

**O PAPEL DE RSK NA FOSFORILAÇÃO DE ALVOS
COMPARTILHADOS COM S6K E NO CONTROLE DA
TRADUÇÃO DE 5'TOP mRNAs EM GLIOBLASTOMAS**

PAULA BORZINO CORDEIRO NUNES

**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. Glaucia Noeli Maroso Hajj

São Paulo

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Ensino Apoio ao aluno da Fundação Antônio Prudente*

N972 Nunes, Paula Borzino Cordeiro
O papel de RSK na fosforilação de alvos compartilhados com S6K e no controle da tradução de 5'top mRNAs em glioblastomas / Paula Borzino Cordeiro Nunes - São Paulo 2020.
126p.
Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.
Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.
Orientador: Martín Roffé

Descritores: 1. Glioblastoma/expressão gênica/Glioblastoma/gene expression. 2. Proteínas Quinases S6 Ribossômicas/Ribosomal Protein S6 Kinases. 3. Biossíntese de proteínas/Protein Biosynthesis

Elaborado por Suely Francisco CRB 8/2207

*Todos os direitos reservados à FAP. A violação dos direitos autorais constitui crime, previsto no art. 184 do Código Penal, sem prejuízo de indenizações cabíveis, nos termos da Lei nº 9.610/08

“Quando você chega ao limite de toda luz que você conhece, e está a ponto de dar um passo na escuridão, fé é saber que uma dessas coisas vai acontecer: vai haver chão, ou você vai ser ensinado a voar.”

Richard Bach

SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO

Este trabalho recebeu apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através de auxílio à Pesquisa, processo nº 422981/2018-4.

Este trabalho recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), através de auxílio regular à Pesquisa nº 2015/15451-3.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por ter me dado forças e coragem e ter colocado pessoas tão especiais em meu caminho.

Ao meu orientador, Dr. Martín Roffé, por toda a dedicação a este trabalho e por estar sempre disponível para discussões, tão enriquecedoras. Sou muito grata pela oportunidade e pelo grande aprendizado nesses anos, que contribuiu para o meu crescimento pessoal e acadêmico.

À Dra. Glaucia Hajj, por toda ajuda e contribuições relevantes para este trabalho.

À Dra. Vilma Martins e aos demais pesquisadores do grupo, toda colaboração foi importante para que este trabalho fosse desenvolvido.

À Arielly, pela melhor companhia que eu poderia ter nos experimentos e almoços. Obrigada por todas as conversas, risadas, aprendizado e por toda a força que você me deu para que eu chegasse até aqui. Sempre muito determinada até mesmo quando as coisas davam errado, seu esforço e dedicação são admiráveis.

À Danielle, por ter me ensinado tanto quando cheguei no laboratório, com muita dedicação e paciência.

À Denise, Dimas e Anny, por estarem presentes nos bons e maus momentos, pela amizade e por tornarem os dias no laboratório infinitamente melhores.

À Carol, Júlia, Fernanda Ferreira, Bárbara e Fernanda Lupinacci, por toda a força e ajuda sempre que necessário.

Aos técnicos Danilo, Felipe e Júlia, por todo o cuidado que têm em seu trabalho para manter o laboratório funcionando perfeitamente. Obrigada pelas conversas e por estarem sempre dispostos a ajudar, independente do que fosse.

Aos demais funcionários do CIPE e da pós-graduação, fundamentais para que nossos projetos saiam do papel

À minha família, minha maior sorte. Agradeço por toda a força e compreensão, principalmente nos momentos difíceis. À minha mãe, Marcia, meu exemplo de amor e dedicação. Você é minha motivação para fazer sempre o melhor. Obrigada por ter me apoiado em absolutamente todos os momentos, mesmo de longe, e pela confiança em mim. As palavras nunca serão suficientes para expressar toda a minha gratidão. À minha irmã Thais, por todo o carinho, cuidado e preocupação e por sempre ter torcido por mim. À minha irmã Vitória, obrigada pelo apoio em todos os momentos e pela parceria de sempre.

Serei eternamente grata por ter tido o amor e incentivo do meu pai, Paulo, que sempre acreditou em mim, e da minha avó, Enir, pelo carinho e por ter me mostrado desde cedo a importância da educação. Meus pensamentos estão sempre com vocês.

Ao Lukas, que me apoiou desde o momento em que o mestrado não passava de um sonho. Obrigada por todo o amor, conselhos, paciência e compreensão. Por ser a pessoa com quem eu podia contar em absolutamente qualquer momento e por me fazer enxergar os dias com mais otimismo.

Agradeço a todos os meus amigos que, de alguma forma, contribuíram para essa caminhada. Aos amigos que cresceram junto comigo, obrigada por continuarem sempre presentes e por estarmos juntos para compartilhar as conquistas. Aos amigos da residência, Ingrid, Jéssica, Maria e Rafael, que tornaram esse ano muito mais fácil de ser encarado. Obrigada pelas conversas, companhia e apoio.

Ao apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

RESUMO

Nunes PBC. **O papel de RSK na fosforilação de alvos compartilhados com S6K e no controle da tradução de 5'top mRNAs em glioblastomas.** [Dissertação]. São Paulo: Fundação Antônio Prudente; 2020.

O glioblastoma (GBM) é o tumor cerebral mais comum e agressivo, com sobrevida média de 12 a 15 meses após o diagnóstico. Os pacientes são tratados com ressecção cirúrgica, seguida por quimiorradioterapia, porém o prognóstico é desfavorável devido à alta propensão para recorrência. Algumas classificações para o GBM baseadas em dados de genômica e de transcriptômica foram propostas pelo *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), mas nenhum avanço clínico ocorreu de fato. Como os estudos de transcriptômica incluem todos os mRNAs presentes em uma célula, inclusive aqueles que não estão sendo traduzidos, eles não refletem adequadamente os níveis de proteínas, que são o produto funcional de praticamente todos os genes. Por outro lado, o translatoma corresponde apenas aos mRNAs sendo ativamente traduzidos e, portanto, representa uma melhor abordagem para entender como o proteoma da célula está sendo regulado. Duas importantes vias reguladoras da tradução são RTK/PI3K/Akt/mTORC1 e RTK/Ras/ERK, que apresentam alterações em 90% dos casos de GBM. De forma interessante, há uma família de proteínas chamada *90 kDa ribosomal protein S6 kinase* (RSK), que medeia um *cross-talk* entre essas duas vias. Há quatro isoformas de RSK (RSK1-4), que foram relacionadas a diversos processos celulares em outros tipos tumorais, tais como crescimento, proliferação, sobrevivência, motilidade e tradução. Em GBMs, o papel das RSKs ainda é pouco conhecido. Resultados anteriores do nosso grupo sugeriram a participação da isoforma RSK1 na regulação da fosforilação do fator de início da tradução eIF4B quando mTORC1 está inativo. Neste trabalho, avaliamos não apenas a fosforilação de eIF4B, mas também de rpS6 e eEF2K, todos alvos compartilhados pelas vias PI3K/Akt/mTORC1/S6K e Ras/ERK/RSK. Para investigar o papel das RSKs na fosforilação dessas proteínas, foram utilizadas linhagens celulares selvagens de GBM com diferentes níveis de RSK1. Os experimentos foram conduzidos também em células LN-229 nocautes para RSK1, RSK2 e nocaute duplos para RSK1 e RSK2 (DKO) geradas neste trabalho pela técnica de CRISPR/Cas9. Nossos resultados confirmam que a fosforilação de eIF4B é mais dependente da via Ras/ERK/RSK e indicam que a fosforilação de rpS6 é mais dependente de

PI3K/Akt/mTORC1/S6K. Além disso, RSK1 é a principal isoforma envolvida na fosforilação de eIF4B. Outro ponto a ser investigado era o papel da isoforma RSK1 na tradução de mRNAs com sequência 5'TOP, como observado em resultados anteriores de translatômica, que buscaram identificar famílias de mRNAs reguladas pelas RSKs. Através de experimentos de perfil polissomal e avaliação da expressão dos mRNAs 5'TOP por RT-qPCR, neste estudo foi demonstrado que a isoforma RSK1 é capaz de manter a tradução de mRNAs com sequência 5'TOP quando mTORC1 está inibido. Nossos resultados revelam funções exercidas por RSK1 em GBMs e possíveis mecanismos de resistência aos inibidores de mTORC1.

Descritores: Glioblastoma/expressão gênica. Proteínas Quinases S6 Ribossômicas. Biossíntese de Proteínas

ABSTRACT

Nunes PBC. [The role of RSK in phosphorylation of targets shared with S6K and in translational control of 5'TOP mRNAs in glioblastomas]. [Dissertação]. São Paulo: Fundação Antônio Prudente; 2020.

Glioblastoma (GBM) is a very aggressive type of brain tumor, with average survival of 12 to 15 months after diagnosis. Patients are treated with surgical resection followed by chemoradiotherapy, but most of them suffer recurrence. Classifications for GBM using genomic and transcriptomic data were proposed by TCGA, but without clinically relevant benefits. Transcriptome comprises all mRNAs in a cell, whereas the translome comprises only mRNAs being actively translated to produce proteins. Thus, translome provides information that is closer to the tumor proteome. RTK/ PI3K/Akt/mTORC1 and RTK/Ras/ERK regulates translation and both of them present with alterations in 90% of GBMs. Importantly, a family of proteins called 90 kDa ribosomal protein S6 kinase (RSK), a substrate for ERK1/2, mediates a crosstalk between these two pathways. RSK family of proteins comprises four isoforms (RSK1-4), related to several cellular processes in other types of cancer, such as cell growth, proliferation, survival, motility and translation. However, the role of RSKs in GBMs is poorly understood. Previous results from our group suggested that RSK controls phosphorylation of translation initiation factor eIF4B when mTORC1 is inactive. In this work, we evaluated not only eIF4B phosphorylation but also rpS6 and eEF2K because all of them are substrates of both PI3K/Akt/mTORC1/S6K and Ras/ERK/RSK. To this, we used GBM cell lines expressing different levels of RSK1 and also LN-229 knockout cells for RSK1, RSK2 and RSK1/2 (DKO) generated by CRISPR/Cas9 system. Our results confirm that eIF4B phosphorylation is more dependent on Ras/ERK/RSK pathway, whereas rpS6 phosphorylation is more dependent on PI3K/Akt/mTORC1/S6K pathway. In addition, RSK1 is the main isoform involved in eIF4B phosphorylation. Another point investigated here was the role of RSK1 in translation of 5'TOP mRNAs, as suggested by previous identification of mRNAs regulated by this isoform using translomics. Polysome profiling was performed followed by evaluation of 5'TOP mRNAs expression through RT-qPCR. Our results validate that RSK1 isoform can sustain translation of 5'TOP mRNAs when mTORC1 is inactive. In conclusion, this study reveals roles for RSK1 in GBMs and possible mechanisms of resistance to mTORC1 inhibitors.

Keywords: Glioblastoma/gene expression. Ribosomal Protein S6 Kinases. Protein Biosynthesis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Alterações moleculares em GBMs	4
Figura 2	Vias de sinalização alteradas em GBMs.....	9
Figura 3	Iniciação dependente de <i>cap</i>	14
Figura 4	Fase de elongação da tradução.....	15
Figura 5	O transcriptoma e o translátoma na célula.....	16
Figura 6	Funções de mTORC1 e mTORC2 e mecanismo de ativação de mTORC1.....	19
Figura 7	Estrutura e sítios de ativação das isoformas de RSK	24
Figura 8	RSKS são mediadoras de um <i>crosstalk</i> entre as vias PI3K/AKT/mTORC1 e RAS/ERK.....	26
Figura 9	A expressão de RSK1 aumenta em um grupo de GBMs	29
Figura 10	Alta expressão de RSK1 está associada a pior sobrevida em GBMs.....	30
Figura 11	Níveis das isoformas de RSK em linhagens celulares de GBM	30
Figura 12	Esquema de um polissomo.....	33
Figura 13	Separação dos pacientes portadores de GBM em diferentes clusters a partir das análises da translátômica.....	34

Figura 14	Transcritos que codificam proteínas ribossomais são diferencialmente expressos no mRNA associado com polissomos em GBMs	35
Figura 15	Sequência 5'TOP dos mRNAs <i>PABPC4</i> e <i>RPS11</i>	36
Figura 16	Controle da tradução de mRNAs com sequência 5'TOP pela proteína LARP1..	38
Figura 17	Regulação da tradução de mRNAs com sequência 5'TOP pela isoforma RSK1	39
Figura 18	Técnica de CRISPR/CAS9	43
Figura 19	Geração das células nocautes para RSK1 e RSK2.....	46
Figura 20	Representação esquemática do perfil polissomal, visão geral	50
Figura 21	Perfil polissomal com gradiente linear e não-linear (otimizado).....	51
Figura 22	Preparação das frações do perfil polissomal em gradiente linear para a extração de mRNA	55
Figura 23	Preparação das frações do perfil polissomal em gradiente não-linear para a extração de mRNA.....	55
Figura 24	Geração de clones nocautes para as isoformas RSK1, RSK2 e nocautes duplos RSK1/2 a partir da linhagem celular LN-229	61
Figura 25	Avaliação dos níveis de RSK3 e RSK4 nas células LN-229 ^{CRISPR}	62
Figura 26	Avaliação de vias de sinalização nas células LN-229 ^{CRISPR}	64
Figura 27	Efeito da inibição de mTORC1 nas células LN-229 ^{CRISPR}	66

