucesso do tratamento com Everolimus (análogo da rapamicina), droga que inibe mTORC1, em ensaios clínicos de fase II, como “NCCTG N057K” e “NRG Oncology RTOG 0913” (publicado por CHINNAIYAN et al. 2018) mostrou o contrário. A falha da utilização de drogas como o Everolimus se deve, principalmente, a mecanismos de resistência que as células adquirem ao tratamento. Uma vez que as RSKs possuem uma posição estratégica entre as vias Ras/ERK e mTORC1, essa família de quinases poderia estar envolvida na mediação de mecanismos de resistência a tratamentos que inibem mTOR.

O envolvimento das RSK tem sido descrito em diversos trabalhos como sendo importante para o contexto da biologia tumoral de diversas neoplasias. No entanto, os estudos em GBMs são escassos e devem ser interpretados com cautela, já que não utilizam modelos ideais para estabelecer funções específicas de cada isoforma de RSK. Através da técnica de RPPA (*reverse-phase protein array*)

provenientes do TCGA para GBMs, foi indicado que a fosforilação de RSK1 no resíduo Thr359/Ser363 é maior no grupo mesenquimal em relação ao proneural (BRENNAN et al. 2013). Contudo, dados dos nossos estudos indicam que deve-se tomar cuidado com a interpretação de experimentos nos quais são utilizados anticorpos que detectam as RSK, visto que a alta homologia entre as isoformas dificulta a correta interpretação dos achados. Já no estudo de SULZMAIER et al. (2016), no qual foi descrito o envolvimento de RSK2 nos processos de migração e invasão, foi utilizado o inibidor de RSK não específico BI-D1870 (ROFFÉ et al. 2015). Além disso, o estudo mencionado tenta demonstrar efeitos isoforma-específicos através do silenciamento das isoformas RSK1, RSK3 e RSK4. No entanto, na linhagem celular escolhida, os níveis dessas 3 isoformas mostram-se extremamente baixos ou indetectáveis, quando comparados a outras células utilizadas no mesmo estudo. Dessa maneira, esses resultados adicionam mais confusão na literatura relacionada com as RSKs.

Dados prévios do nosso grupo mostram que existe uma grande variabilidade nos níveis de RSKs em linhagens celulares de GBM, o que sugere a necessidade de determinar no que essas diferenças implicariam às células tumorais. Dado que a via de mTORC1 é uma das principais reguladoras da tradução de mRNA e o papel das RSK nesse processo não é bem estabelecido em GBM, esse estudo focou na determinação do impacto da depleção das isoformas RSK1 e RSK2 para a regulação da síntese de proteínas relevantes ao desenvolvimento e manutenção tumoral na ausência de sinalização via mTOR. O fato das isoformas RSK3 e RSK4 estarem praticamente ausentes nas linhagens celulares de GBM estudadas foi fundamental para obter células que não expressam membros da família das RSKs (células DKO).

As vias Ras/ERK e PI3K/AKT/mTORC1 possuem uma relação bastante íntima, na qual, em geral, inibidores de uma via ativam a outra através de um mecanismo de ativação cruzada (MENDOZA et al. 2011). Além dos mecanismos regulatórios de ativação e inibição cruzados, as vias podem convergir em termos de substratos e processos que regulam. Essas formas de *crosstalk* entre as vias estão associadas às falhas nas terapias com rapálogos, por exemplo (GRZMIL e HEMMINGGS 2013). De maneira curiosa, neste estudo vimos que o tratamento com Torin1 induziu regulação positiva de mRNAs associados a processos relacionados à

cascata das MAPK (regulação e ativação, Figura 32A), apenas em células WT. Visto que não observamos o mesmo efeito nas células nocaute, acreditamos que as RSKs desempenhem um papel essencial como mediadores de mecanismo de *feedback* e *crosstalk* entre as cascatas das MAPK e PI3K/AKT na linhagem LN-18. De fato, RSK2 possui um papel na regulação do *feedback* negativo da via das MAPK por meio da fosforilação SOS em dois sítios (a saber, Ser1134 e Ser1161) e consequente recrutamento de 14-3-3 (DOUVILLE e DOWNWARD 1997; SAHA et al. 2012).

Em relação à convergência das vias em direção à regulação da síntese de proteínas, um potencial elo ocorreria a partir da fosforilação de tuberina (TSC2) no resíduo Ser1798 por RSK (Figura 3). Nossos achados mostram que, de maneira relevante, a fosforilação de TSC2 depende, principalmente, da isoforma RSK1. Contudo, essa fosforilação não afeta proteínas efetoras da via, como rpS6 e 4E-BP1 (Figura 19). Isso indicaria que o *crosstalk* entre as vias não se dá por intermédio dessa fosforilação e reforça a relevância de buscar compreender como ocorre a regulação entre as mesmas no que diz respeito à regulação da tradução. Por outro lado, de maneira interessante, a fosforilação do fator de início da tradução eIF4B em Ser422, que pode ser mediada tanto por RSK como pelo eixo mTORC1/S6K, teve sua ativação praticamente eliminada nas células RSK1/2^{DKO} (Figura 20). Esse achado se soma aos do estudo de ROFFÉ et al. (2015), no qual foi observado que a fosforilação de eIF4B em Ser422 é resistente ao tratamento com o inibidor de mTORC1, rapamicina. Isso sugere que a atividade de eIF4B é dependente de RSK nas células que tem alta expressão de RSK1, ou seja, sugerimos que o eixo ERK/RSK seja mais importante que mTORC1/S6K para a ativação de eIF4B nas células LN-18. Esse achado é bastante relevante, já que a definição de qual eixo seria mais importante para a ativação de eIF4B não é bem estabelecida na literatura (VAN GORP et al. 2009). Além disso, nossos achados estão de acordo com os trabalhos que reportam diferentes sensibilidades à fosforilação de eIF4B em diferentes tipos celulares, quando mTORC1 é inibido (CEN et al. 2014; DEGEN et al. 2013). Isso é interessante, tendo em vista que a regulação da tradução de diferentes mRNAs pode ocorrer em diferentes níveis (Figura 6). Por exemplo, mRNAs com regiões 5' UTR complexas e longas, requerem maior atividade helicásica de eIF4A e, conseqüentemente, de acordo com nossos achados, da fosforilação de eIF4B por

RSK nessas células. Dessa forma, sugerimos a possibilidade de que as RSKs controlem processos celulares importantes relacionados a mecanismos de resistência à inibição de mTORC1. Nesse caso, portanto, existe a possibilidade de que parte da resistência ocorra por meio da regulação da tradução de mRNAs com regiões 5' UTR complexas e longas de forma dependente de eIF4B e independente de mTORC1.

Visto que RSKs estão envolvidas na regulação da síntese de proteínas, investigamos qual seria a contribuição das mesmas na regulação da tradução de mRNAs de forma dependente ou independente da via de mTORC1, por meio da translátômica das células nocaute. Dado que o inibidor catalítico de mTOR, Torin1, afeta a síntese proteica em graus muito mais altos do que os observados com o tratamento com o inibidor alostérico, rapamicina (Figuras 21 e 23) (THOREEN et al. 2012), optamos pela utilização de Torin1 nos nossos estudos. De maneira interessante, apesar de inibir ambos os complexos de mTOR (mTORC1 e mTORC2), os efeitos de Torin1 nesses processos são independentes de mTORC2 (THOREEN et al. 2009). Assim, os efeitos de Torin1 são causados principalmente pela inibição das funções de mTORC1 nos processos de tradução de mRNAs dependentes de cap e de autofagia (consideradas, pela literatura, como sendo funções de mTORC1 resistentes à rapamicina) (THOREEN et al. 2009).

Uma vez que mTOR modula a síntese de proteínas tanto de forma global, como por meio da tradução de transcritos específicos, buscamos compreender a que nível a ausência das RSKs, juntamente com a inibição de mTOR afetaria a tradução. Assim, obtivemos os perfis polissomais das células aplicando a técnica de gradiente não linear, que otimiza etapas posteriores, como a extração de mRNA polissomal, e torna mais eficiente a quantificação e identificação dos transcritos. Observamos que a ausência das RSKs nas células RSK1/2^{DKO} mostra uma deficiência da síntese proteica de forma global, sendo que essa deficiência é ainda mais evidenciada sob o tratamento com Torin1 (Figura 24G). Isso nos leva a sugerir que, de forma importante, as RSKs podem estar envolvidas na diminuição nos níveis de tradução de formas dependente e independente de mTOR.