Figura 28	Níveis de fosforilação de eIF4B e rpS6 nas linhagens celulares de GBM	67
Figura 29	Avaliação da tradução nas células LN-229 ^{CRISPR}	69
Figura 30	Variação nos níveis de mRNAs nas frações do perfil polissomal das células LN-229 ^{CRISPR}	71
Figura 31	Avaliação do nível de fosforilação de 4E-BP1 nas células LN-18 ^{CRISPR} após tratamento com Torin1	73
Figura 32	Perfil polissomal em gradiente não-linear para as células LN-18 ^{CRISPR}	74
Figura 33	Expressão de dois 5'TOP mRNAs, <i>PABPC4</i> e <i>RPS11</i> , nas frações obtidas do perfil polissomal das células LN-18 ^{CRISPR}	75
Figura 34	Efeito de Torin1 na tradução em linhagens celulares de GBM	76
Figura 35	A expressão de 5'TOP mRNAs é diferente em linhagens celulares com níveis diferentes de RSK1	78
Figura 36	mRNA total de <i>PABPC4</i> E <i>RPS11</i> nas células LN-18, A172 e U118-MG	79
Figura 37	Expressão de <i>PABPC4</i> e <i>RPS11</i> normalizada pelo mRNA controle de luciferase nas frações do perfil polissomal das linhagens celulares LN-18, A172 e U118-MG	80
Figura 38	Efeitos do tratamento com rapamicina e/ou inibidores de RSK na fosforilação de eIF4B e rpS6	84
Figura 39	Avaliação dos níveis de fosforilação de eIF4B nas células LN-18 nocaute para RSK1 e/ou RSK2	85

Figura 40 Quantificação dos níveis de RSK1 e RSK2 em linhagens celulares de GBMs... 88

Figura 41 Regulação da tradução dos mRNAs com sequência 5'TOP pela proteína RSK1 95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação histopatológica dos gliomas de acordo com critérios da OMS	2
Tabela 2	Sequências das guias a e b para os genes <i>RPS6KA1</i> E <i>RPS6KA3</i>	44
Tabela 3	Anticorpos primários usados nas análises por western blot.....	49
Tabela 4	Componentes para preparo do master MIX	57
Tabela 5	Sequência dos <i>primers forward</i> (F) e <i>reverse</i> (R) para RT-QPCR.....	58
Tabela 6	Cálculo da expressão gênica relativa	59
Tabela 7	Cálculo da expressão gênica relativa utilizando o mRNA controle de luciferase	59
Tabela 8	Eficiência da geração de células nocautes pelo sistema CRISPR/CAS9.....	61

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2-HG	D-2-hidroxiglutarato
4E-BP	Proteína de ligação ao fator eIF4E
5'TOP	do inglês, <i>5'terminal oligopyrimidine tract</i>
5'TOP mRNA	RNA mensageiro com a sequência 5'TOP
5'UTR	Região 5' não traduzida
Akt	Proteína quinase B
ATCC	do inglês, <i>American Type Culture Collection</i>
CDK	Quinase dependente de ciclina
cDNA	DNA complementar
Ct	Limiar do ciclo
CTKD	Domínio quinase C-terminal
DEPTOR	do inglês, <i>Proline-rich Akt substrate of 40 kDa</i>
DMEM	do inglês, <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGTA	Etileno Bis-glicol (β -amino-ester-etil) N, N, N', N' - ácido tetra acético
eEF2	Fator de elongação eucariótico 2
eEF2K	Quinase do fator de elongação 2 de eucariotos
EGFR	Receptor para o fator de crescimento epidérmico
eIF	Fator de iniciação da tradução
ERK	Proteínas quinases reguladas por estímulos extracelulares
g	Unidade de força g
GAP	Proteína ativadora de GTPase
GBM	Glioblastoma
G-CIMP	Fenótipo de ilhas CpG metiladas de gliomas
GDP	Guanosina difosfato
GEF	Fator de troca de nucleotídeo de guanina
GMP	Guanosina monofosfato
Grb2	do inglês, <i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
GTP	Guanosina trifosfato

HDR	do inglês, <i>Homology-Directed Repair</i>
IDH	Isocitrato desidrogenase
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IP	Imunoprecipitação
IRES	Sítio de entrada interna dos ribossomos
LARP1	Proteína 1 relacionada a La
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
MEK	Proteína quinase ativada por mitógenos
Met-tRNAi	RNA transportador especializado em iniciação acoplado a uma metionina
MITF	Fator de transcrição associado a microftalmia
MGMT	O6-metilguanina-DNA metiltransferase
mLST8	do inglês, <i>Mammalian lethal with Sec13 protein 8</i>
mRNA	RNA mensageiro
mTOR	Proteína quinase alvo mecanístico de rapamicina
mTORC1	Complexo 1 de mTOR
mTORC2	Complexo 2 de mTOR
NF1	Neurofibromina 1
NGS	Sequenciamento de nova geração
NHEJ	Junção de pontas não homólogas
NLS	Sinal de localização nuclear
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
NTKD	Domínio quinase N-terminal
OMS	Organização Mundial de Saúde
PABP	Proteína de ligação a poli-A
PABPC4	Proteína citoplasmática 4 de ligação a poli-A
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCA	Análise de componentes principais
PDCD4	Proteína de morte celular programada 4
PDGFR	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PDK1	Quinase 1 dependente de 3-fosfoinositideo
PD-L1	Ligante de PD1

PH	Homologia plecstrina
PIC	Complexo de pré-iniciação
PI3K	Quinase fosfatidil-inositol-3
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato
PKA	Proteína quinase dependente de cAMP
PKC	Proteína quinase C
PKG	Proteína quinase dependente de cGMP
PMA	do inglês, <i>phorbol-12-myristate-13-acetate</i>
Poly mRNA	mRNA associado a polissomos
PRAS40	do inglês, <i>Proline-rich Akt substrate of 40 kDa</i>
PTB	Domínio de ligação à tirosina fosforilada
PTEN	do inglês, <i>Phosphatase and tensin homolog</i>
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
Raptor	Proteína regulatória associada a mTOR
Ras	Proteína GTPase Ras
RB	Proteína retinoblastoma
Rheb	Proteína homóloga à Ras
Rictor	do inglês, <i>Rapamycin insensitive companion of mTOR</i>
RPPA	do inglês, <i>Reverse-phase protein array</i>
rpS6	Proteína ribossomal S6
RPS11	Proteína ribossomal 11
rRNA	RNA ribossomal
RSK	p90 proteína ribossomal S6 quinase
RTK	Receptor tirosina quinase
RT-PCR	Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
S6K	Proteína quinase S6
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	do inglês, <i>SDS-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SFB	Soro fetal bovino
SGK1	Quinase 1 regulada por soro e glicocorticoide
sgRNA	RNA guia, do inglês <i>single guide RNA</i>
SH2	Proteína adaptadora com homologia Scr 2
SNC	Sistema nervoso central

SOS	do inglês, <i>Son of sevenless</i>
SRF	Fator de resposta ao soro
TBS	Tampão Tris salino
TBS-T	Tampão Tris salino com <i>tween</i>
TCGA	do inglês, <i>The Cancer Genome Atlas</i>
TP53	Proteína tumoral p53
tRNA	RNA transportador
TSC	Complexo da esclerose tuberosa
V	Volts
WT	do inglês, <i>wild type</i>
α-KG	α -cetoglutarato
μg	Micrograma
μL	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Gliomas.....	1
1.2	Glioblastomas	2
1.2.1	Alterações moleculares em GBMs	4
1.3	Biomarcadores em GBMs.....	6
1.3.1	Mutações no gene <i>IDH1/2</i>	6
1.3.2	Metilação do promotor do gene <i>MGMT</i>	8
1.4	Vias de sinalização alteradas em GBMs.....	9
1.4.1	RTK/PI3K/AKT/mTORC1.....	9
1.4.2	RTK/Ras/Raf/MEK/ERK	10
1.5	A estrutura <i>cap</i> e o processo de tradução <i>cap</i> -dependente	12
1.5.1	Iniciação dependente de <i>cap</i>	13
1.6	O controle da síntese de proteínas	16
1.6.1	O complexo mTORC1	17
1.6.2	mTORC1 regula a síntese de proteínas	19
1.6.3	Inibidores de mTOR	21
1.7	A família de proteínas RSK.....	23
1.7.1	Processos celulares regulados por RSK.....	25
1.7.2	RSKs e câncer.....	27
1.8	Transcriptômica e translatômica aplicadas ao estudo de GBMs	31
1.8.1	Translatômica em GBMs de pacientes	33
1.8.2	Família de mRNAs com sequência 5'TOP.....	35
1.8.3	Translatômica em linhagens celulares de GBM	38
2	OBJETIVOS	41
2.1	Objetivo Geral	41
2.2	Objetivos Específicos	41
3	MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1	Cultura celular	42

3.2	Geração da linhagem celular LN-229 nocaute para as isoformas RSK1 e RSK2 ...	42
3.2.1	Superexpressão de RSK3 e RSK4	46
3.2.2	Avaliação das vias de sinalização.....	47
3.2.3	Preparação dos extratos celulares e quantificação das proteínas.....	47
3.3	Western blot.....	48
3.4	Perfil polissomal	49
3.4.1	Preparação dos extratos para o perfil polissomal	52
3.4.2	Perfil polissomal - Gradiente linear	53
3.4.3	Perfil polissomal - Gradiente não-linear.....	53
3.4.4	Extração de RNA das frações do perfil polissomal	54
3.4.4.1	Adição do mRNA controle de luciferase	56
3.5	RT-qPCR	56
3.5.1	Síntese de cDNA.....	56
3.5.2	qPCR.....	57
3.5.2.1	Análise dos resultados	58
4	RESULTADOS	60
4.1	Geração e seleção das células LN-229 nocautes para RSK1, RSK2 e DKO	60
4.2	Vias de sinalização nas células LN-229 ^{CRISPR}	62
4.3	Fosforilação de eIF4B e rpS6 em linhagens celulares selvagens de GBM	66
4.4	Avaliação da tradução nas células LN-229 ^{CRISPR}	68
4.5	As RSKs e a tradução de 5'mRNAs em células de GBM	71
4.5.1	Tradução de 5'TOP mRNAs nas células LN-18 ^{CRISPR}	72
4.5.2	Tradução de 5'TOP mRNAs em diferentes linhagens celulares de GBM	76
5	DISCUSSÃO	81
6	CONCLUSÃO.....	99
7	REFERÊNCIAS.....	100

1 INTRODUÇÃO

1.1 GLIOMAS

Os gliomas são tumores malignos que acometem o sistema nervoso central (SNC) e correspondem ao tipo de tumor primário intracraniano mais comum em adultos. No mundo, a incidência anual é de aproximadamente 7 casos a cada 100 mil indivíduos (Jiang e Urhbom 2012), sendo maior em países ocidentais (Thakkar et al. 2014).

No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer-INCA em 2020 a estimativa do número de casos novos para todos os tumores de SNC, o que inclui os gliomas, é de 11090 casos novos, sendo 5870 em homens e 5220 em mulheres (Ministério da Saúde 2020). Em relação à mortalidade, os últimos dados disponibilizados pelo INCA, referentes ao ano de 2018, mostraram que os tumores do SNC representaram 4% das mortes por câncer no Brasil tanto para homens quanto para mulheres.

Os gliomas podem se desenvolver a partir de diferentes células da glia, o que inclui os astrócitos, oligodendrócitos, micróglia e células ependimais; das células progenitoras das células da glia; ou a partir de uma subpopulação de células-tronco tumorais (D'Alessio et al. 2019). De acordo com a célula de origem do tumor, a Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica os gliomas em astrocitoma, oligodendroglioma, oligoastrocitoma e ependimoma (Louis et al. 2007). Eles são classificados também de acordo com critérios histopatológicos em graus I a IV, conforme a malignidade (Tabela 1). As neoplasias de grau I apresentam caráter indolente, crescem de forma restrita e possuem taxa de proliferação lenta, característica também observada nos tumores de grau II. No entanto, devido ao padrão de crescimento difuso, os tumores de grau II são mais suscetíveis à evolução para um tumor maligno. Os tumores de grau III, anaplásicos, possuem maior densidade celular, sendo observadas muitas células atípicas e em mitose. Por fim, os tumores de grau IV possuem maior grau de malignidade, o que inclui o glioblastoma (GBM), que se desenvolve a partir de astrócitos e é o tipo de glioma mais frequente, e o gliossarcoma. Além das características mencionadas para o grau III, os GBMs apresentam maior quantidade de células indiferenciadas, proliferação microvascular e necrose em pseudopaliçada (Jiang e Urhbom 2012; Vigneswaran et al. 2015; Arcella et al. 2020).

Tabela 1 - Classificação histopatológica dos gliomas de acordo com critérios da OMS

Grau	Características histopatológicas	Tipos
I Lesões circunscritas	Crescimento não-invasivo e taxa de proliferação lenta	• Astrocitoma pilocítico
II Baixo grau	Padrão de crescimento difuso e taxa de proliferação lenta; pode evoluir para um tumor maligno	• Astrocitoma difuso • Oligoastrocitoma • Oligodendroglioma
III Alto grau	Alta taxa de proliferação e elevada densidade celular, com muitas células atípicas e em mitose	• Astrocitoma anaplásico • Oligoastrocitoma anaplásico • Oligodendroglioma anaplásico
IV Alto grau	Elevada densidade celular, com muitas células atípicas e em mitose; presença de células indiferenciadas; proliferação microvascular; necrose em pseudopaliçada.	• Glioblastoma • Gliossarcoma

Fonte: Jiang e Urhbm (2012), Vigneswaran et al. (2015) e Arcella et al. (2020)

A sobrevida dos pacientes com glioma depende de diversos fatores. Em relação aos parâmetros clínicos, há influência da idade do paciente ao diagnóstico, localização da doença, extensão da ressecção do tumor, *status* de performance de Karnofsky e uso de quimioterapia adjuvante (Patil et al. 2012; Wang et al. 2019). Quanto às características do tumor, a sobrevida é influenciada pelo tipo de célula de origem, com a observação de que pacientes com tumores derivados de oligodendrócitos possuem melhor sobrevida do que aqueles com composição astrocítica; pelo grau histológico, com menor tempo de sobrevida para os tumores de grau IV, o que inclui o GBM; e pelas alterações moleculares presentes (Ostrom et al. 2015).

1.2 GLIOBLASTOMAS

O GBM, astrocitoma de grau IV, é o tumor cerebral mais comum e mais agressivo entre os adultos. Ele corresponde a 16% de todos os tumores malignos que acometem o SNC e a 50% de todos os gliomas. Embora o GBM seja diagnosticado com maior frequência no cérebro, ele também pode acometer o cerebelo, tronco encefálico e medula espinal (Davis 2016; Rock et al. 2012).

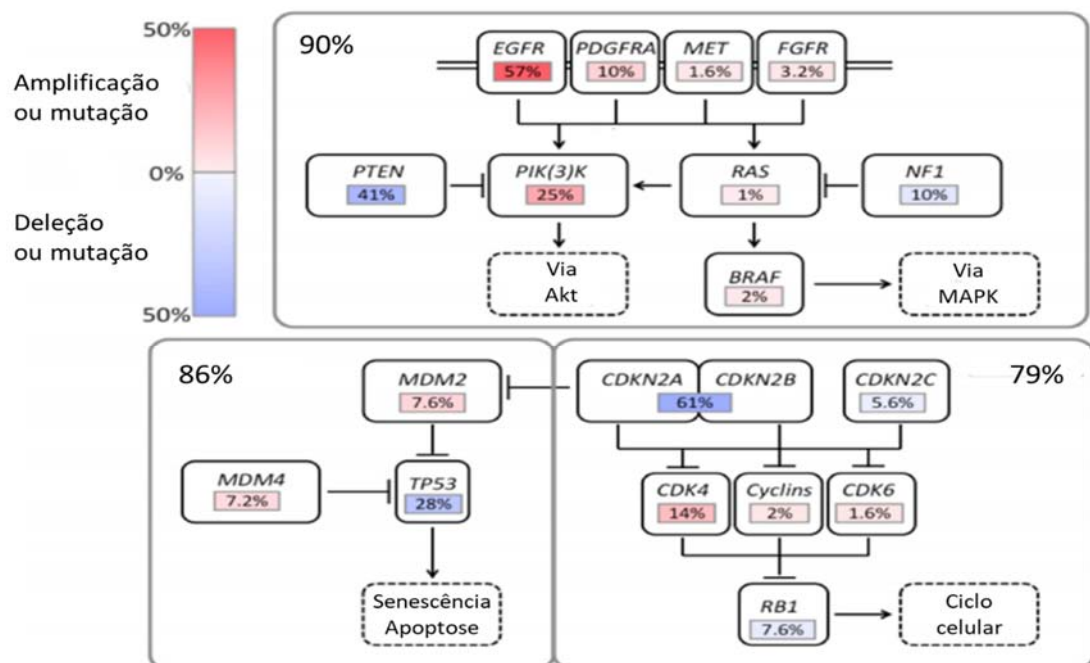
O GBM é um tumor raro, sendo a taxa de incidência anual igual a 3,2 casos por 100 mil habitantes (Ostrom et al. 2015). Ele pode ser identificado em pacientes de qualquer idade, porém apresenta pico de incidência na faixa etária de 55 a 60 anos (Ohgaki e Kleihues 2005). A mediana de idade no momento do diagnóstico é de 64 anos (Thakkar et al. 2014) e a incidência é um pouco maior em homens do que em mulheres (1,6:1) e também em indivíduos caucasianos quando comparado a outras etnias (Ellor et al. 2014).

De acordo com a origem do tumor, os GBMs podem ser divididos em dois grupos. Os tumores primários (ou *de novo*) são aqueles que se desenvolvem sem evidência histológica de uma lesão precursora, enquanto os tumores secundários resultam da transformação de um astrocitoma de baixo grau ao longo do tempo. Cerca de 90% dos GBMs são do tipo primário, que é geralmente identificado em pacientes mais velhos e está relacionado a pior prognóstico. Já os GBMs secundários ocorrem predominantemente em indivíduos mais jovens e possuem melhor prognóstico (Ohgaki et al. 2004).

Em ambos os casos, o tratamento consiste em duas etapas. A primeira é a ressecção cirúrgica do tumor, que dificilmente é curativa devido ao fato de os GBMs serem altamente invasivos e frequentemente atingirem áreas do cérebro responsáveis pelo controle de importantes funções, o que impede a realização de um procedimento radical. Em consequência, as células que permanecem infiltradas contribuem para a progressão ou recorrência da doença. Para retardar esses processos, subsequentemente à cirurgia o paciente é submetido ao tratamento conjunto de radioterapia e quimioterapia, com o agente alquilante Temozolomida (Wilson et al. 2014). Este atua promovendo a metilação de bases púricas do DNA (nos resíduos O6-guanina; N7-guanina e N3-adenina), sendo a citotoxicidade mediada principalmente através da metilação no resíduo O6-guanina. Essa alteração, por ser mutagênica e tóxica, causa a morte celular (Zhang et al. 2012). No entanto, a enzima metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT), quando ativa, é capaz de remover o grupo metil adicionado por agentes alquilantes, configurando um importante mecanismo de resistência, o qual será discutido na próxima seção. Mesmo após a realização do tratamento, a sobrevida global dos pacientes diagnosticados com GBM é baixa, variando entre 12 e 18 meses (Roy et al. 2015), e apenas 3% a 5% dos pacientes sobrevivem um período maior que três anos (Ohgaki et al. 2009). Considerando que o tratamento disponível atualmente permanece o mesmo há muitos anos, o desenvolvimento de novas estratégias é necessário para garantir maiores benefícios aos pacientes e tornar possível a aplicação de terapias personalizadas.

1.2.1 Alterações moleculares em GBMs

A classificação dos GBMs baseada em aspectos histológicos possui as limitações de ser incapaz de diferenciar os pacientes de acordo com o desfecho e de não possuir nenhum valor preditivo (Verhaak et al. 2010). Entretanto, os GBMs apresentam diversas alterações moleculares (Figura 1), que conferem a este tipo de tumor acentuada heterogeneidade intratumoral e intertumoral e que podem explicar os distintos desfechos observados nos pacientes (Olar e Aldape 2014; Lee et al. 2018). Assim, a identificação de alterações moleculares é promissora para o desenvolvimento de terapias, inclusive personalizadas.



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

Figura 1. Alterações moleculares em GBMs. As principais alterações moleculares em GBMs ocorrem em vias que regulam o crescimento e a proliferação celular (parte superior), senescência e apoptose (inferior, à esquerda) e ciclo celular (inferior, à direita), e são encontradas em oncogenes ou genes supressores de tumor. As vias da proteína quinase B (Akt) e da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) estão alteradas em cerca de 90% dos casos de GBM, sendo as alterações mais frequentes encontradas no receptor para o fator de crescimento epidérmico - EGFR (57%); em *phosphatase and tensin homolog* (PTEN) (41%), que regula negativamente a atividade da quinase de fosfatidil-inositol-3 (PI3K); e em PI3K, componente da via PI3K/AKT/proteína quinase alvo mecanístico de rapamicina (mTOR). Alterações em genes reguladores da senescência e da apoptose ocorrem em aproximadamente 86% dos casos, com destaque para o gene supressor de tumor *TP53* (28%), que codifica uma proteína de reparo do DNA. Em reguladores do ciclo celular, a frequência média de alterações é de 79% nos casos de GBMs. Os genes *CDKN2A* e *CDKN2B* estão alterados em 61% dos casos e codificam as proteínas supressoras tumorais p16^{INK4A} e p15^{INK4B}, respectivamente. Ambas formam complexos com as quinases dependentes de ciclina 4 e 6 (CDK4 e CDK6), regulando a progressão do ciclo celular por meio da inibição dessas CDKs.

O estudo dos GBMs a nível molecular avançou muito nos últimos anos, através de estudos genômicos de larga escala (Parker et al. 2015). O projeto TCGA foi criado com o objetivo de catalogar as alterações genômicas relacionadas à tumorigênese em 33 tipos de tumores, inclusive GBMs. Neste caso, o TCGA analisou alterações genômicas de 206 amostras de GBMs, a partir de 91 pacientes, para determinar o espectro de mutações. O sequenciamento das amostras confirmou a ocorrência de mutações nos genes *TP53*, *PTEN*, *EGFR*, *RBI*, *NFI*, *ERBB2*, *PIK3R1* e *PIK3CA*. Alterações em *TP53*, *RBI* e em genes que codificam receptores tirosina quinase (RTKs) foram identificadas na maioria dos GBMs, sugerindo que elas são necessárias na patogênese da doença. A frequência de alterações no gene *NFI* também se mostrou aumentada (Cancer Genome Atlas Research Network 2008; Verhaak et al. 2010; Ohgaki e Kleihues 2013). As alterações moleculares descritas são encontradas de maneira distinta em GBMs primários e secundários. Em geral, os tumores primários são caracterizados por amplificação em *EGFR*, mutação em *PTEN* e ausência de mutações em *IDH*, enquanto os tumores secundários apresentam mutações em *TP53* e em *IDH* e ausência de amplificação em *EGFR* (Louis et al. 2016).

Posteriormente, de acordo com análises de genômica e de transcriptômica, estudos do TCGA e outros trabalhos propuseram uma classificação em quatro subtipos, nomeados clássico, proneural, mesenquimal e neural. Entretanto, essa classificação não gerou nenhum benefício clínico relevante para os pacientes (Noushmehr et al. 2010; Verhaak et al. 2010; Brennan et al. 2013). Recentemente, um novo perfil foi estabelecido, a partir da identificação de alterações epigenéticas. Ele é caracterizado pela ocorrência de hipermetilação em diversos *loci* genômicos e foi denominado G-CIMP (fenótipo de ilhas CpG metiladas de gliomas), que corresponde a um subgrupo do perfil proneural. Dentro deste subgrupo, o perfil G-CIMP foi identificado nos pacientes mais jovens (média de 41 anos para os pacientes G-CIMP⁺ e de 58 anos para os G-CIMP⁻) e que também apresentaram mutações em *IDH1*, *TP53* e *MYC*. De fato, a maioria dos tumores G-CIMP⁺ foram identificados como mutantes para o gene *IDH1* (78%), enquanto todos os tumores G-CIMP⁻ apresentaram *IDH1* selvagem (Noushmehr et al. 2010; Brennan et al. 2013). A mutação em *IDH1* promove alterações epigenéticas que remodelam o metiloma e o transcriptoma da célula e é suficiente para estabelecer o perfil G-CIMP através da ativação de programas de expressão gênica. Isso foi confirmado pela introdução de *IDH1* mutante em astrócitos, que induziu um perfil de hipermetilação e remodelamento do metiloma de forma similar às alterações observadas no perfil G-CIMP (Turcan et al. 2012). Embora os pacientes G-CIMP⁺ apresentem melhor prognóstico, foram observadas diferenças na evolução clínica para pacientes com tumores classificados como G-CIMP⁺. Eles foram então divididos em duas

categorias diferentes, de acordo com a frequência de metilação do DNA, em G-CIMP *low* e G-CIMP *high*. As diferenças podem ser explicadas pela provável relação entre a extensão do processo de metilação e a alteração nos níveis de transcritos, que seriam maiores nos tumores G-CIMP *low*, nos quais foi evidenciado menor sobrevida. Neste mesmo estudo, foi proposta outra alteração em relação à classificação de GBMs em subtipos, com a exclusão do subtipo neural, além da identificação de tumores com mutação em *IDH* e pior prognóstico. É importante ressaltar que o número de pacientes incluídos em trabalhos mais recentes é maior do que nos primeiros trabalhos que propuseram as classificações iniciais para os GBMs (Ceccarelli et al. 2016).

A classificação em subtipos apresenta algumas limitações, relacionadas, por exemplo, à heterogeneidade intratumoral, já que determinadas alterações genéticas identificadas em GBMs são encontradas em todas as áreas do tumor, enquanto outras alterações são encontradas em áreas específicas. Isso caracteriza uma importante limitação para avanços clínicos, pois dificulta a validação de biomarcadores e representa um viés na seleção de pacientes para determinados tipos de tratamento, além de contribuir para a resistência à terapia (Eder e Kalman 2014). Além disso, visto que os estudos feitos até o momento, a nível de genoma e de transcriptoma, não trouxeram benefícios clínicos (Noushmehr et al. 2010; Brennan et al. 2013), existe atualmente um grande interesse em utilizar outras ferramentas que proporcionem melhores resultados.