Por meio da análise dos dados obtidos de microarranjos, percebemos, inicialmente, por meio da análise de componentes principais, que a perda de ambas isoformas de RSK impacta fortemente no transcriptoma e translátoma de células LN-

18 e que, além disso, a perda de RSK1 tem efeitos mais proeminentes do que a perda de RSK2 (Figuras 27 e 28). Assim, a inativação de mTORC1 nas células RSK1^{KO} promove a diminuição da tradução de aproximadamente 1500 mRNAs, no entanto, em células WT e RSK2^{KO}, a Torin1 não demonstrou o mesmo efeito, sugerindo que RSK1 seria responsável por manter a tradução desses ~1500 mRNAs, mesmo quando mTORC1 está inativo (comparar Figuras 27D e E). Em todo o caso, é importante mencionar que em um estudo prévio do grupo (dados não publicados), foi demonstrado que a linhagem LN-18 possui níveis proteicos de RSK1 três vezes maiores do que de RSK2 (Figura 42). Essa observação é relevante, pois pode estar relacionada aos efeitos observados da depleção das RSKs nessa linhagem. Dessa forma, os altos níveis existentes de RSK1 poderiam indicar que essa isoforma desempenhe funções importantes em LN-18. Somado a isso, de maneira relevante, confirmamos que a depleção de RSK1, de RSK2 e de ambas as isoformas evidencia funções importantes e não redundantes das mesmas. Podemos citar como exemplo os efeitos sobre a modulação da regulação de mRNAs por RSK1 e RSK2. No caso de RSK2, a isoforma parece ser mais importante na repressão da tradução de grupos de mRNAs, sendo que RSK1 não tem esse mesmo efeito (Figuras 28H - J). Isso é visto, por exemplo, no caso da regulação de processos de desenvolvimento vascular por RSK2 (Figuras 32C e D) e de mRNAs relacionados com o ciclo celular por RSK1 (Figuras 30B, D e F).

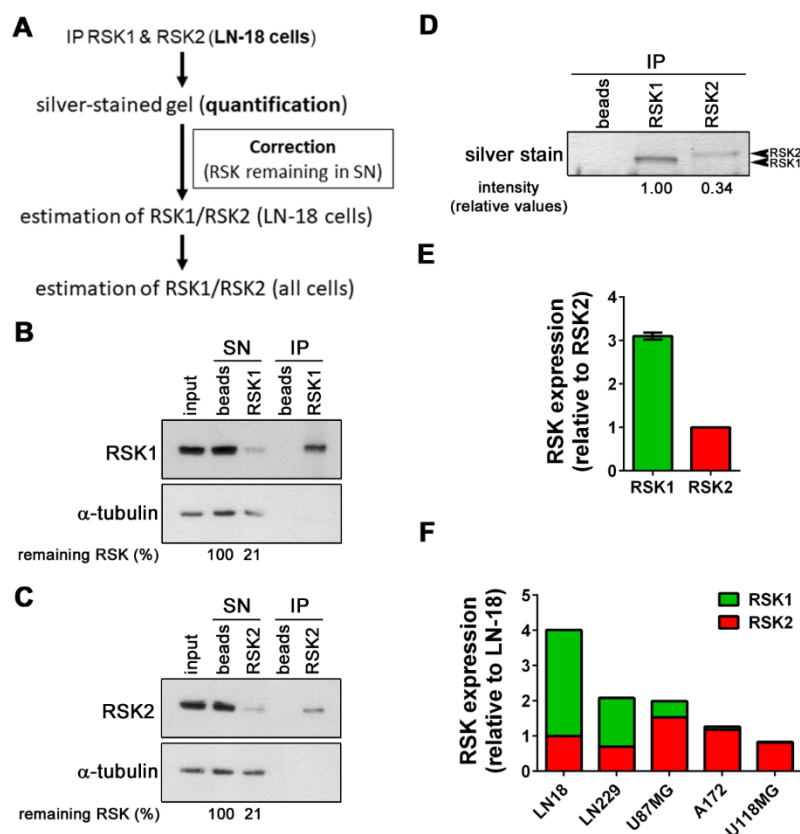


Figura 42 - Quantificação dos níveis das RSKs em linhagens comerciais de GBM. Para estimar a quantidade de cada uma das RSKs expressas em células de GBM (RSK3 e RSK4 não são detectadas), RSK1 e RSK2 foram imunoprecipitadas de extratos de células LN-18 e as proteínas imunoprecipitadas foram coridas num SDS-PAGE com posterior coração por prata para estabelecer a quantidade relativa de moléculas de RSK2 em relação à RSK1. (A) esquema do desenho experimental. (B) IP de RSK1 e (C) RSK2. As percentagens de RSK que permaneceram no sobrenadante (SN) foram usadas para corrigir os níveis de RSKs. (D) Gel corado com prata demonstrando a quantidade das isoformas imunoprecipitadas. (E) quantificação das isoformas imunoprecipitadas após a correção pela proteína que permaneceu no SN. (F) Estimação da quantidade de RSK1 e RSK2 nas diferentes linhagens de GBMs usadas a partir dos dados de IP e do experimento mostrado na Fig. 12. **Dados do grupo.**

Apesar das dificuldades de se estabelecer funções isoforma-específica de RSKs e das diferenças funcionais dos papéis das isoformas em diferentes tumores, a literatura reporta sobre o papel das RSKs na mediação do controle do ciclo celular (CLARK et al. 2005; BIGNONE et al. 2007; CHO et al. 2007). Em modelo de câncer de mama triplo-negativo (TNBC), foi proposto que a tradução de mRNAs envolvidos no ciclo celular ocorresse por meio da regulação negativa de PDCD4 por RSK e

consequente modulação de eIF4F (CUESTA e HOLZ 2016). Nossos resultados mostram que processos relacionados tanto com a divisão como ciclo celular são regulados negativamente em células RSK1^{KO} e DKO, mas não em células RSK2^{KO} (Figuras 30B, D e F), o que indica fortemente que RSK1, mas não RSK2 regule essas funções através da tradução de mRNAs, que dependem da atividade de mTORC1 e também daqueles que são independentes. (Figura 30A e B). Paradoxalmente, a inibição da via de mTOR implica na ativação de diferentes mRNAs associados a divisão e ciclo celular em células que não possuem RSK1 (nos contrastes RSK1_TD e DKO_TD, Figuras 32B e D), o que sugere a existência de um modelo complexo de regulação desses processos por RSK1 e mTOR. Esse tipo de regulação complexa é bem exemplificado no caso da tradução de mRNAs de histonas, de acordo com nossos resultados. Os mRNAs de histonas não possuem cauda poli-A na região 3', mas sim uma sequência de 26 nucleotídeos que contém um motivo denominado *stem-loop* de 16 nucleotídeos (MARZLUFF 1992; DOMINSKI e MARZLUFF 2007). Essa região 3' dos mRNAs de histonas é importante para sua localização nos polissomos e os mRNAs que contém o motivo *stem-loop* apresentam a tradução tão eficiente quanto a dos que possuem cauda poli-A (SUN et al. 1992; GALLIE et al. 1996). A proteína SLBP, que se liga a esses motivos, é importante para o processamento, exportação nuclear, tradução e degradação de mRNAs de histonas (MARZLUFF e KORESKE 2017) e é fortemente regulada durante o ciclo celular (WHITFIELD et al. 2000). SLBP atua estimulando a iniciação da tradução por meio da interação com eIF4GI, o que facilita a circularização dos mRNAs e promove a tradução (CAKMAKCI et al. 2008). A literatura reporta que mRNAs que codificam histonas tem a tradução resistente ao tratamento com Torin1, o que significa que esses mRNAs utilizam modos de iniciação da tradução que não dependem da atividade de mTOR (MARTIN et al. 2011; THOREEN et al. 2012). Nossos achados corroboram esses fatos já que, como visto na Figura 40D, nota-se que a expressão de mRNAs que codificam histonas é claramente dependente de RSK1, mesmo quando mTORC1 está inativado e que, além disso, a presença de RSK1 medeia a tradução desses mRNAs em células tratadas com Torin1.

Outro processo que a literatura aponta ser mediado por RSKs é a migração celular (LARA et al. 2011; GAWECKA et al. 2012; ABDULRAHMAN et al. 2016;

CUESTA e HOLZ 2016). Nossos resultados apontam que a perda de RSK está associada ao enriquecimento de processos como adesão celular, migração e matriz extracelular (Figuras 33 e 34). Esse resultado está de acordo com o que diz respeito ao comportamento proliferativo e invasivo de GBMs. Ensaios *in vitro* com astrocitomas mostraram que dada uma população de células tumorais que estão em processo de migração, a frente de células migratórias apresentam menores taxas de proliferação, em comparação com o centro proliferativo (GIESE et al. 1996, 2003). Assim, do ponto de vista da biologia das células, dada a correlação inversa entre proliferação e motilidade, isso é coerente com nossos achados, visto que os efeitos de RSK são importantes no que diz respeito a regulação ciclo celular. Além disso, apesar de não termos obtido dados estatisticamente significativos em relação à proliferação das células nocaute (Figura 41), a proliferação das células RSK1^{KO}, RSK2^{KO} e DKO parece ser menor, comparadas às WT. Cabe pontuar aqui que, de maneira contrária aos nossos achados, os estudos realizados *in vitro* em GBM reportaram uma possível função de RSK2 na diminuição da motilidade e invasão, contudo, novamente, grande parte dos achados baseiam-se no uso do inibidor BI-D1870 *in vitro*, o que leva ao questionamento sobre o real papel da isoforma nos processos descritos (SULZMAIER et al. 2016; SHI et al. 2018).