1.3 BIOMARCADORES EM GBMS

Apesar das limitações em relação à identificação e validação de biomarcadores, até o momento dois biomarcadores foram identificados para pacientes portadores de GBM: mutação nos genes *IDH1* e *IDH2*, com valor prognóstico, e metilação do promotor do gene *MGMT*, com valor preditivo, que são achados de relativa relevância clínica (Cheng et al. 2013; Yang et al. 2015).

1.3.1 Mutações no gene *IDH1/2*

O gene *IDH* codifica a enzima isocitrato desidrogenase, que possui três isoformas. Em gliomas, as mutações ocorrem nas isoformas *IDH1* e *IDH2*, encontradas, respectivamente, no citoplasma e nas mitocôndrias (Al-Khallaf 2017). A mutação atinge o sítio ativo de *IDH* e é encontrada mais frequentemente no gene *IDH1*, representando 90% dos casos. Ela resulta na substituição de um resíduo de arginina por histidina no códon 132 (R132H), o que gera ganho

de função para a enzima. No caso do gene *IDH2*, mutações análogas são encontradas nos códons R172 e R140 (Horbinski 2013).

A enzima IDH está envolvida no Ciclo de Krebs e, em condições normais, catalisa a formação de α -cetoglutarato (α -KG) a partir de isocitrato através de uma reação oxidativa de descarboxilação. Entretanto, a enzima mutante é capaz de converter o α -cetoglutarato em um oncometabólito, chamado D-2-hidroxioglutarato (2-HG). O acúmulo de 2-HG leva, entre outros efeitos, à desregulação epigenética, pois ele inibe a histona dependente de α -KG e demetilases do DNA, além de bloquear a diferenciação celular (Dang et al. 2016). De fato, a mutação em *IDH1* é frequentemente encontrada em GBMs do subtipo G-CIMP, estando relacionada ao perfil de hipermetilação característico deste subtipo. Ele também é caracterizado pelo ganho de função em outros genes relacionados a processos metabólicos, além de *IDH1*, o que resulta em vantagens para as células tumorais. Em células com mutação em *IDH1/2* também é observada regulação da atividade dos complexos 1 e 2 de mTOR (mTORC1 e mTORC2) por 2-HG, resultando em sua ativação ou inibição, dependendo do contexto. O complexo mTORC1 desempenha importantes funções em GBMs, como apresentado adiante. Na presença de 2-HG, a rápida degradação de DEPTOR, proteína que exerce efeitos inibitórios sobre as funções de mTORC1/2, contribui para a sobrevivência e proliferação celular. Em estudos com pacientes portadores de tumores com mutação em *IDH1* foi observado aumento da sinalização de mTOR mesmo sem a presença de mutações em componentes da via PI3K/Akt/mTOR, sugerindo que outro mecanismo estaria regulando a ativação desta proteína. Entretanto 2-HG também atua inibindo a subunidade ATP5B da enzima ATP sintase, o que diminui a razão ATP/ADP e consequente redução da sinalização de mTORC1 (Gagné et al. 2017).

Cerca de 12% dos casos de GBM possuem mutação nos genes *IDH1* ou *IDH2* (Parsons et al. 2008), que são mutuamente exclusivas (Hartmann et al. 2009; Yan et al. 2009). Quando se considera apenas os GBMs secundários, a mutação é encontrada em aproximadamente 80% dos casos (Cohen et al. 2013). As consequências metabólicas da mutação nos genes *IDH1* e *IDH2* e sua influência no microambiente tumoral são um exemplo de como os subtipos de GBM podem ter um desenvolvimento e uma evolução completamente diferentes um do outro (Cohen et al. 2013; Huang et al. 2019). Um estudo de meta-análise concluiu que a mutação em *IDH1* está associada a melhor prognóstico para os pacientes portadores, que apresentaram maior sobrevida global em relação aos pacientes com *IDH1* selvagem (Cheng et al. 2013).

1.3.2 Metilação do promotor do gene *MGMT*

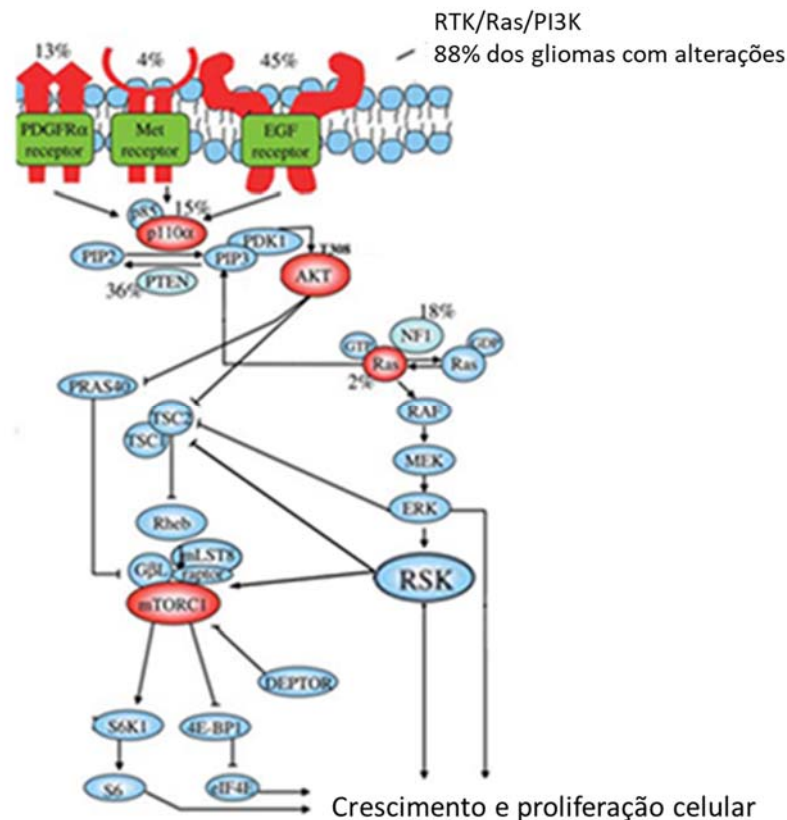
O gene *MGMT* está localizado no cromossomo 10q26.3 e codifica uma enzima altamente conservada que está envolvida no reparo do DNA. Fisiologicamente, essa enzima tem a função de remover grupos alquila a partir de guaninas, evitando erros durante a replicação do DNA decorrentes do pareamento inadequado das bases nitrogenadas. Se não reparados, os erros no DNA levariam à interrupção do ciclo celular e apoptose. No contexto de terapias que utilizam agentes alquilantes, como a temozolomida, o reparo de erros por *MGMT* durante a replicação é um mecanismo de resistência. Entretanto, este gene pode sofrer regulação epigenética através da metilação do seu promotor, sendo silenciado. Consequentemente, o dano no DNA causado pela terapia não é reparado (Mansouri et al. 2019). Acredita-se que a metilação de *MGMT* seja um evento inicial no desenvolvimento dos GBMs, já que favorece a ocorrência de mutações que não são reparadas (em oncogenes, por exemplo) e, consequentemente, o desenvolvimento e progressão da doença (Groenendijk et al. 2011; McDonald et al. 2015). Nas análises do TCGA, foi observada uma maior frequência de mutações pontuais em *TP53* e *PTEN* nos tumores com metilação do promotor de *MGMT* quando comparado aos tumores sem metilação.

A metilação do promotor de *MGMT* é um marcador de sensibilidade ao tratamento com temozolomida em GBMs, sendo a metilação identificada em cerca de 50% dos casos (Costa et al. 2010; Zhang et al. 2012). É interessante observar que muitos pacientes com GBM possuem monossomia do cromossomo 10, assim, é necessário que a metilação ocorra em apenas um alelo para evitar a atividade de reparo da enzima *MGMT* (Bady et al. 2016). Além disso, o acúmulo de mutações em outros genes de reparo pode levar a uma resistência secundária ao tratamento com Temozolomida, dificultando a resposta ao tratamento mesmo para os pacientes que apresentam a metilação (Wick et al. 2014). Porém, em geral, os pacientes portadores de GBMs com metilação no promotor de *MGMT* respondem melhor à terapia, apresentando sobrevida de 22 a 26 meses, enquanto os pacientes que não apresentam a metilação possuem sobrevida de 12 a 15 meses (Hegi et al. 2005; Wick et al. 2014).

Contudo, ainda existem limitações para a ampla aplicação clínica da metilação de *MGMT* como um biomarcador. Os valores de *cutoff* para identificar os tumores que apresentam metilação ainda são debatidos, sendo esta também uma limitação para estudos que agrupam os pacientes de acordo com o *status* de metilação, por dificultar comparações entre eles. Ainda é necessário também validar, além de comercializar, um método diagnóstico que possa ser utilizado rotineiramente, que deve apresentar altas sensibilidade e especificidade (Costa et al. 2010; Wick et al. 2014; Radke et al. 2019).

1.4 VIAS DE SINALIZAÇÃO ALTERADAS EM GBMS

As vias Ras/MEK/ERK e PI3K/AKT/mTORC1, ambas ativadas por RTKs, apresentam alterações em 88% dos gliomas (Figura 2). Elas estão relacionadas aos processos de proliferação, diferenciação, sobrevivência celular e síntese de proteínas (Akhavan et al. 2010).



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

Figura 2 - Vias de sinalização alteradas em GBMs. As vias Ras/MEK/ERK e PI3K/AKT/mTORC1, ambas reguladas por RTKs, encontram-se alteradas em 88% dos gliomas. Em GBMs, as proteínas dessas vias podem sofrer amplificação gênica ou mutações ativadoras, que resultam em ganho de função (representadas em vermelho), ou deleções gênicas ou mutações inativadoras, com perda de função (representadas em azul). As porcentagens indicam a frequência das alterações para as proteínas correspondentes em GBMs.

1.4.1 RTK/PI3K/AKT/mTORC1

A via RTK/PI3K/AKT/mTORC1 é um importante regulador positivo do crescimento e metabolismo celular (Saxton e Sabatini 2017). Alterações que resultam em ganho de função para componentes dessa via conferem vantagens de crescimento para a célula, competência metastática e capacidade de angiogênese e de resistência à terapia (Porta et al. 2014). Por isso,

componentes dessa via são alvos importantes para o desenvolvimento de drogas voltadas para o tratamento do câncer (Hennessy et al. 2005).

A família de PI3Ks é altamente conservada e sua ativação ocorre por meio dos RTKs, que, por sua vez, são ativados pela ligação de fatores de crescimento. A ativação de PI3K leva à produção do segundo mensageiro fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato (PIP3), que recruta diversas proteínas com o domínio de homologia plestrina (domínio PH) para a membrana plasmática, incluindo a proteína AKT (Porta et al. 2014). Na membrana plasmática, AKT é fosforilada pela quinase 1 dependente de 3-fosfoinositideo (PDK1) no sítio Thr308 e assim é ativada (Alessi et al. 1996). Ela também pode ser fosforilada e ativada pelo complexo 2 de mTOR (mTORC2), no sítio Ser 473 (Sarbasov et al. 2005). Um dos alvos de AKT é o complexo da esclerose tuberosa (TSC). Ele é um regulador negativo de mTORC1 e, portanto, é inibido pela fosforilação de AKT, levando à ativação de mTORC1 (Inoki et al. 2002). A proteína PTEN é a principal reguladora negativa da via desencadeada por PI3K, sendo um importante supressor tumoral. Ela antagoniza a sinalização de PI3K por promover a desfosforilação de PIP3. Assim, o recrutamento de AKT para a membrana plasmática é inibido e, consequentemente, não ocorre ativação (Hopkins et al. 2013).

As mutações que ativam a via de PI3K estão relacionadas tanto a alterações em seus componentes intracelulares quanto no receptor EGFR. De acordo com dados do TCGA, 57% dos GBMs apresentam amplificação em *EGFR*. Em 25% dos casos ocorre mutação em PI3K e em 41%, deleção ou mutação de *PTEN*, sendo as alterações nestes genes mutuamente exclusivas (Brennan et al. 2013). A consequente hiperativação da via resulta no aumento da atividade de mTORC1, com perda do controle da síntese de proteínas em GBMs (Akhavan et al. 2010).

1.4.2 RTK/Ras/Raf/MEK/ERK

Essa via de sinalização é altamente conservada em diferentes espécies e é ativada por diversos estímulos extracelulares, principalmente por fatores de crescimento, proteínas da matriz extracelular e moléculas de adesão presentes em células vizinhas (Katz et al. 2007). Ela controla muitos processos celulares, como crescimento, proliferação, diferenciação, motilidade, resposta a condições de estresse, sobrevivência e apoptose (Plotnikov et al. 2011).

A família das proteínas G pequenas possui mais de 150 proteínas relacionadas, que possuem estrutura e propriedades bioquímicas altamente conservadas. Elas possuem atividade de GTPase e encontram-se na forma ativa quando estão ligadas ao GTP e, contrariamente, na forma inativa quando fazem a hidrólise do GTP em GDP (Goitre et al. 2014). Para que esse

processo ocorra adequadamente, há a participação dos fatores de troca de nucleotídeo de guanina (GEF), que estimulam a troca de GDP em GTP e, portanto, são reguladores positivos da atividade de Ras. Já a conversão de GTP em GDP é estimulada pelas proteínas ativadoras de GTPase (GAP). Para isso, é necessária a translocação dos GEFs e das GAPs para a membrana plasmática, onde ficam próximos da proteína Ras (Simanshu et al. 2017).

A via de sinalização da proteína G pequena Ras inclui fatores de ativação *upstream*; três isoformas de Ras altamente homólogas entre si, com atividade de GTPase e com funções que se sobrepõem (a saber, NRAS, KRAS e HRAS); e os efetores *downstream* RAF, proteína quinase ativada por mitógenos (MEK) e proteínas quinases reguladas por estímulos extracelulares (ERK) (Simanshu et al. 2017). Quando os RTKs são estimulados, eles transmitem o sinal de ativação por meio do recrutamento da proteína SOS, um fator de troca de nucleotídeos de guanina, estimulando assim a conversão de GDP em GTP na proteína Ras. Para que essa interação aconteça adequadamente, é necessária a ação de *growth factor receptor-bound protein 2* (Grb2), que aproxima SOS de Ras, encontrada junto à membrana plasmática (Chardin et al. 1993). Como resultado, ocorre ativação de Ras que, em seguida, interage com diversas proteínas, incluindo isoformas da quinase serina/treonina Raf. Isso resulta em alterações conformacionais que aumentam a atividade de quinase de Raf, levando à fosforilação de MEK. A proteína MEK, uma vez ativada, fosforila ERK em um motivo conservado TXY no segmento de ativação. Por sua vez ERK fosforila diversos substratos, em resíduos de serina ou treonina seguidos por prolina, tanto no núcleo quanto no citoplasma, promovendo alterações na função de proteínas e na expressão gênica para garantir a resposta biológica adequada (Mebratu e Tesfagzi 2009; Morrison 2012).

Em GBMs, geralmente não são observadas mutações em genes da família Ras (Figura 2). Nas análises do TCGA a partir de 206 tumores, a frequência foi de 2%. De fato, as alterações observadas na via se devem a duas razões: desregulação *upstream* de RTKs, com alterações em EGFR em 45% dos casos e no receptor para fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR) em 13% dos casos, por exemplo; e perda de função (deleções/mutações) no gene *NFI*, que atua como um GAP regulador negativo de Ras. Em consequência, ocorre maior ativação de ERK do que o normal. A via RTK/Ras/ERK também está relacionada ao controle da síntese de proteínas (Knobbe et al. 2004; Akhavan et al. 2010; Brennan et al. 2013).

1.5 A ESTRUTURA CAP E O PROCESSO DE TRADUÇÃO CAP-DEPENDENTE

Durante o processo de transcrição, as enzimas RNA polimerases sintetizam moléculas de RNA a partir do DNA. Em eucariotos, as moléculas de pré-mRNA sintetizadas passam por duas modificações pós-transcricionais para dar origem ao mRNA maduro. O capeamento é a primeira modificação, que consiste na adição da estrutura m⁷G(5')ppp(5')N (chamada *cap*) na terminação 5' dos mRNAs. A outra modificação é a poliadenilação, em que ocorre a adição de diversos nucleotídeos de adenina à terminação 3' do mRNA, formando a cauda poli(A) (Wissink et al. 2019).

O capeamento é um mecanismo altamente conservado em eucariotos e pode acontecer tanto no núcleo quanto no citoplasma. No núcleo, ocorre ainda durante a transcrição, após a geração de transcritos constituídos por 25 a 30 nucleotídeos pela ação da enzima RNA polimerase II. Inicialmente ocorre a clivagem do γ fosfato da terminação 5', seguida pela transferência de GMP a partir do GTP pela enzima RNA guanilil transferase, e adição de um grupo metil à amina N⁷ pela guanina N7-metiltransferase, ligada ao primeiro nucleotídeo do RNA (Ramanathan et al. 2016; Shirokikh e Preiss 2018).

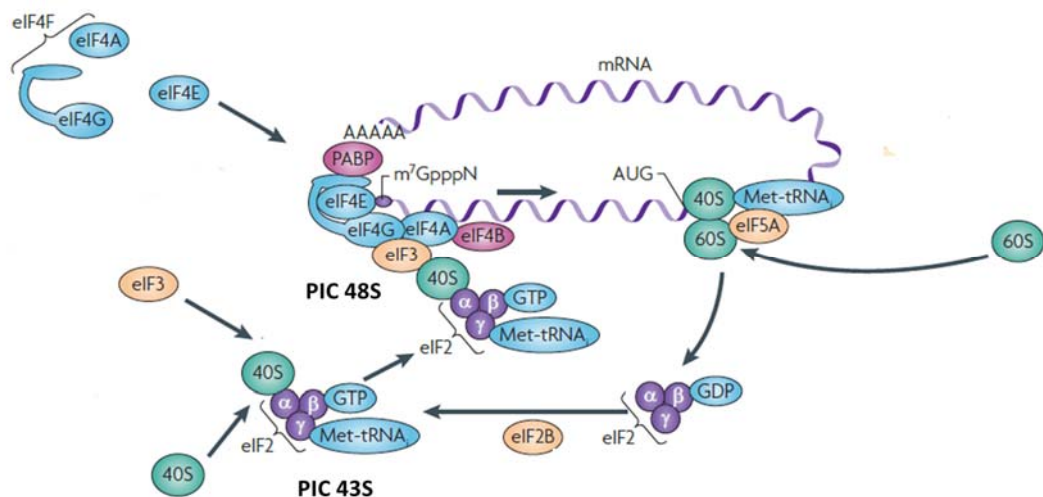
O *cap* funciona como um sinalizador para o recrutamento de proteínas relacionadas ao *splicing* do pré-mRNA, formação da cauda poliA e exportação do mRNA a partir do núcleo. Ele também garante a estabilidade do mRNA, ao proteger contra a ação de clivagem de exonucleases (Ramanathan et al. 2016). Foi observado que os mRNAs presentes no citoplasma sem a estrutura *cap* são rapidamente degradados nos corpos de processamento (*P bodies*) (Arribas-Layton et al. 2013; Łabno et al. 2016). O *cap* e a cauda poli-A também desempenham funções importantes na etapa de iniciação da tradução do mRNA (Silvera et al. 2010).

A tradução do mRNA, ou síntese de proteínas, é o processo celular que mais consome energia, por isso, ele necessita de uma complexa regulação. A tradução envolve quatro etapas: iniciação, alongação, terminação e reciclagem dos ribossomos, todas elas finamente reguladas (Shirokikh e Preiss 2018). A iniciação corresponde à etapa limitante de velocidade deste processo e é onde os mais importantes mecanismos regulatórios agem. Em eucariotos, ela pode acontecer a partir de dois mecanismos distintos: a iniciação dependente de *cap* ou a iniciação independente de *cap* (Richter e Sonenberg 2005). A iniciação dependente de *cap* foi, por muito tempo, considerada o único mecanismo de iniciação da tradução. Ela é mais eficiente e é predominante quando a célula se encontra em condições adequadas para crescimento,

respondendo por cerca de 95% a 97% do total da tradução (Merrick 2004). Por sua vez, a iniciação independente de *cap* ocorre em situações de estresse, decorrentes, por exemplo, da depleção de nutrientes, hipóxia, mitose, diferenciação celular e estresse de retículo endoplasmático, condições em que a iniciação dependente de *cap* é inibida (Komar e Hatzoglou 2011).

1.5.1 Iniciação dependente de *cap*

Durante a iniciação dependente de *cap* (Figura 3), é formado um complexo ternário, constituído pelo RNA transportador especializado em iniciação acoplado a uma metionina (Met-tRNA_i) e por eIF2 (constituído pelas subunidades α , β e γ), este último ligado a GTP. O complexo ternário se liga à subunidade ribossomal 40S junto com outros fatores de iniciação da tradução - eIFs (eIF1, eIF1A, eIF3 e eIF5), originando o complexo de pré-iniciação (PIC) 43S, que se une ao mRNA na extremidade 5' para formar o PIC 48S (Sonenberg e Hinnebusch 2009). Essa união ocorre por intermédio do complexo eIF4F, formado pela proteína de ligação ao *cap* eIF4E, pela helicase eIF4A (cuja atividade é estimulada por eIF4B) e pela proteína adaptadora eIF4G; e também por ação da proteína de ligação a poli(A) (PABP), que interage com eIF4G e promove a circularização do mRNA, ao unir as extremidades contendo o *cap* e a cauda poli(A) (Sonenberg e Hinnebusch 2009; Malka-Mahieu et al. 2017). A formação do complexo eIF4F é uma das etapas limitantes do início da tradução (Silvera et al. 2010). O PIC 48S então percorre a região 5' não traduzida (5'UTR) do mRNA até encontrar o códon de início AUG, o que induz a hidrólise do GTP ligado a eIF2. O eIF2, agora ligado ao GDP, e os outros eIFs são liberados da subunidade ribossomal 40S, permitindo a junção da subunidade ribossomal 60S. Com a união das duas subunidades, forma-se o complexo de iniciação 80S, que dá início à etapa de elongação (Merrick 2004; Jackson et al. 2010).

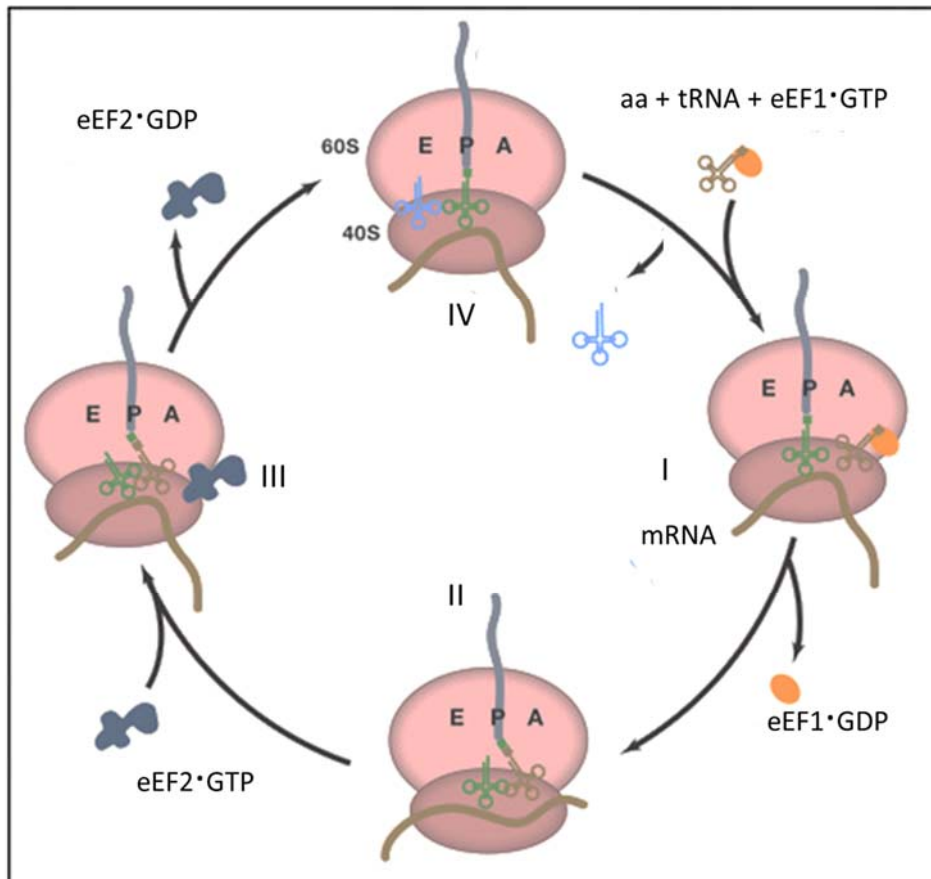


Fonte: Adaptado de Silvera et al. (2010).

Figura 3 - Iniciação dependente de *cap*. O complexo eIF4F é formado por eIF4E, eIF4G e eIF4A, cuja atividade é estimulada por eIF4B. Esse complexo se liga ao *cap* m⁷GpppN, na extremidade 5' do mRNA, e também interage com a proteína de ligação a poli(A) (PABP). A subunidade ribossomal 40S liga-se ao complexo ternário, formado por eIF2, GTP e Met-tRNA_i, dando origem ao complexo de pré-iniciação (PIC) 43S. Com o auxílio de eIF3, o PIC liga-se à extremidade 5' do mRNA, junto ao complexo eIF4F, formando o PIC 48S. Este percorre a região 5' não traduzida (5'UTR) do mRNA até encontrar o códon de início AUG. O reconhecimento deste códon induz a hidrólise do GTP ligado a eIF2, que se dissocia do mRNA na forma eIF2-GDP. Assim, a subunidade ribossomal 60S liga-se à subunidade 40S livre, formando o ribossomo 80S, o que dá início à etapa de elongação da tradução.