De maneira importante, a análise por meio do anota2seq permitiu a identificação de diferenças na eficiência traducional dentre as condições experimentais deste estudo. É importante ressaltar que mudanças na eficiência traducional podem ou não impactar na alteração dos níveis proteicos. Assim, podem existir mRNAs regulados a nível de abundância (ou seja, aqueles cujas mudanças nos níveis totais e polissomais são proporcionais), de eficiência traducional que afeta níveis proteicos (ou seja, aqueles mRNAs que se alteram mais nos polissomos em relação aos totais) e aqueles cujos níveis proteicos não se alteram independentemente do nível de mRNA total, denominado de efeito *buffering* (ou “tamponamento traducional”), que é a situação na qual níveis dos mRNA associados a polissomos são inalterados, apesar das mudanças nos níveis de mRNA total. O “tamponamento traducional” é um mecanismo que desacopla os níveis de mRNA dos níveis de proteínas, o que significa, a nível biológico, que a tradução pode ser alterada como mecanismo compensatório para manter níveis proteicos constantes quando o nível de

mRNA muda. O tamponamento traducional foi inicialmente identificado em fungos (ARTIERI e FRASER 2014; MCMANUS et al. 2014) e tem sido observado em um pequeno conjunto de modelos de mamíferos (CENIK et al. 2015; JOVANOVIĆ et al. 2015). Assim, acredita-se que esse mecanismo, apesar de ser frequentemente negligenciado, pode funcionar como um meio pelo qual as células mantêm homeostase dos níveis proteicos, apesar das mudanças na expressão de mRNA. Isso está de acordo com estudos que mostram que os níveis de proteínas, mas não de mRNAs, são mais coerentes entre diferentes espécies (SCHRIMPF et al. 2009; LAURENT et al. 2010). Nossos dados mostram que o mRNA de *COX17*, que codifica a proteína *cytochrome c oxidase copper chaperone* (ou COX17) é regulado por “tamponamento traducional” nas células tratadas com Torin1 e que não possuem RSK. Mais especificamente, a isoforma RSK1 parece ser importante nessa regulação, já que observamos diminuição da expressão de *COX17* nos contrastes DKO_WT_T (ou seja, em comparação às células WT na presença de Torin) e DKO_RSK2_T (ou seja, indicando o efeito da perda de RSK1 na ausência de RSK2). COX17 é uma proteína que compõe a cadeia de transporte de elétrons, sendo necessária à montagem da enzima citocromo c oxidase (MOIRA GLERUM et al. 1996). De maneira interessante, estudos utilizando fungos, mostraram que Puf3, uma proteína que se liga preferencialmente a mRNAs que codificam proteínas mitocondriais, estimula a poliadenilação e degradação do mRNA de *COX17*, porém essa degradação não foi associada à diminuição dos níveis proteicos de COX17 (FOX 2012; KERSHAW et al. 2015). Assim, nossos resultados indicam que as RSKs possam estar envolvidas no mecanismo de manutenção dos níveis de COX17 nas células, quando mTORC1 está inativo.

De maneira consistente, nossos dados mostram que as células RSK1^{KO} tratadas com Torin1 apresentam mais mRNAs regulados negativamente pela tradução do que células WT, RSK2^{KO} e DKO (Figuras 36 - 38), o que sugere que RSK1 induza um mecanismo compensatório para manter níveis traducionais de numerosos mRNAs inalterados quando mTORC1 é inibido. Ainda, a exploração dos dados por meio da definição de módulos regulatórios nos permitiu analisar quais contrastes eram relevantes nas análises de mRNAs regulados por abundância ou tradução. Dessa forma, confirmamos que a grande maioria dos mRNAs regulados

negativamente pela tradução é, de fato, sensível à perda de RSK1 quando a via de mTOR está inibida (Figura 39A), ou seja, são modulados por RSK1. Por outro lado, a perda de RSK2 mostrou efeitos diferentes (Figura 39C). Nas células RSK2^{KO} com inativação de mTOR, observam-se mRNAs regulados positivamente a nível traducional, ou seja, que são mais traduzidos na ausência de RSK2 (sensíveis a RSK2), o que indicaria que RSK2 esteja envolvido em algum mecanismo de inibição da tradução desses mRNAs. Esses resultados são importantes, pois reforçam que as isoformas não são redundantes e regulam a tradução de mRNAs de formas diferentes.

Em contrapartida aos mRNAs que codificam a família das HSP que são regulados por abundância está o mRNA de *HSPB1* (ou *HSP27*) (Figura 40C). Nossos dados mostram que o mRNA de *HSPB1* é regulado negativamente por tradução nos contrastes que envolvem células DKO e inibição de mTOR. *HSPB1* codifica a proteína HSP 27, responsável por regular dinâmica da actina e é encontrada superexpressa em diversos cânceres (MIRON et al. 1991; ZHANG et al. 2007). HSP 27 tem a atividade regulada pela fosforilação em diversos sítios, sendo que essas fosforilações se correlacionam com migração e invasão tumoral (SHIN et al. 2005). Em linhagens de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, foi visto que a fosforilação de HSP 27 por RSK2 confere às células um fenótipo invasivo, por meio da estabilização de filamentos de actina (KANG et al. 2010). Assim, além da possibilidade de RSKs regularem a atividade de HSP 27 através de sua fosforilação, a modulação da tradução de *HSPB1* em si parece ser dependente de RSK, em LN-18.

Interessantemente, processos que envolvem proteínas ribossomais, como “iniciação da tradução”, foram encontrados enriquecidos em células RSK1^{KO} na presença de Torin1 (Figura 29B). A posterior análise dos módulos regulatórios mostrou que, de fato, em condições de depleção de RSK1 na presença de Torin1 (inativação de mTOR), foram encontrados reduzidos diversos mRNAs que apresentam na região 5'UTR o motivo definido pela presença de uma sequência de oligopirimidinas na região 5' terminal (TOP), dentre os quais se encontram proteínas ribossomais (RPs) (Figura 40A) (JEFFERIES et al. 1994; HSIEH et al. 2012; THOREEN et al. 2012). De forma interessante, apenas alguns desses mRNAs para RPs foram encontrados reduzidos em células selvagens ou células RSK2^{KO}, o que

indica fortemente que nas células LN-18, RSK1, mas não RSK2, pode regular 5'TOP mRNA quando mTORC1 está inativado, o que é uma observação inesperada, inédita e muito importante do ponto de vista de controle da tradução. mRNAs de RPs são altamente transcritos em organismos eucariotos, sendo a tradução dos mesmos fortemente regulada, a fim de se minimizarem gastos energéticos desnecessários. A presença do motivo TOP na maioria desses mRNAs atua como um mecanismo regulatório em cis que controla sua tradução de forma co-regulada que garante a estequiometria do processo traducional. A via de mTORC1 já foi amplamente descrita na literatura por regular a tradução de RP mRNAs (HSIEH et al. 2012; FONSECA et al. 2014). Curiosamente, apesar do controle traducional exercido pelos alvos de mTORC1, 4E-BPs e S6Ks, essas proteínas não são suficientes para a regulação direta dos TOP mRNAs, sendo o alvo recentemente descrito de mTORC1, LARP1, o principal candidato a ser a responsável pela modulação da tradução dos mesmos (FONSECA et al. 2015; PHILIPPE et al. 2018).