Um códon consiste em três nucleotídeos e cada um deles liga-se ao nucleotídeo complementar no anticódon do RNA transportador (tRNA) por meio do pareamento de bases. Na etapa de elongação, o ribossomo permite a decodificação dos códons do mRNA que são lidos em ordem, da extremidade 5' para 3', através da ligação do tRNA correspondente. Para que isso ocorra, o primeiro tRNA, contendo metionina, dirige-se ao sítio P do ribossomo, em que interage com o códon correspondente do mRNA (Figura 4). Ao lado, no sítio A, outro códon está disponível, e nele ocorre a ligação do próximo tRNA, que é carregado pelo fator de elongação eEF1 ligado a GTP. O reconhecimento do códon no mRNA promove a hidrólise do GTP e eEF1 deixa o tRNA. Quando ambos os sítios estão ocupados, a metionina do primeiro tRNA é transferida para o aminoácido codificado pelo segundo tRNA, com formação da ligação peptídica por ação da enzima peptidil transferase. Em seguida, o fator de elongação eucariótico 2 (eEF2) promove a translocação do peptidil-tRNA do sítio A para o sítio P do ribossomo, com hidrólise do GTP ligado a ele. Assim, o ribossomo desloca-se no mRNA o equivalente a três nucleotídeos, com consequente deslocamento do primeiro tRNA para o sítio E (do inglês, *exit*). Este tRNA vazio deixa o ribossomo e outro códon fica disponível no sítio A. Todo o processo é repetido até que a cadeia polipeptídica seja formada e tenha início a etapa de terminação, quando o tRNA reconhece um dos códons de parada (UAA, UAG ou UGA). Os códons de

parada são reconhecidos pelos fatores de liberação, que ocupam o sítio P no lugar do tRNA. Com isso, a enzima peptidil transferase presente no ribossomo adiciona uma molécula de água ao último aminoácido da cadeia polipeptídica formada e a proteína é liberada do tRNA (Voorhees e Ramakrishnan 2013; Dever et al. 2018).

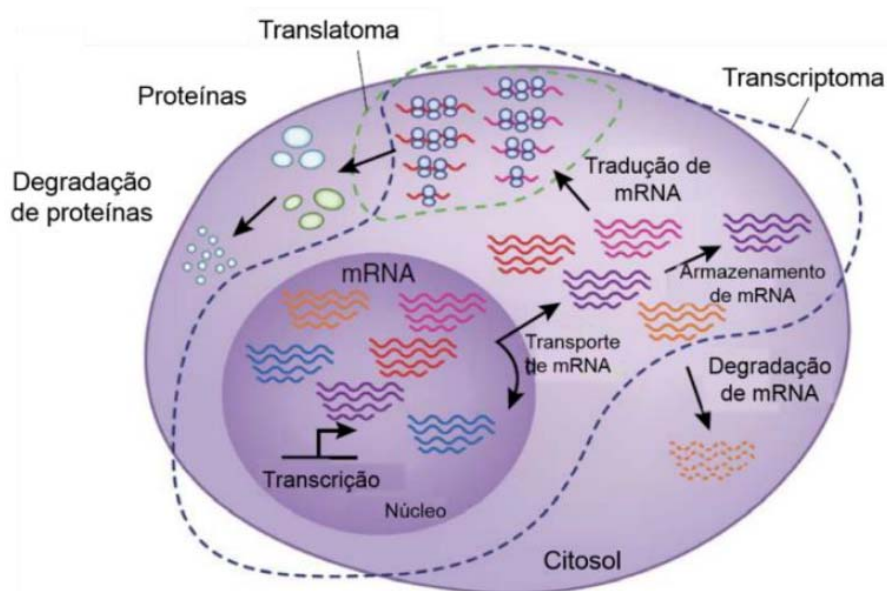


Fonte: Adaptado de Richter e Collier (2015).

Figura 4 - Fase de elongação da tradução. (I) O tRNA se dirige ao sítio P do ribossomo e o anticódon do tRNA interage com o códon correspondente no mRNA. Ao lado, no sítio A, liga-se outro tRNA. (II) Os tRNAs presentes no sítio A e no sítio P ficam próximos e o aminoácido do primeiro tRNA é transferido para o aminoácido do tRNA do sítio A, com formação da ligação peptídica pela enzima peptidil transferase. (III) Por ação do eEF2, que ocupa o sítio A, o ribossomo desloca-se no mRNA. (IV) Em consequência, o sítio E é ocupado e o sítio A fica livre, permitindo a chegada de outro tRNA. O tRNA transportador do sítio E deixa o ribossomo e o ciclo se repete.

1.6 O CONTROLE DA SÍNTESE DE PROTEÍNAS

Atualmente, sabe-se que os níveis de mRNA na célula não correspondem aos níveis de proteína. De fato, os mRNAs transcritos podem ser transportados, armazenados, degradados ou traduzidos, o que explica, em parte, as diferenças observadas. O conjunto destes mRNAs é chamado de transcriptoma (Figura 5) (Piccirillo et al. 2014). Além dos diferentes destinos para os mRNAs transcritos, também é preciso levar em consideração a influência de mecanismos de controle que atuam sobre o conjunto de mRNAs que são traduzidos, ou seja, sobre o translatoma (Figura 5) (King e Gerber 2014).



Fonte: Adaptado de Piccirillo et al. (2014)

Figura 5 - O transcriptoma e o translatoma na célula. O transcriptoma corresponde ao conjunto de todos os mRNAs transcritos, que podem ter vários destinos na célula (destacado em azul). Eles podem ser traduzidos, transportados, armazenados ou degradados. Por outro lado, o translatoma corresponde apenas aos mRNAs que são ativamente traduzidos e que, portanto, darão origem a proteínas (destacado em verde).

Foi demonstrado que quase metade da variação que ocorre nos níveis de proteínas em relação aos níveis de mRNA pode ser explicada devido aos mecanismos de controle traducional (Schwanhüsser et al. 2011), apontando para um importante papel deste processo na regulação da expressão gênica (Tian et al. 2004; Kosti et al. 2016; Perl et al. 2017). Portanto, a tradução necessita de mecanismos rígidos de controle, que ocorrem, sobretudo, durante a iniciação. Através deles, alterações na velocidade de síntese das proteínas na célula determinam a eficiência de tradução de um determinado mRNA, modulando o proteoma. Assim, é gerada uma resposta adaptativa regulatória mais rápida do que em qualquer outra etapa da expressão

gênica (Sonenberg e Hinnebusch 2009; Hershey et al. 2012). O controle traducional depende de vias de sinalização que regulam a atividade dos componentes da maquinaria de tradução e a biogênese dos ribossomos, como as vias de PI3K/AKT/mTORC1 e Ras/Raf/MEK/ERK (Shahbazian et al. 2006). A perda de controle desta regulação está associada a diferentes doenças, inclusive ao câncer, e é particularmente importante no caso do GBMs, que apresentam elevada frequência de alterações nessas duas vias (Akhavan et al. 2010). Por isso, um entendimento mais profundo do processo de síntese de proteínas em tumores é fundamental, visto que representa um grande potencial para o desenvolvimento de novas terapias que tenham como alvo componentes ou proteínas relacionadas ao processo da tradução (Steelman et al. 2011; Roux e Topisirovic 2012; Ruggero 2013).

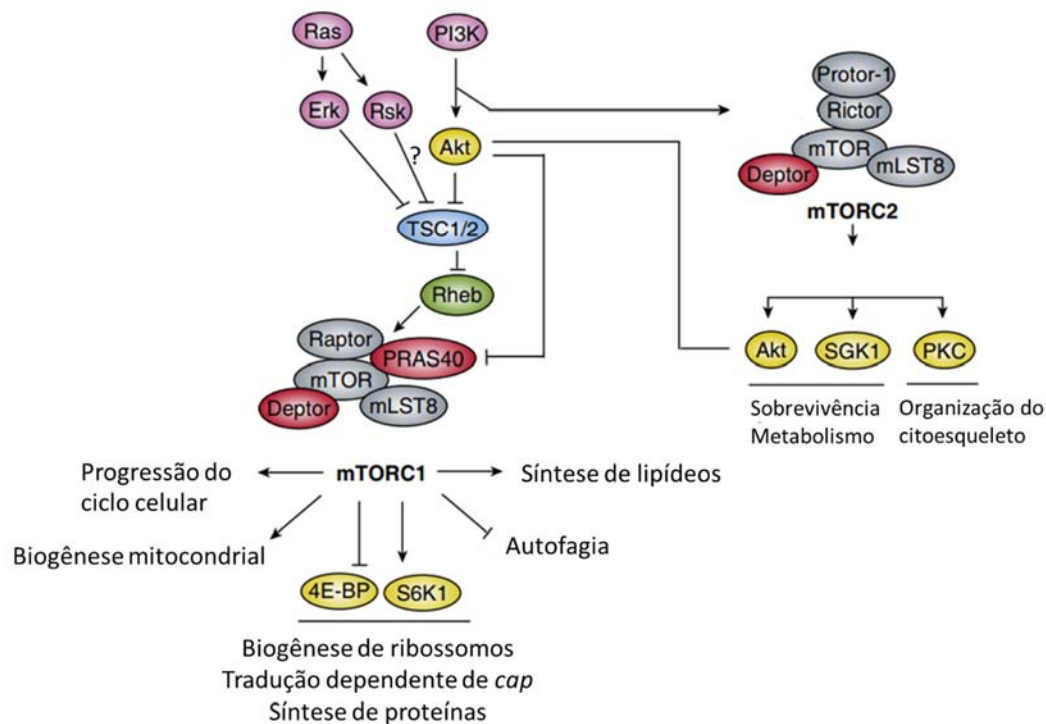
1.6.1 O complexo mTORC1

A proteína quinase mTOR foi identificada na década de 1990 como o alvo do composto rapamicina nas células eucariontes (Brown et al. 1994; Sabatini et al. 1994). No início, a rapamicina era utilizada devido aos seus efeitos antifúngicos, porém posteriormente suas propriedades imunossupressoras e antitumorais passaram a ser exploradas (Law 2005).

Existem dois diferentes complexos de proteínas em que mTOR é a subunidade catalítica, mTORC1 e mTORC2, que possuem diferenças em sua composição e nas funções reguladas por cada um (Saxton e Sabatini 2017). mTORC1 é constituído por três componentes principais, mTOR, Raptor (proteína regulatória associada a mTOR) e mLST8 (do inglês, *mammalian lethal with Sec13 protein 8*, também chamada de GβL) (Figura 6). Raptor facilita o recrutamento de substratos para mTORC1 por meio da associação com o motivo de sinalização TOR e também é necessário para manter a localização de mTORC1 no compartimento celular adequado. Por sua vez, mLST8 se associa ao domínio catalítico de mTORC1. Além disso, existem duas subunidades inibitórias, PRAS40 (do inglês, *proline-rich AKT substrate of 40 kDa*) e DEPTOR (do inglês, *DEP domain TOR binding protein*). Diversos processos celulares são regulados por mTORC1, como crescimento, autofagia, síntese de proteínas, transcrição do RNA ribossomal (rRNA), biogênese de ribossomos, biogênese de lisossomos e síntese de lipídeos (Ma e Blenis 2009; Saxton e Sabatini 2017).

De forma similar, mTORC2 também contém mTOR e mLST8, além de Rictor (do inglês, *rapamycin insensitive companion of mTOR*), que regula a função de mTORC2. Esse complexo controla a organização do citoesqueleto e, portanto, a motilidade; a proliferação celular; e a sobrevivência celular através da ativação de proteínas quinases da família AGC, como a proteína quinase C (PKC).

Tanto mTORC1 quanto mTORC2 são efetores da via de sinalização PI3K/AKT/mTOR (Figura 6). Como descrito anteriormente, a ativação de PI3K através dos RTKs resulta na produção de PIP3 e recrutamento de AKT para a membrana plasmática. AKT é fosforilada por mTORC2 no sítio Ser473 e também por PDK1, em Thr308, o que estimula sua atividade de quinase (Alessi et al. 1997; Sarbassov et al. 2005). Um de seus alvos é TSC, um complexo heterotrimérico formado pelas subunidades TSC1 (ou hamartina), TSC2 (ou tuberina) e TBC1D7 (Dibble et al. 2012), que possui função de supressor tumoral. TSC2 possui importância funcional para o complexo, por ser uma proteína ativadora de GTPase, enquanto TSC1 é necessária para a estabilização do complexo, prevenindo a degradação mediada por ubiquitina (Chong-Kopera et al. 2006). A proteína TSC2 atua regulando negativamente a ativação de mTORC1. Um dos alvos de TSC2 é a proteína homóloga à Ras (Rheb), que é altamente conservada, possui função de GTPase e regula positivamente a função de mTORC1 (Tee et al. 2002). Na ausência de fatores de crescimento, Rheb permanece na forma inativa, Rheb-GDP, pela atividade de GAP de TSC2. No entanto, quando ocorre a sinalização a partir de um RTK, AKT fosforila TSC2, inibindo-o. A fosforilação de TSC2 por AKT é inibitória, ativando mTORC1 (Kwiatkowski e Manning 2005). Dessa maneira, a ação de TSC2 sobre Rheb é anulada, com consequente ligação de Rheb a GTP. Em sua forma ativada, Rheb acumula-se e liga-se diretamente a mTORC1, também ativando-o (Inoki et al. 2003; Tee et al. 2003; Manning e Toker 2017). A via Ras/ERK também contribui para a ativação de mTORC1, por meio da fosforilação inibitória de TSC2 no sítio Ser664 por ERK e Ser1798 pela família da p90 proteína ribossomal S6 quinase (RSK), que é um substrato de ERK (Roux et al. 2004; Ballif et al. 2005). No entanto, a fosforilação de TSC2 por RSK não estava relacionada com uma menor ativação da via de mTORC1 em linhagens celulares de GBM (Roffé et al. 2015).



Fonte: Adaptado de Laplante e Sabatini (2009).

Figura 6 - Funções de mTORC1 e mTORC2 e mecanismo de ativação de mTORC1. PI3K é ativada a partir de fatores de crescimento, com subsequente ativação de AKT. Um dos alvos de AKT é TSC2, que regula negativamente a atividade de mTORC1 através da proteína G-pequena Rheb. TSC2 atua como proteína ativadora de GTPase (GAP), mantendo Rheb em sua forma inativa, ligada a GDP. Na presença de fatores de crescimento, AKT inibe TSC2 por meio de fosforilação. Consequentemente, a atividade de GTPase de Rheb não é estimulada e Rheb permanece ligada ao GTP. Na forma ativada, Rheb liga-se a mTORC1 e promove sua ativação.

1.6.2 mTORC1 regula a síntese de proteínas

mTORC1 possui diversos alvos na célula, que estão relacionados aos diferentes processos celulares controlados por eles. Um desses processos, que é o foco deste trabalho, é a síntese de proteínas. Ela é controlada através de mTORC1 por meio de dois mecanismos diferentes: uma resposta imediata, que leva à ativação da tradução dependente de *cap*; e uma resposta mais prolongada, que induz a biogênese dos ribossomos (Fonseca et al. 2014).

Existem dois principais alvos de mTORC1 relacionados à síntese de proteínas: as proteínas de ligação ao fator eIF4E (4E-BPs) e a proteína quinase S6 (S6K), que foram os primeiros alvos descritos e são os mais bem caracterizados (Magnuson et al. 2012). A família de proteínas 4E-BP inclui três membros, 4E-BP1, 4E-BP2 e 4E-BP3, que são codificados por três genes distintos, porém demonstram alto grau de homologia. As três proteínas são reguladas, no geral, de forma similar. A proteína 4E-BP1 regula a etapa de iniciação da tradução. Quando hipofosforilada, ela liga-se a eIF4E, impedindo sua interação com eIF4G, o que inibe a formação do complexo eIF4F e reprime a tradução. Ao ser fosforilada por mTORC1,

inicialmente nos sítios Ser65 e Thr70, ela se dissocia de eIF4E. A fosforilação nos sítios Thr37 e Thr46 também contribui para essa dissociação. Em consequência, eIF4E fica livre e consegue recrutar eIF4G, para iniciar a tradução dependente de *cap* (Fonseca et al. 2014).

Altos níveis de 4E-BP1 fosforilada foram identificados em diversos tipos de tumores, como no sistema nervoso central, cólon, pulmão e rim, e foram associados a piores prognósticos em alguns deles. Porém, em geral, as 4E-BPs são supressores tumorais (Qin et al. 2016). Em gliomas, foi observado que o aumento da expressão de 4E-BP1 contribui para a sensibilidade à quimioterapia com o agente alquilante carmustina em linhagens celulares e que tumores primários apresentaram maior expressão de 4E-BP1 do que tumores recorrentes (Zhu et al. 2014). O aumento da expressão de 4E-BP1 em tumores ocorre por meio de diferentes mecanismos, de acordo com o tipo de câncer. Por exemplo, a amplificação do gene *4E-BP1* foi identificada em tumores de mama (Karlsson et al. 2011), enquanto em câncer de próstata foi reportado que a amplificação do gene *c-MYC* promove sua ligação ao promotor do gene *4E-BP1*, aumentando a expressão deste (Balakumaran et al. 2011). O aumento da expressão de 4E-BP1 é acompanhado por aumento em sua fosforilação, o que indica que deve existir uma correlação entre esses dois eventos. A fosforilação é um dos mecanismos que marca as proteínas para ubiquitinação e, conseqüentemente, degradação. Entretanto, ela pode ter um efeito oposto sobre proteínas que são fosforiladas em múltiplos sítios, como as 4E-BPs, contribuindo para sua estabilização e superexpressão (Qin et al. 2016).

O outro alvo de mTORC1, S6K, inclui duas proteínas altamente homólogas, S6K1 e S6K2, que possuem mais de 80% de identidade. A principal diferença entre elas é a localização celular, pois S6K1 é encontrada predominantemente no citoplasma e S6K2, no núcleo. A proteína S6K1 é ativada pela fosforilação no sítio Thr389 por mTORC1. S6K1 fosforila e, assim, regula diversos substratos relacionados a diferentes processos celulares, como sobrevivência, crescimento, metabolismo, transcrição e tradução. Com respeito à tradução, ela desempenha um importante papel ao estimular a iniciação dependente de *cap* e a elongação. Nesse contexto, seu alvo mais importante, e também mais bem caracterizado, é a proteína ribossomal S6 (rpS6), que é um dos componentes da subunidade ribossomal 40S (Laplanche e Sabatini 2009; Magnuson et al. 2012). As S6Ks fosforilam rpS6 em cinco sítios da região C terminal, sendo eles Ser235, Ser236, Ser240, Ser244 e Ser247 (PANDE et al. 2004). Outros substratos de S6K1 são a quinase do fator de elongação 2 de eucariotos (eEF2K) (Wang et al. 2001); a proteína de morte celular programada 4 (PDCD4), que se liga a eIF4A e promove sua inibição, com conseqüente repressão da tradução dependente de *cap* (Yang et al. 2003); e eIF4B (Anjum e Blenis 2008).

1.6.3 Inibidores de mTOR

A alta frequência de alterações em componentes da via de mTOR em GBMs e a participação desta via no controle da síntese de proteínas tornam o desenvolvimento de inibidores de mTOR uma estratégia atrativa para novas terapias antitumorais.

O primeiro inibidor de mTOR identificado foi a rapamicina, que possui um importante papel antitumoral, ao inibir a proliferação e sobrevivência celular, além de ter efeito antiangiogênico. Seu uso foi aprovado para o tratamento de carcinomas renais, linfomas de células do manto e tumores neuroendócrinos do pâncreas (Xie et al. 2016). Embora a resposta à rapamicina varie de forma importante de acordo com o tipo de célula, no geral ela reduz a proliferação e o crescimento celular (Thoreen e Sabatini 2009).

O mecanismo de ação da rapamicina consiste na inibição alostérica de mTOR. Após o tratamento com rapamicina, esta se liga a uma isomerase peptidil-prolil altamente conservada da família de imunofilinas, FKBP12, formando um complexo que se liga ao domínio FRB de mTOR. O complexo se liga a um local diferente do sítio ativo, porém a alteração causada no sítio ativo decorrente desta ligação impede a interação com o substrato. Entretanto, os efeitos são diferentes sobre mTORC1 e mTORC2 (Heitman et al. 1991; Li et al. 2014). Em geral, a maior parte das funções reguladas por mTORC1 é inibida após tratamento com rapamicina. Entretanto, a tradução dependente de *cap* não é completamente inibida (Thoreen e Sabatini 2009) e os alvos de mTORC1 possuem diferentes sensibilidades à rapamicina, sendo a fosforilação de 4E-BP1 nos sítios Thr37, Thr46 e Thr70 resistente a ela (Fonseca et al. 2014) e a fosforilação de S6K1 no sítio T389, sensível. Recentemente, foi demonstrado *in vitro* que mTORC1 fosforila 4E-BP1 de forma potente, enquanto a fosforilação de S6K1 é menos robusta, o que pode explicar as diferenças do efeito observado após tratamento com rapamicina (Kang et al. 2013).

No caso de mTORC2, ele é insensível ao tratamento agudo com rapamicina (Jebali e Dumaz 2018), porém o tratamento prolongado é capaz de inibir sua sinalização. Além disso, a inibição de mTORC1 pela rapamicina resulta em um *feedback* negativo que ativa mTORC2 através de AKT (O'Reilly et al. 2006).

Em relação aos efeitos dos inibidores de mTOR, é importante considerar os mecanismos de *feedback* que interferem com a sua ação. Um *feedback* negativo para a ativação de PI3K-mTORC1 é mediado pela S6K1, que promove a fosforilação de ISR1 em resíduos de serina, impedindo uma maior ativação de PI3K. Dessa maneira, a inibição de mTORC1 promove inibição desse mecanismo de *feedback* negativo, que induz uma maior sinalização de PI3K (Li et al. 2014). Outro exemplo é a interferência de mTORC1 com as funções de mTORC2. Quando

S6K1 é fosforilada por mTORC1, a subsequente fosforilação de Rictor inibe mTORC2. Porém, quando a rapamicina inibe mTORC1, a fosforilação de Rictor é menor e, como resultado, mTORC2 permanece ativo, fosforilando e ativando AKT (Julien et al. 2010).

A ineficácia da rapamicina em inibir todas as ações reguladas por mTORC1 e a inibição de mecanismos de *feedback* negativos dependentes da atividade de mTORC1 explica o sucesso apenas parcial que foi obtido em ensaios clínicos para testar seu uso em terapias antitumorais (Rodrik-Outmezguine et al. 2011). Inclusive, ensaios clínicos realizados com rapamicina ou compostos análogos (chamados *rapalogs*) em pacientes portadores de gliomas não obtiveram resultados satisfatórios (Grzmil e Hemmings 2013). Uma opção para contornar essas limitações e melhorar as respostas terapêuticas é usar outros tipos de inibidores de mTOR ou terapias combinadas (Li et al. 2014). Neste caso, o uso de inibidores duplos de mTOR e PI3K é útil (Zhao H et al. 2019).

Assim, devido aos mecanismos de resistência intrínsecos ou adquiridos à rapamicina e à identificação do envolvimento de mTORC2 em processos oncogênicos, o desenvolvimento de inibidores do sítio ativo de mTOR ganhou importância (Guertin et al. 2009; Lee et al. 2012; Hassan et al. 2014). Eles competem pela ligação ao ATP no domínio quinase de mTOR e bloqueiam tanto mTORC1 quanto mTORC2. Atualmente, existem vários inibidores do sítio ativo de mTOR disponíveis, entre eles Torin1, e alguns ensaios clínicos estão em andamento (Sun 2013; Mecca et al. 2018).

Torin1 foi desenvolvido em 2010 por Liu et al. Ele é sintetizado a partir do composto quinolina 1, fazendo parte da classe das piridononequinolinas de inibidores de quinase, e possui seletividade mil vezes maior para mTOR quando comparado a outras 450 proteínas quinases (Liu et al. 2010). Um dos efeitos observados para Torin1 foi a redução do crescimento e da proliferação celular de forma mais eficiente que a rapamicina. Acredita-se que essa diferença seja decorrente da supressão efetiva das funções de mTORC1 resistentes à rapamicina. De fato, ocorre completa ausência de fosforilação de 4E-BP1 após tratamento com Torin1, o que está relacionado com uma maior inibição da tradução que era resistente à rapamicina (Thoreen et al. 2009).

Em GBMs, estudos pré-clínicos confirmaram a superioridade dos inibidores do sítio ativo de mTOR em relação à rapamicina e seus análogos. Foi observada inibição do crescimento, da invasão e da proliferação das células-tronco tumorais de GBM, *in vitro* (Mecca et al. 2018).

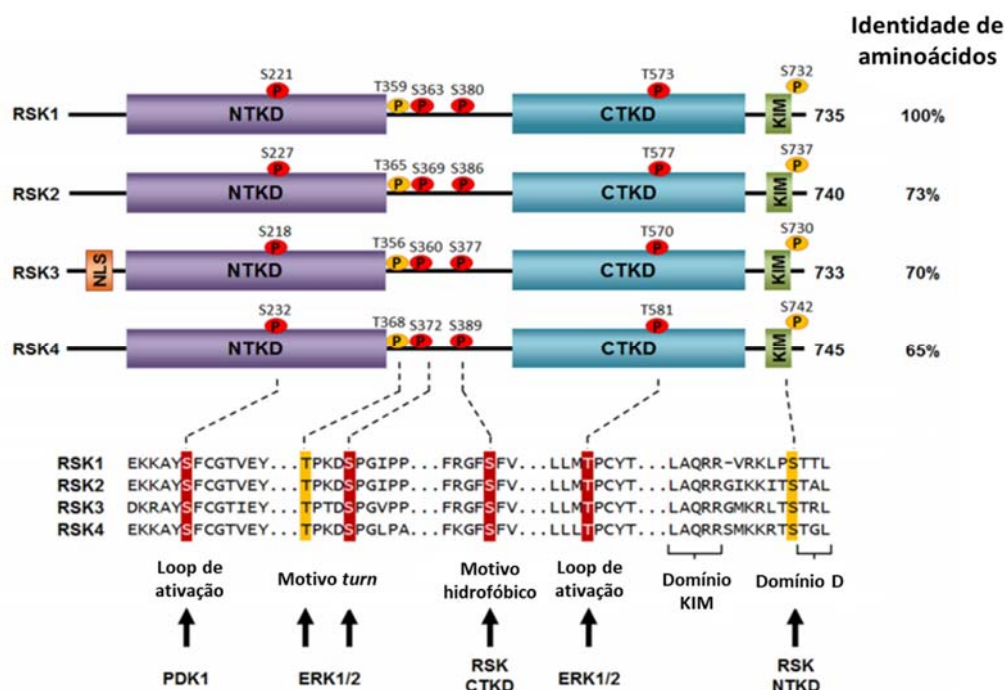
Entretanto, algumas limitações foram relatadas para o tratamento com os inibidores do sítio ativo de mTOR. Alain et al. (2012) demonstraram que as células tumorais se tornam

resistentes a esse tratamento por reduzir os níveis de 4E-BPs, aumentando, assim, a disponibilidade de eIF4E para formar o complexo eIF4F. Por outro lado, os altos níveis de eIF4E, em geral, tornam o tumor menos sensível aos inibidores de mTOR porque eles excedem o nível que pode ser regulado por 4E-BP1. Além disso, alvos da via de mTORC1-S6K1 e que estão envolvidos na síntese de proteínas (rpS6, eIF4B, PDCD4 e eEF2K) são compartilhados com a proteína RSK. Ela é um dos efetores da via Ras/MEK/ERK e atua, portanto, como um ponto de convergência entre esta via e a via de mTORC1 (Mendoza et al. 2011; Magnuson et al. 2012).