A compreensão do modelo da regulação da tradução de TOP mRNAs por LARP1 é complexa e relevante ao nosso estudo. Alguns estudos recentes relacionam a proteína LARP1 com o controle da tradução de TOP mRNAs, bem como à estabilidade dos mesmos. No trabalho de TCHERKEZIAN et al. (2014), os autores encontram que LARP1 é recrutada aos mRNAs por meio de interações com fatores de tradução, incluindo PABP, e argumentam que LARP1 estimula positivamente a síntese proteica global e a tradução de TOP mRNAs. Já o trabalho de Fonseca et al. (2015), na direção oposta, propõe que LARP1 reconhece a região 5' de TOP mRNAs e reprime sua tradução por impedir a formação do complexo eIF4F (FONSECA et al. 2015). O racional que justifica os achados controversos dos estudos pode ser justificado pelas condições experimentais utilizadas em cada um deles. Assim, na situação em que mTORC1 está ativado (TCHERKEZIAN et al. 2014), TOP mRNAs são, presumivelmente, traduzidos de forma máxima e, nessas condições LARP1 fosforilado e inativo deixa de competir com eIF4E pela união dos mRNAs. Diferentemente da condição de inibição de mTORC1, nas quais a função regulatória de LARP1 se tornaria imediatamente visível, a perda de LARP1 teria apenas efeitos mínimos nas taxas de tradução de TOP mRNAs. Dessa maneira, a função de LARP1 na regulação positiva da tradução de TOP mRNAs observada por TCHERKEZIAN

et al. (2014) pode ser resultante da maior estabilidade deles, de forma dependente de LARP1. Já o outro modelo (FONSECA et al. 2015), proposto quando existe inibição de mTORC1, depende do reconhecimento por LARP1 tanto do motivo 5' TOP, como da região 5' m⁷Gppp *cap* e tem início com o rompimento da interação de eIF4F com a terminações 5' do mRNA e subsequente recrutamento de LARP1, que resulta na repressão da tradução de TOP mRNAs. Uma vez que nossos dados apontam para o fato de RSK1 estar relacionado à mediação da resistência ao tratamento com Torin1 e tendo em vista a resistência dos TOP mRNAs ao tratamento com Torin1 em células DKO, temos indícios da existência de um mecanismo diferente de regulação de TOP mRNAs. Esse mecanismo seria dependente de um regulador negativo de sua tradução, que deve ser inibido por RSK1 e/ou mTORC1 e que está agindo em células DKO, as quais não demonstram uma inibição considerável de TOP mRNAs. Um modelo que propomos para isso inclui a presença de um inibidor da tradução dos 5'TOP mRNA, que tem que ser inibido por RSK1, e que nas células DKO é perdido, desreprimindo a tradução desses mRNAs numa maneira independente de RSK1. O papel de LARP1, como descrito acima, encaixa-se nesse papel e é um potencial candidato para executar essa função. LARP1 é uma proteína grande com vários sítios que podem ser fosforilados, sendo que alguns deles tem uma sequência consenso para ser um substrato direto das RSKs (GALAN et al. 2014).

De maneira pertinente, ressaltamos que nosso estudo enfatiza a necessidade de analisar os mRNAs polissomais, visto que grande parte das informações que obtivemos que não estão contidas apenas na análise dos mRNAs transcritos (mRNA total), mas sim na de mRNAs eficientemente traduzidos, ou seja, seria perdida caso a análise tivesse sido realizada por transcriptômica.

6 CONCLUSÃO

Este trabalho permitiu inferir algumas funções específicas das RSKs na linhagem LN-18. A isoforma RSK1 parece ser responsável pela fosforilação de TSC2 no resíduo Ser1798, no entanto, a maior quantidade de RSK1 que de RSK2 pode explicar essa observação. O eixo Ras/ERK/RSKs, nessa linhagem, é mais importante que PI3K/AKT/mTORC1 para a fosforilação de eIF4B no resíduo Ser422. De forma relevante, por meio da análise de mRNAs diferencialmente traduzidos, mostramos que o controle traducional de mRNAs regulados por diferentes isoformas de RSKs podem ter papéis importante na regulação de eventos tumorigenicos, como controle do ciclo celular. Importaneamente, a isoforma RSK1, mas não RSK2, estaria relacionada à tradução de mRNAs que apresentam o motivo 5' TOP, quando mTORC1 está inativado. Esta última observação nos levou a sugerir um modelo de resistência à inibição de mTORC1, dependente de RSK1 e LARP1. Desse modo, obtivemos um modelo útil para o entendimento das funções biológicas da família das RSKs em GBMs, por meio de estudos sobre o controle traducional. Assim, este estudo contribuirá com a busca de novos alvos moleculares, bem como com o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas que possam lidar melhor com eventos de resistência.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdulrahman N, Jaballah M, Poomakkoth N, et al. Inhibition of p90 ribosomal S6 kinase attenuates cell migration and proliferation of the human lung adenocarcinoma through phospho-GSK-3 β and osteopontin. **Mol Cell Biochem** 2016; 418:21-9.

Abrams SL, Steelman LS, Shelton JG, et al. The Raf/MEK/ERK pathway can govern drug resistance, apoptosis and sensitivity to targeted therapy. **Cell Cycle** 2010; 9:1781-91.

Akhavan D, Cloughesy TF, Mischel PS. mTOR signaling in glioblastoma: Lessons learned from bench to bedside. **Neuro Oncol** 2010; 12:882-9.

Aldape KD, Ballman K, Furth A, et al. Immunohistochemical detection of EGFRvIII in high malignancy grade astrocytomas and evaluation of prognostic significance. **J Neuropathol Exp Neurol** 2004; 63:700-7.

Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, et al. **Essential cell biology**. New York: Garland Science; 2014. From DNA to protein: how cells read the genome; p.240-1.

Andjelković M, Alessi DR, Meier R, et al. Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. **J Biol Chem** 1997; 272:31515-24.

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

Artieri CG, Fraser HB. Evolution at two levels of gene expression in yeast. **Genome Res** 2014; 24:411-21.

Aziz SA, Jilaveanu LB, Zito C, et al. Vertical targeting of the phosphatidylinositol-3 kinase pathway as a strategy for treating melanoma. **Clin Cancer Res** 2010; 16:6029-39.

Ballif BA, Roux PP, Gerber SA, MacKeigan JP, Blenis J, Gygi SP. Quantitative phosphorylation profiling of the ERK/p90 ribosomal S6 kinase-signaling cassette and its targets, the tuberous sclerosis tumor suppressors. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2005; 102:667-72.

Banerjee S, Crouse NR, Emnett RJ, Gianino SM, Gutmann DH. Neurofibromatosis-1 regulates mTOR-mediated astrocyte growth and glioma formation in a TSC / Rheb-independent manner. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2011; 108:15996-6001.

Barrett T, Wilhite SE, Ledoux P, et al. NCBI GEO: Archive for functional genomics data sets - update. **Nucleic Acids Res** 2013; 41:D991-5.

Bellacosa A, Chan TO, Ahmed NN, et al. Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain. **Oncogene** 1998; 17:313-25.

Bignone PA, Lee KY, Liu Y, et al. RPS6KA2, a putative tumour suppressor gene at 6q27 in sporadic epithelial ovarian cancer. **Oncogene** 2007; 26:683-700.

Bjorbaek C, Zhao Y, Moller DE. Divergent functional roles for p90(rsk) kinase domains. **J Biol Chem** 1995; 270:18848-52.

Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. **Science** 1999; 286:1358-62.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin** 2018; 68:394-424.

Brennan CW, Verhaak RGW, McKenna A, et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma. **Cell** 2013; 155:462-77.

Brown EJ, Albers MW, Bum Shin T, et al. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. **Nature** 1994; 369:756-8.

Buttgereit F, Brand MD. A hierarchy of ATP-consuming processes in mammalian cells. **Biochem J** 1995; 312:163-7.

Cai J, Ma H, Huang F, et al. Low expression of RSK4 predicts poor prognosis in patients with colorectal cancer. **Int J Clin Exp Pathol** 2014; 7:4959-70.

Cakmakci NG, Lerner RS, Wagner EJ, Zheng L, Marzluff WF. SLIP1, a Factor required for activation of histone mRNA translation by the stem-loop binding protein. **Mol Cell Biol** 2008; 28:1182-94.

Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. **Microbiol Mol Biol Rev** 2011; 75:50-83.

Carracedo A, Ma L, Teruya-Feldstein J, et al. Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. **J Clin Invest** 2008; 118:3065-74.

Carriere A, Romeo Y, Acosta-Jaquez HA, et al. ERK1/2 phosphorylate raptor to promote ras-dependent activation of mTOR complex 1 (mTORC1). **J Biol Chem** 2011; 286:567-77.

Carrière A, Cargnello M, Julien L-A, et al. Oncogenic MAPK signaling stimulates mtorc1 activity by promoting RSK-mediated raptor phosphorylation. **Curr Biol** 2008; 18:1269-77.

Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U, Nishizuka Y. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. **J Biol Chem** 1982; 257:7847-51.

Ceccarelli M, Barthel FP, Malta TM, et al. Molecular profiling reveals biologically discrete subsets and pathways of progression in diffuse glioma. **Cell** 2016; 164:550-63.

Cen B, Xiong Y, Song JH, et al. The Pim-1 Protein Kinase Is an Important Regulator of MET Receptor Tyrosine Kinase Levels and Signaling. **Mol Cell Biol** 2014; 34:2517-32.

Cenik C, Cenik ES, Byeon GW, et al. Integrative analysis of RNA, translation, and protein levels reveals distinct regulatory variation across humans. **Genome Res** 2015; 25:1610-21.

Chakravarti A, Chakladar A, Delaney MA, Latham DE, Loeffler JS. The epidermal growth factor receptor pathway mediates resistance to sequential administration of radiation and chemotherapy in primary human glioblastoma cells in a RAS-dependent manner. **Cancer Res** 2002; 62:4307-15.

Chen R, Abatett 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 U S A** 1993; 90:10952-6.

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.

Choo AY, Yoon S-O, Kim SG, Roux PP, Blenis J. Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2008; 105:17414-9.

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.

Cloughesy TF, Yoshimoto K, Nghiemphu P, et al. Antitumor activity of rapamycin in a phase I trial for patients with recurrent PTEN-deficient glioblastoma. **PLoS Med** 2008; 5:e8.

Colina R, Costa-Mattioli M, Dowling RJO, et al. Translational control of the innate immune response through IRF-7. **Nature** 2008; 452:323-8.

Comtesse N, Keller A, Diesinger I, et al. Frequent overexpression of the genes FXR1, CLAPM1 and EIF4G located on amplicon 3q26-27 in squamous cell carcinoma of the lung. **Int J Cancer** 2007; 120:2538-44.

Courcelles M, Frémin C, Voisin L, Lemieux S, Meloche S, Thibault P. Phosphoproteome dynamics reveal novel ERK1/2 MAP kinase substrates with broad spectrum of functions. **Mol Syst Biol** 2013; 7:27567-83.

Cuesta R, Holz MK. RSK-mediated down-regulation of PDCD4 is required for proliferation, survival, and migration in a model of triple-negative breast cancer. **Oncotarget** 2016;

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/p90rsk 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; 462:739-44.

Degen M, Barron P, Natarajan E, Widlund HR, Rheinwald JG. RSK activation of translation factor eIF4B drives abnormal increases of laminin γ 2 and MYC protein during neoplastic progression to squamous cell carcinoma. **PLoS One** 2013; 8:e78979.

De Benedetti A, Graff JR. eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases. **Oncogene** 2004; 23:3189-99.

Deschênes-Simard X, Lessard F, Gaumont-Leclerc MF, Bardeesy N, Ferbeyre G. Cellular senescence and protein degradation: breaking down cancer. **Cell Cycle** 2014; 13:1840-58.

Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. **Oncogene** 2007; 26:3279-90.

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.

Dominski Z, Marzluff WF. Formation of the 3' end of histone mRNA: Getting closer to the end. **Gene** 2007; 396:373-90.

Dos DS, 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.

Douville E, Downward J. EGF induced SOS phosphorylation in PC12 cells involves P90 RSK-2. **Oncogene** 1997; 15:373-83.

Dümmmler 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.

Edgar R. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. **Nucleic Acids Res** 2002; 30:207-10.

Eisinger-Mathason TSK, Andrade J, Groehler AL, et al. Codependent functions of RSK2 and the apoptosis-promoting factor TIA-1 in stress granule assembly and cell survival. **Mol Cell** 2008; 31:722-36.

Elf S, Blevins D, Jin L, et al. p90RSK2 is essential for FLT3-ITD- but dispensable for BCR-ABL-induced myeloid leukemia. **Blood** 2011; 117:6885-94.

Elfakess R, Sinvani H, Haimov O, Svitkin Y, Sonenberg N, Dikstein R. Unique translation initiation of mRNAs-containing TISU element. **Nucleic Acids Res** 2011; 39:7598-609.

Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: Opportunities, challenges and limitations. **Nat Rev Cancer** 2009; 9:550-62.

Eoli M, Menghi F, Bruzzone MG, et al. Methylation of O6-methylguanine DNA methyltransferase and loss of heterozygosity on 19q and/or 17p are overlapping features of secondary glioblastomas with prolonged survival. **Clin Cancer Res** 2007; 13:2606-13.

Falcon S, Gentleman R. Using GOSTATS to test gene lists for GO term association. **Bioinformatics** 2007; 23:257-8.

Fan QW, Cheng CK, Gustafson WC, et al. EGFR phosphorylates tumor-derived EGFRvIII driving STAT3/5 and progression in glioblastoma. **Cancer Cell** 2013; 24:438-49.

Fan QW, Weiss WA. Targeting the RTK-PI3K-mTOR axis in malignant glioma: overcoming resistance. **Curr Top Microbiol Immunol** 2010; 347:279-96.

Feoktistova K, Tuvshintogs E, Do A, Fraser CS. Human eIF4E promotes mRNA restructuring by stimulating eIF4A helicase activity. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2013; 110:13339-44.

Ferreira T, Rasband W. ImageJ user guide. 2012. Available from: <URL:<https://imagej.nih.gov/ij/docs/guide/user-guide.pdf>> [2018 noc 16]

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

Fonseca BD, Smith EM, Yelle N, Alain T, Bushell M, Pause A. The ever-evolving role of mTOR in translation. **Semin Cell Dev Biol** 2014; 36:102-12.

Fonseca BD, Zakaria C, Jia JJ, et al. La-related protein 1 (LARP1) represses terminal oligopyrimidine (TOP) mRNA translation downstream of mTOR complex 1 (mTORC1). **J Biol Chem** 2015; 290:15996-6020.

Fonseca BD, Lahr RM, Damgaard CK, Alain T, Berman AJ. LARP1 on TOP of ribosome production. **Wiley Interdiscip Rev RNA** 2018; 9:e1480.

Fox TD. Mitochondrial protein synthesis, import, and assembly. **Genetics** 2012; 192:1203-34.

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

Galan JA, Geraghty KM, Lavoie G, et al. Phosphoproteomic analysis identifies the tumor suppressor PDCD4 as a RSK substrate negatively regulated by 14-3-3. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2014; 111:E2918-27.

Gallie DR, Lewis NJ, Marzluff WF. The histone 3'-terminal stem-loop is necessary for translation in Chinese hamster ovary cells. **Nucleic Acids Res** 1996; 24:1954-62.

Gandin V, Sikström K, Alain T, et al. Polysome fractionation and analysis of mammalian translomes on a genome-wide scale. **J Vis Exp** 2014; (87):e51455.

Gandin V, Masvidal L, Hulea L, et al. NanoCAGE reveals 5' UTR features that define specific modes of translation of functionally related MTOR-sensitive mRNAs. **Genome Res** 2016; 26:636-48.

Gao F, Wang X, Zhu F, et al. PDCD4 gene silencing in gliomas is associated with 5' CpG island methylation and unfavourable prognosis. **J Cell Mol Med** 2009; 13:4257-67.

Gao X, Zhang Y, Arrazola P, et al. Tsc tumour suppressor proteins antagonize amino-acid-TOR signalling. **Nat Cell Biol** 2002; 4:699-704.

Garber K. Oncometabolite? IDH1 discoveries raise possibility of new metabolism targets in brain cancers and leukemia. **J Natl Cancer Inst** 2010; 102:926-8.

García-García C, Frieda KL, Feoktistova K, Fraser CS, Block SM. Factor-dependent processivity in human eIF4A DEAD-box helicase. **Science** 2015; 348:1486-8.

Gawecka JE, Young-Robbins SS, Sulzmaier FJ, et al. RSK2 protein suppresses integrin activation and fibronectin matrix assembly and promotes cell migration. **J Biol Chem** 2012; 287:43424-37.

Gebauer F, Preiss T, Hentze MW. From cis-regulatory elements to complex RNPs and back. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 2012; 4:a012245.

Giese A, Loo MA, Tran N, Haskett D, Coons SW, Berens ME. Dichotomy of astrocytoma migration and proliferation. **Int J Cancer** 1996; 67:275-82.

Giese A, Bjerkvig R, Berens ME, Westphal M. Cost of migration: Invasion of malignant gliomas and implications for treatment. **J Clin Oncol** 2003; 21:1624-36.

Gingras AC, Gygi SP, Raught B, et al. Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: A novel two step mechanism. **Genes Dev** 1999; 13:1422-37.

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

Graff JR, Konicek BW, Carter JH, Marcusson EG. Targeting the eukaryotic translation initiation factor 4E for cancer therapy. **Cancer Res** 2008; 68:631-4.

Graff JR, Zimmer SG. Translational control and metastatic progression: Enhanced activity of the mRNA cap-binding protein eIF-4E selectively enhances translation of metastasis-related mRNAs. **Clin Exp Metastasis** 2003; 20:265-73.

Grzmil M, Hemmings BA. Overcoming resistance to rapalogs in gliomas by combinatory therapies. **Biochim Biophys Acta** 2013; 1834:1371-80.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell** 2011; 144:646-74.

Harms U, Andreou AZ, Gubaev A, Klostermeier D. EIF4B, eIF4G and RNA regulate eIF4A activity in translation initiation by modulating the eIF4A conformational cycle. **Nucleic Acids Res** 2014; 42:7911-22.

Hart T, Chandrashekar M, Aregger M, et al. High-resolution CRISPR screens reveal fitness genes and genotype-specific cancer liabilities. **Cell** 2015; 163:1515-26.

Hatanpaa KJ, Burma S, Zhao D, Habib AA. Epidermal growth factor receptor in glioma: signal transduction, neuropathology, imaging, and radioresistance. **Neoplasia** 2010; 12:675-84.

Hinnebusch AG, Ivanov IP, Sonenberg N. Translational control by 5'-untranslated regions of eukaryotic mRNAs. **Science** 2016; 352:1413-6.

Hinnebusch AG, Lorsch JR. The mechanism of eukaryotic translation initiation: New insights and challenges. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 2012; 4:a011544.

Hong S, Freeberg MA, Han T, et al. LARP1 functions as a molecular switch for mTORC1-mediated translation of an essential class of mRNAs. **Elife** 2017; 6:e25237.

Horbinski C. What do we know about IDH1/2 mutations so far, and how do we use it? **Acta Neuropathol** 2013; 125:621-36.

Hsieh AC, Liu Y, Edlind MP, et al. The translational landscape of mTOR signalling steers cancer initiation and metastasis. **Nature** 2012; 485:55-61.

Ingolia NT, Ghaemmaghami S, Newman JRS, Weissman JS. Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. **Science** 2009; 324:218-23.

Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. **Nat Cell Biol** 2002; 4:648-57.

Iyer G, Hanrahan AJ, Milowsky MI, et al. Genome sequencing identifies a basis for everolimus sensitivity. **Science** 2013; 338:221.

Jechlinger M, Grunert S, Tamir IH, et al. Expression profiling of epithelial plasticity in tumor progression. **Oncogene** 2003; 22:7155-69.

Jefferies HB, Reinhard C, Kozma SC, Thomas G. Rapamycin selectively represses translation of the “polypyrimidine tract” mRNA family. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1994; 91:4441-5.

Johnson DR, O’Neill BP. Glioblastoma survival in the United States before and during the temozolomide era. **J Neurooncol** 2012; 107:359-64.

Jovanovic M, Rooney MS, Mertins P, et al. Dynamic profiling of the protein life cycle in response to pathogens. **Science** 2015; 347:1259038.

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, 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.

Kantidakis T, Ramsbottom BA, Birch JL, Dowding SN, White RJ. mTOR associates with TFIIC, is found at tRNA and 5S rRNA genes, and targets their repressor Maf1. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2010; 107:11823-8.

Kemmler S, Occhipinti L, Veisu M, Panse VG. Yvh1 is required for a late maturation step in the 60S biogenesis pathway. **J Cell Biol** 2009; 186:863-80.

Kershaw CJ, Costello JL, Talavera D, et al. Integrated multi-omics analyses reveal the pleiotropic nature of the control of gene expression by Puf3p. **Sci Rep** 2015; 5:15518.

Kevil CG, De Benedetti A, Payne DK, Coe LL, Laroux FS, Alexander JS. Translational regulation of vascular permeability factor by eukaryotic initiation factor 4E: Implications for tumor angiogenesis. **Int J Cancer** 1996; 65:785-90.

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

Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. **Nat Cell Biol** 2011; 13:132-41.

Kleinberg L. Polifeprosan 20, 3.85% carmustine slow-release wafer in malignant glioma: evidence for role in era of standard adjuvant temozolomide. **Core Evid** 2012; 7:115-30.

Knight SD, Adams ND, Burgess JL, et al. Discovery of GSK2126458, a highly potent inhibitor of PI3K and the mammalian target of rapamycin. **ACS Med Chem Lett** 2010; 1:39-43.

Komili S, Silver PA. Coupling and coordination in gene expression processes: a systems biology view. **Nat Rev Genet** 2008; 9:38-48.

Korshunov A, Sycheva R, Golanov A. The prognostic relevance of molecular alterations in glioblastomas for patients age < 50 years. **Cancer** 2005; 104:825-32.

Kozak M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger rNAS. **Nucleic Acids Res** 1987; 15:8125-48.

Kozak M. The scanning model for translation: an update. **J Cell Biol** 1989; 108:229-41.

Kristensen AR, Gsponer J, Foster LJ. Protein synthesis rate is the predominant regulator of protein expression during differentiation. **Mol Syst Biol** 2013; 9:689.

Kuersten S, Radek A, Vogel C, Penalva LOF. Translation regulation gets its 'omics' moment. **Wiley Interdiscip Rev RNA** 2013; 4:617-30.

Lahr RM, Mack SM, Héroux A, et al. The La-related protein 1-specific domain repurposes HEAT-like repeats to directly bind a 5'TOP sequence. **Nucleic Acids Res** 2015; 43:8077-88.

Lahr RM, Fonseca BD, Ciotti GE, et al. La-related protein 1 (LARP1) binds the mRNA cap, blocking eIF4F assembly on TOP mRNAs. **Elife** 2017; 6:e24146.

Langfelder P, Horvath S. WGCNA: An R package for weighted correlation network analysis. **BMC Bioinformatics** 2008; 9:559.

Lara R, Mauri FA, Taylor H, et al. An siRNA screen identifies RSK1 as a key modulator of lung cancer metastasis. **Oncogene** 2011; 30:3513-21.

Lara R, Seckl MJ, Pardo OE. The p90 RSK family members: common functions and isoform specificity. **Cancer Res** 2013; 73:5301-8.

LaRonde-LeBlanc N, Santhanam AN, Baker AR, Wlodawer A, Colburn NH. Structural basis for inhibition of translation by the tumor suppressor Pcd4. **Mol Cell Biol** 2007; 27:147-56.

Larsson O, Perlman DM, Fan D, et al. Apoptosis resistance downstream of eIF4E: Posttranscriptional activation of an anti-apoptotic transcript carrying a consensus hairpin structure. **Nucleic Acids Res** 2006; 34:4375-86.

Larsson O, Li S, Issaenko OA, et al. Eukaryotic translation initiation factor 4E-induced progression of primary human mammary epithelial cells along the cancer pathway is associated with targeted translational deregulation of oncogenic drivers and inhibitors. **Cancer Res** 2007; 67:6814-24.

Larsson O, Morita M, Topisirovic I, et al. Distinct perturbation of the translome by the antidiabetic drug metformin. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2012; 109:8977-82.

Larsson O, Tian B, Sonenberg N. Toward a genome-wide landscape of translational control. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 2013; 5:a012302.

Laurent JM, Vogel C, Kwon T, et al. Protein abundances are more conserved than mRNA abundances across diverse taxa. **Proteomics** 2010; 10:4209-12.

Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. **Cell** 2010; 141:1117-34.

Leppek K, Das R, Barna M. Functional 5' UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2018; 19:158-74.

Li Q, Jiang Y, Wei W, Ji Y, Gao H, Liu J. Frequent epigenetic inactivation of RSK4 by promoter methylation in cancerous and non-cancerous tissues of breast cancer. **Med Oncol** 2014; 31:793.

Li Y, Corradetti MN, Inoki K, Guan KL. TSC2: Filling the GAP in the mTOR signaling pathway. **Trends Biochem Sci** 2004; 29:32-8.

Liang S, Zhou Y, Chen Y, Ke G, Wen H, Wu X. Decreased expression of EIF4A1 after preoperative brachytherapy predicts better tumor-specific survival in cervical cancer. **Int J Gynecol Cancer** 2014; 24:908-15.

Liang S, Bellato HM, Lorent J, et al. Polysome-profiling in small tissue samples. **Nucleic Acids Res** 2017; 46:e3.

Liang Y, Diehn M, Watson N, et al. Gene expression profiling reveals molecularly and clinically distinct subtypes of glioblastoma multiforme. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2005; 102:5814-9.

Loenarz C, Schofield CJ. Expanding chemical biology of 2-oxoglutarate oxygenases. **Nat Chem Biol** 2008; 4:152-6.

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.

Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta Neuropathol** 2016; 131:803-20.

Ludwik KA, Campbell JP, Li M, et al. Development of a RSK inhibitor as a novel therapy for triple-negative breast cancer. **Mol Cancer Ther** 2016; 15:2598-608.

Madhavan S, Zenklusen J-C, Kotliarov Y, Sahni H, Fine HA, Buetow K. Rembrandt: helping personalized medicine become a reality through integrative translational research. **Mol Cancer Res** 2009; 7:157-67.

Manning BD, Tee AR, Logsdon MN, Blenis J, Cantley LC. Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. **Mol Cell** 2002; 10:151-62.

Marquardt B, Frith D, Stabel S. Signalling from TPA to MAP kinase requires protein kinase C, raf and MEK: reconstitution of the signalling pathway in vitro. **Oncogene** 1994; 9:3213-8.

Martin F, Barends S, Jaeger S, Schaeffer L, Prongidi-Fix L, Eriani G. Cap-assisted internal initiation of translation of histone H4. **Mol Cell** 2011; 41:197-209.

Marzluff WF. Histone 3' ends: essential and regulatory functions. **Gene Expr** 1992; 1992; 2:93-7.

Marzluff WF, Wagner EJ, Duronio RJ. Metabolism and regulation of canonical histone mRNAs: Life without a poly(A) tail. **Nat Rev Genet** 2008; 9:843-54.

Marzluff WF, Koreski KP. Birth and death of histone mRNAs. **Trends Genet** 2017; 33:745-59.

Masui K, Cloughesy TF, Mischel PS. Molecular pathology in adult high-grade gliomas: From molecular diagnostics to target therapies. **Neuropathol Appl Neurobiol** 2012; 38:271-91.

Masvidal L, Hulea L, Furic L, Topisirovic I, Larsson O. mTOR-sensitive translation: Cleared fog reveals more trees. **RNA Biol** 2017; 14:1299-305.

Mazzoleni S, Politi LS, Pala M, et al. Epidermal growth factor receptor expression identifies functionally and molecularly distinct tumor-initiating cells in human glioblastoma multiforme and is required for gliomagenesis. **Cancer Res** 2010; 70:7500-13.

McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. **Biochim Biophys Acta** 2007; 1773:1263-84.

McKay MM, Morrison DK. Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. **Oncogene** 2007; 26:3113-21.

McLendon R, Friedman A, Bigner D, et al. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. **Nature** 2008; 455:1061-8.

McManus CJ, May GE, Spealman P, Shteyman A. Ribosome profiling reveals post-transcriptional buffering of divergent gene expression in yeast. **Genome Res** 2014; 24:422-30.

Mendoza MC, Er EE, Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: Cross-talk and compensation. **Trends Biochem Sci** 2011; 36:320-8.

Michels AA, Robitaille AM, Buczynski-Ruchonnet D, et al. mTORC1 Directly phosphorylates and regulates human MAF1. **Mol Cell Biol** 2010; 30:3749-57.

Mikulits W, Pradet-Balade B, Habermann B, Beug H, Garcia-Sanz JA, Müllner EW. Isolation of translationally controlled mRNAs by differential screening. **FASEB J** 2000; 14:1641-52.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva. **Estimativas/2018 incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2018.

Miron T, Vancompernelle K, Vandekerckhove J, Wilchek M, Geiger B. A 25-kD inhibitor of actin polymerization is a low molecular mass heat shock protein. **J Cell Biol** 1991; 114:255-61.

Moira Glerum D, Shtanko A, Tzagoloff A. Characterization of COX17, a yeast gene involved in copper metabolism and assembly of cytochrome oxidase. **J Biol Chem** 1996; 1574:359-64.

Nagane M, Coufal F, Lin H, Bögl O, Cavenee WK, Huang HJS. A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis. **Cancer Res** 1996; 56:5079-86.

Nakagawachi T, Soejima H, Urano T, et al. Silencing effect of CpG island hypermethylation and histone modifications on O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene expression in human cancer. **Oncogene** 2003; 22:8835-44.

Nakamura M, Watanabe T, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Promoter methylation of the DNA repair gene MGMT in astrocytomas is frequently associated with G:C --> A:T mutations of the TP53 tumor suppressor gene. **Carcinogenesis** 2001; 22:1715-9.

Nojima H, Tokunaga C, Eguchi S, et al. The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner, raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif. **J Biol Chem** 2003; 278:15461-4.

Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, et al. Identification of a CpG Island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. **Cancer Cell** 2010; 17:510-22.

Oertlin C, Lorent J, Gandin V, et al. Generally applicable transcriptome-wide analysis of translational efficiency using anota2seq. **bioRxiv** 2018; <https://doi.org/10.1101/106922>.

Oshiro N, Yoshino KI, Hidayat S, et al. Dissociation of raptor from mTOR is a mechanism of rapamycin-induced inhibition of mTOR function. **Genes to Cells** 2004; 9:359-66.

Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, et al. CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007–2011. **Neuro Oncol** 2014; 16 Suppl 4:iv1-63.

Ostrom QT, Gittleman H, Fulop J, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. **Neuro Oncol** 2015; 17 Suppl 4:iv1-iv62.

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

Philippe L, Vasseur JJ, Debart F, Thoreen CC. La-related protein 1 (LARP1) repression of TOP mRNA translation is mediated through its cap-binding domain and controlled by an adjacent regulatory region. **Nucleic Acids Res** 2018; 46:1457-69.

Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, et al. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. **Cancer Cell** 2006; 9:157-73.

Pisapia DJ. The updated world health organization glioma classification: Cellular and molecular origins of adult infiltrating gliomas. **Arch Pathol Lab Med** 2017; 141:1633-45.

Polunovsky VA, Rosenwald IB, Tan AT, et al. Translational control of programmed cell death: eukaryotic translation initiation factor 4E blocks apoptosis in growth-factor-restricted fibroblasts with physiologically expressed or deregulated Myc. **Mol Cell Biol** 1996; 16:6573-81.

Potter CJ, Pedraza LG, Xu T. Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. **Nat Cell Biol** 2002; 4:658-65.

Rafiee M, Keramati MR, Ayatollahi H, et al. Down-regulation of ribosomal S6 kinase RPS6KA6 in acute myeloid leukemia patients. **Cell J** 2016; 18:159-64.

Rajasekhar VK, Viale A, Socci ND, Wiedmann M, Hu X, Holland EC. Oncogenic Ras and Akt signaling contribute to glioblastoma formation by differential recruitment of existing mRNAs to polysomes. **Mol Cell** 2003; 12:889-901.

Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. **Nat Protoc** 2013; 8:2281-308.

Raught B, Gingras A-C, Gygi SP, et al. Serum-stimulated, rapamycin-sensitive phosphorylation sites in the eukaryotic translation initiation factor 4GI. **EMBO J** 2000; 19:434-44.

Raught B, Peiretti F, Gingras AC, et al. Phosphorylation of eucaryotic translation initiation factor 4B Ser422 is modulated by S6 kinases. **EMBO J** 2004; 23:1761-9.

Richards SA, Dreisbach VC, Murphy LO, Blenis J. Characterization of regulatory events associated with membrane targeting of p90 ribosomal S6 kinase 1. **Mol Cell Biol** 2001; 21:7470-80.

Rodrik-Outmezguine VS, Chandarlapaty S, Pagano NC, et al. mTOR kinase inhibition causes feedback-dependent biphasic regulation of AKT signaling. **Cancer Discov** 2011; 1:248-59.

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.

Rogers GW, Richter NJ, Lima WF, Merrick WC. Modulation of the Helicase Activity of eIF4A by eIF4B, eIF4H, and eIF4F. **J Biol Chem** 2001; 276:30914-22.

Rolfe DF, Brown GC. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. **Physiol Rev** 1997; 77:731-58.

Romeo Y, Moreau J, Zindy PJ, et al. RSK regulates activated BRAF signalling to mTORC1 and promotes melanoma growth. **Oncogene** 2013; 32:2917-26.

Romeo Y, Roux PP. Paving the way for targeting RSK in cancer. **Expert Opin Ther Targets** 2011; 15:5-9.

Romeo Y, Zhang X, Roux PP. Regulation and function of the RSK family of protein kinases. **Biochem J** 2012; 441:553-69.

Rotenberg MO, Moritz M, Woolford JL. Depletion of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal protein L16 causes a decrease in 60S ribosomal subunits and formation of half-mer polyribosomes. **Genes Dev** 1988; 2:160-72.

Rouse C, Gittleman H, Ostrom QT, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. Years of potential life lost for brain and CNS tumors relative to other cancers in adults in the United States, 2010. **Neuro Oncol** 2016; 18:70-7.

Roux PP, Ballif B A, 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 U S A** 2004; 101:13489-94.

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, Topisirovic I. Regulation of mRNA translation by signaling pathways. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 2012; 4:a012252.

Roux PP, Topisirovic I. Signaling pathways involved in the regulation of mRNA translation. **Mol Cell Biol** 2018; 38:1-26.

Rozengurt E. Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors. **J Cell Physiol** 2007; 213:589-602.

Ruggero D, Montanaro L, Ma L, et al. The translation factor eIF-4E promotes tumor formation and cooperates with c-Myc in lymphomagenesis. **Nat Med** 2004; 10:484-6.

Saha M, Carriere A, Cheerathodi M, et al. RSK phosphorylates SOS1 creating 14-3-3-docking sites and negatively regulating MAPK activation. **Biochem J** 2012; 447:159-66.

Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. **Science** 2005; 307:1098-101.

Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, et al. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. **Mol Cell** 2006; 22:159-68.

Saxton RA, Sabatini DM. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. **Cell** 2017; 168:960-76.

Schrimpf SP, Weiss M, Reiter L, et al. Comparative functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster* proteomes. **PLoS Biol** 2009; 7:e48.

Schroeder A, Mueller O, Stocker S, et al. The RIN: An RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. **BMC Mol Biol** 2006; 7:3.

Schwanhüsser B, Busse D, Li N, et al. Global quantification of mammalian gene expression control. **Nature** 2011; 473:337-42.

Schwartzentruber J, Korshunov A, Liu XY, et al. Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. **Nature** 2012; 482:226-31.

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.

Shi G-X, Yang WS, Jin L, Matter ML, Ramos JW. RSK2 drives cell motility by serine phosphorylation of LARG and activation of Rho GTPases. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2018; 115:E190-E9.

Shin KD, Lee MY, Shin DS, et al. Blocking tumor cell migration and invasion with biphenyl isoxazole derivative KRIBB3, a synthetic molecule that inhibits Hsp27 phosphorylation. **J Biol Chem** 2005; 280:41439-48.

Shinojima N, Tada K, Shiraishi S, et al. Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme. **Cancer Res** 2003; 63:6962-70.

Shor B, Wu J, Shakey Q, et al. Requirement of the mTOR kinase for the regulation of Maf1 phosphorylation and control of RNA polymerase III-dependent transcription in cancer cells. **J Biol Chem** 2010; 285:15380-92.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. **CA Cancer J Clin** 2017; 67:7-30.

Silvera D, Arju R, Darvishian F, et al. Essential role for eIF4GI overexpression in the pathogenesis of inflammatory breast cancer. **Nat Cell Biol** 2009; 11:903-8.

Smith JA, Poteet-Smith CE, Malarkey K, Sturgill TW. Identification of an extracellular signal-regulated kinase (ERK) docking site in ribosomal S6 kinase, a sequence critical for activation by ERK in vivo. **J Biol Chem** 1999; 274:2893-8.

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

Sonenberg N, Hinnebusch AG. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. **Cell** 2009; 136:731-45.

Stupp R, Hegi ME, Mason WP, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. **Lancet Oncol** 2009; 10:459-66.

Sulzmaier FJ, Young-Robbins S, Jiang P, et al. RSK2 activity mediates glioblastoma invasiveness and is a potential target for new therapeutics. **Oncotarget** 2016; 7:79869-84.

Sun J, Pilch DR, Marzluff WF. The histone mRNA 3' end is required for localization of histone mRNA to polyribosomes. **Nucleic Acids Res** 1992; 20:6057-66.

Tcherkezian J, Cargnello M, Romeo Y, et al. Proteomic analysis of cap-dependent translation identifies LARP1 as a key regulator of 5' TOP mRNA translation. **Genes Dev** 2014; :357-71.

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

Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, et al. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2014; 23:1985-96.

Thakur A, Sun Y, Bollig A, et al. Anti-invasive and antimetastatic activities of ribosomal protein S6 kinase 4 in breast cancer cells. **Clin Cancer Res** 2008; 14:4427-36.

Thoreen CC, Kang SA, Chang JW, et al. An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. **J Biol Chem** 2009; 284:8023-32.

Thoreen CC, Chantranupong L, Keys HR, Wang T, Gray NS, Sabatini DM. A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. **Nature** 2012; 485:109-13.

Topisirovic I, Sonenberg N. mRNA translation and energy metabolism in cancer: The role of the MAPK and mtorc1 pathways. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol** 2011; 76:355-67.

Van Gorp AGM, Van Der Vos KE, Brenkman AB, et al. AGC kinases regulate phosphorylation and activation of eukaryotic translation initiation factor 4B. **Oncogene** 2009; 28:95-106.

Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. **Cancer Cell** 2010; 17:98-110.

Visvader JE. Cells of origin in cancer. **Nature** 2011; 469:314-22.

Vranová V, Necesalová E, Kuglík P, et al. Screening of genomic imbalances in glioblastoma multiforme using high-resolution comparative genomic hybridization. **Oncol Rep** 2007; 17:457-64.

Wagle N, Grabiner BC, Van Allen EM, et al. Activating mTOR mutations in a patient with an extraordinary response on a phase I trial of everolimus and pazopanib. **Cancer Discov** 2014; 4:546-53.

Wang Q, Hu B, Hu X, et al. Tumor evolution of glioma-intrinsic gene expression subtypes associates with immunological changes in the microenvironment. **Cancer Cell** 2017; 32:42-56.e6.

Wang T, Birsoy K, Hughes NW, et al. Identification and characterization of essential genes in the human genome. **Science** 2015; 350:1096-101.

Wang X, Li W, Williams M, Terada N, Alessi DR, Proud CG. Regulation of elongation factor 2 kinase by p90 RSK1 and p70 S6 kinase. **EMBO J** 2001; 20:4370-9.

Waskiewicz AJ, Flynn A, Proud CG, Cooper JA. Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. **EMBO J** 1997; 16:1909-20.

Weller M, Wick W, Aldape K, et al. Glioma. **Nat Rev Dis Prim** 2015; 1:15017.

Weller M, Tabatabai G, Kästner B, et al. MGMT promoter methylation is a strong prognostic biomarker for benefit from dose-intensified temozolomide rechallenge in progressive Glioblastoma: The DIRECTOR Trial. **Clin Cancer Res** 2015; 21:2057-64.

Weller M, Van den Bent M, Tonn JC, et al. European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. **Lancet Oncol** 2017; 18:e315-e29.

Whitfield ML, Zheng LX, Baldwin A, Ohta T, Hurt MM, Marzluff WF. Stem-loop binding protein, the protein that binds the 3' end of histone mRNA, is cell cycle regulated by both translational and posttranslational mechanisms. **Mol Cell Biol** 2000; 20:4188-98.

Wick W, Platten M, Meisner C, et al. Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: The NOA-08 randomised, phase 3 trial. **Lancet Oncol** 2012; 13:707-15.

Wu C, Orozco C, Boyer J, et al. BioGPS: An extensible and customizable portal for querying and organizing gene annotation resources. **Genome Biol** 2009; 10:R130.

Wu J, Janknecht R. Regulation of the ETS transcription factor ER81 by the 90-kDa ribosomal S6 kinase 1 and protein kinase A. **J Biol Chem** 2002; 277:42669-79.

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

Yang H-S, Jansen AP, Komar AA, et al. The transformation suppressor Pcdcd4 Is a novel eukaryotic translation initiation factor 4a binding protein that inhibits translation. **Mol Cell Biol** 2003; 23:26-37.

Yang H, Rudge DG, Koos JD, Vaidialingam B, Yang HJ, Pavletich NP. MTOR kinase structure, mechanism and regulation. **Nature** 2013; 497:217-23.

Yip CK, Murata K, Walz T, Sabatini DM, Kang SA. Structure of the Human mTOR Complex I and Its Implications for Rapamycin Inhibition. **Mol Cell** 2010; 38:768-74.

Young SK, Wek RC. Upstream open reading frames differentially regulate genespecific translation in the integrated stress response. **J Biol Chem** 2016; 291:16927-35.

Yu P, Laird AD, Du X, et al. Characterization of the activity of the PI3K/mTOR inhibitor XL765 (SAR245409) in tumor models with diverse genetic alterations affecting the PI3K pathway. **Mol Cancer Ther** 2014; 13:1078-91.

Zeniou M. 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.

Zhang D, Wong L, Koay ESC. Phosphorylation of Ser78 of Hsp27 correlated with HER-2/neu status and lymph node positivity in breast cancer. **Mol Cancer** 2007; 6:52.

Zhang XH, Tee LY, Wang XG, Huang QS, Yang SH. Off-target effects in CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. **Mol Ther Nucleic Acids** 2015; 4:e264.

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 Z, Meng F, Wang W, Wang Z, Zhang C, Jiang T. Comprehensive RNA-seq transcriptomic profiling in the malignant progression of gliomas. **Sci Data** 2017; 4:170024.

Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. MTOR: From growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2011; 12:21-35.

Zong H, Parada LF, Baker SJ. Cell of origin for malignant gliomas and its implication in therapeutic development. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 2015; 7:a0206610.