1.7 A FAMÍLIA DE PROTEÍNAS RSK

As RSKs são Ser/Thr quinases fosforiladas e ativadas pela proteína ERK1/2. Existem quatro isoformas de RSKs em humanos (RSK1, RSK2, RSK3 e RSK4), que são altamente homólogas entre si e possuem 73% a 80% de identidade de aminoácidos, sendo os motivos funcionais altamente conservados. As maiores diferenças são observadas nas sequências N-terminal e C-terminal (Romeo et al. 2012; Leroux et al. 2017). A estrutura das RSKs (Figura 7) compreende dois domínios quinase distintos, o domínio quinase C-terminal (CTKD) e o domínio quinase N-terminal (NTKD); uma região de ligação; e extremidades N-terminal e C-terminal. A presença de dois domínios quinase funcionais e diferentes no mesmo polipeptídeo é uma particularidade e acredita-se que, ao longo da evolução, os genes de duas proteínas quinases diferentes se fundiram. O NTKD da família de proteínas RSK pertence ao grupo de quinases AGC, que inclui 63 quinases humanas relacionadas às proteínas quinases dependentes de cAMP (PKA), de cGMP (PKG) e à PKC. Os domínios quinase são conectados por uma região de ligação constituída por aproximadamente cem aminoácidos. Nela, estão incluídos dois motivos regulatórios importantes, chamados de motivos *turn* e hidrofóbico, que são altamente conservados nas quinases do grupo AGC (Romeo et al. 2012; Houles e Roux 2018).

As RSKs possuem quatro sítios de fosforilação considerados essenciais para sua ativação, Thr573, Ser380, Ser363 e Ser221. A fosforilação por ERK1/2 ocorre no sítio Thr573 no CTKD, com ativação deste domínio e consequente autofosforilação de Ser380, localizada na região de ligação. Nela também se encontra Ser363, cujo mecanismo de fosforilação não é completamente entendido. Por fim, PDK1 fosforila a Ser221 no NTKD, o que é necessário para ativação de RSK1-3 mas não de RSK4 (Anjum e Blenis 2008; Houles e Roux 2018).



Fonte: Adaptado de Houles e Roux (2018).

Figura 7 - Estrutura e sítios de ativação das isoformas de RSK. As RSKs possuem dois domínios funcionais, o domínio quinase N-terminal e o domínio quinase C-terminal (NTKD e CTKD), conectados entre si pela região de ligação. RSK3 possui um sinal de localização nuclear (NLS) na região N-terminal. A região C-terminal possui o domínio D, onde se liga a proteína ERK1/2 para fosforilar o sítio Thr573, com ativação do CTKD que, por sua vez, promove a autofosforilação de Ser380. Seis sítios diferentes altamente conservados entre as isoformas, destacados na figura, foram descritos nas RSKs, sendo quatro deles essenciais para a ativação da proteína.

A nível celular, RSK1-3 estão presentes no citoplasma das células em condições basais e, após estímulo, elas sofrem translocação para o núcleo. No caso de RSK1, ela ainda se acumula na membrana plasmática de forma transitória, provavelmente para receber estímulos adicionais. Já a isoforma RSK4 é encontrada predominantemente no citoplasma e não se desloca para o núcleo, além de ter atividade constitutiva. Em relação à expressão, as RSKs 1-3 são encontradas em todos os tecidos do corpo, porém ocorrem consideráveis variações, o que sugere a possibilidade de funções isoforma-específicas. Estudos reportaram a predominância de mRNA de RSK1 no pulmão, rins e pâncreas, enquanto RSK2 e RSK3 foram encontradas em maior abundância no músculo esquelético, coração e pâncreas. A maior diferença foi observada em relação a RSK4, que é predominantemente expressa durante o desenvolvimento embrionário, mas também foi identificada no cérebro, cerebelo, rins e músculo esquelético. Embora não apresentem níveis tão elevados quanto em outros tecidos do corpo, todas as isoformas foram identificadas no cérebro, com diferenças nos níveis de acordo com a região analisada. A isoforma RSK4 foi a menos predominante no cérebro (Lara et al. 2013; Houles e Roux 2018).

1.7.1 Processos celulares regulados por RSK

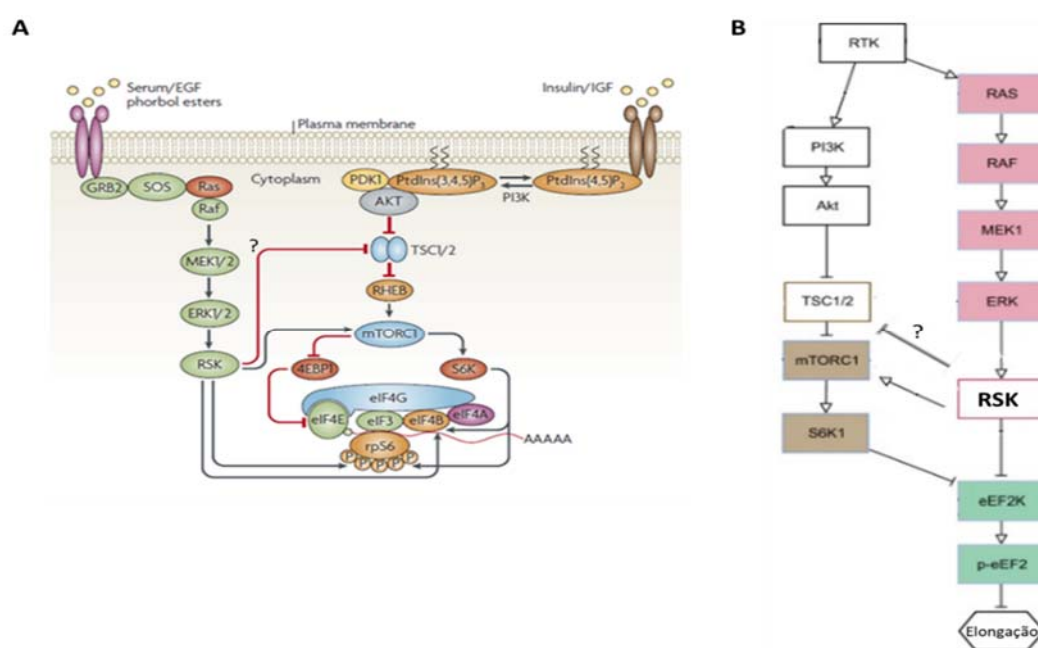
As RSKs atuam em diversos processos celulares, como proliferação, sobrevivência, tradução, crescimento e motilidade. Elas regulam a proliferação indiretamente, através da modulação de fatores de transcrição, ou diretamente, controlando o ciclo celular (Lara et al. 2013). As RSKs controlam reguladores da transcrição, como o proto-oncogene *JUN*, e fatores de transcrição que participam do controle do ciclo celular, por meio de regulação pós-transcricional (Murphy et al. 2002). Em relação ao controle do ciclo celular, a inibição farmacológica das RSKs interrompe o ciclo na fase G1 por não ocorrer expressão de ciclina D1. Além disso, tanto a isoforma RSK1 quanto RSK2 regulam a atividade de CDK2, por controlar seu inibidor, p27kip1. A fosforilação deste pelas RSKs promove a interação com a proteína 14-3-3 e impede a translocação para o núcleo. Em consequência, p27kip1 é incapaz de inativar o complexo ciclina E/A-CDK2, e o ciclo celular progride (Fujita et al. 2003). Em relação à motilidade celular, diferentes experimentos indicaram a participação das RSKs, como ensaios de *wound scratch*, quimiotaxia e invasão de matriz 3D. Além disso, análises de mRNAs regulados por RSK mostraram que, entre 228 genes regulados, cerca de 25% possuem um papel bem estabelecido nos processos de motilidade e de invasão (Doehn et al. 2009).

Dentre os processos regulados por RSK, o foco deste trabalho é a tradução. A proteína RSK representa um ponto de *crosstalk* entre a via de Ras/ERK e PI3K/AKT/mTORC1 (Figura 2), que estão relacionadas, entre outras funções, a mecanismos de regulação da tradução. A RSK é responsável pela fosforilação de diversas proteínas, muitas delas associadas à função de mTORC1, e também atua diretamente sobre componentes da maquinaria de tradução (Akhavan et al. 2010; Romeo et al. 2012).

A isoformas RSK1 e 2 fosforilam Raptor, o componente de mTORC1 que auxilia na ligação dos substratos, nos sítios Ser719, Ser721 e Ser722. Eles se encontram em uma região altamente conservada, até então sem função conhecida. Após a expressão de formas oncogênicas de Ras e MEK, que promoveram a elevação da atividade de mTORC1, foi observada fosforilação constitutiva de Raptor por RSK (Carrière et al. 2008).

Os principais substratos de mTORC1 que participam do processo de tradução são 4E-BP1 e S6K. De forma importante, as proteínas S6K e RSK possuem substratos em comum, como rpS6 e eIF4B (Figura 8, A). A via S6K/rpS6 está associada ao processo de biogênese de ribossomos (Chauvin et al. 2014). Já a proteína eIF4B, fosforilada no sítio Ser422 por S6Ks e RSKs, atua aumentando a atividade de helicase de eIF4A, que é responsável por percorrer a região 5'UTR do mRNA e desfazer as estruturas secundárias, o que favorece o início da tradução de mRNAs com 5'UTR altamente estruturadas. A fosforilação no sítio Ser422 também

aumenta a interação entre eIF4B e eIF3, o que favorece a ligação da subunidade 40S ao mRNA (Shahbazian et al. 2006). Outro alvo em comum é eEF2K (Figura 8, B), que é fosforilada no sítio Ser366 tanto por S6K quanto por RSK (Wang et al. 2001). eEF2K possui um domínio catalítico de quinase e funciona como reguladora negativa da síntese proteínas. Ela fosforila o fator de alongação eEF2, promovendo sua inibição. A função de eEF2 é promover a translocação do peptidil-tRNA do sítio A para o sítio P do ribossomo durante a etapa de alongação da tradução. No entanto, a fosforilação por S6Ks e RSKs inativa eEF2K e, em consequência, a alongação ocorre normalmente (Roux e Topisirovic 2018). Outra forma de inativação de eEF2K é a fosforilação no sítio Ser359 diretamente por ERK1/2 (Wang et al. 2014). A proteína PDCD4 também é fosforilada por S6K e por RSK, nos sítios Ser67 e Ser457, respectivamente (Dorrello et al. 2006; Galan et al. 2014).



Fonte: Adaptado de Anjum e Blenis (2008) e de Kenney et al. (2016).

Figura 8 - RSKs são mediadoras de um *crossstalk* entre as vias PI3K/Akt/mTORC1 e Ras/ERK e atuam no controle da tradução. (A) As RSKs fosforilam TSC1/2, o que poderia regular negativamente a atividade de RHEB, que estimula mTORC1. Elas também fosforilam as seguintes proteínas, que são alvos compartilhados entre RSKs e S6Ks: rpS6, que participa da biogênese de ribossomos; eIF4B, que aumenta a atividade de helicase de eIF4A e facilita a ligação da subunidade ribossomal 40S ao mRNA; e (B) eEF2K. Em condições basais, em que não há estímulo para os RTKs (por exemplo, em condições de carecimento de soro), eEF2K fosforila eEF2. Isso resulta na inibição da função de eEF2, impedindo a alongação da cadeia peptídica durante o processo de síntese de proteínas. Entretanto, sob estímulo e ativação dos RTKs, S6K1 e RSK fosforilam eEF2K, impedindo sua atividade de inibição sobre eEF2. Em consequência, a atividade de eEF2 propicia a adequada alongação da cadeia peptídica.

1.7.2 RSKs e câncer

Devido aos processos regulados por RSK nas células, elas podem favorecer o desenvolvimento de diversas patologias. Seu papel em doenças ainda não está muito bem estabelecido, mas a isoforma RSK2 foi associada à patogênese da síndrome de Coffin-Lowry. Nessa síndrome ocorrem alterações cognitivas e psicomotoras, explicadas, pelo menos em parte, por mutação em RSK2. Zeniou et al. (2002) identificaram expressão predominante de RSK2 em áreas do cérebro responsáveis pela função cognitiva e aprendizado, o que ressalta os efeitos causados pela mutação.

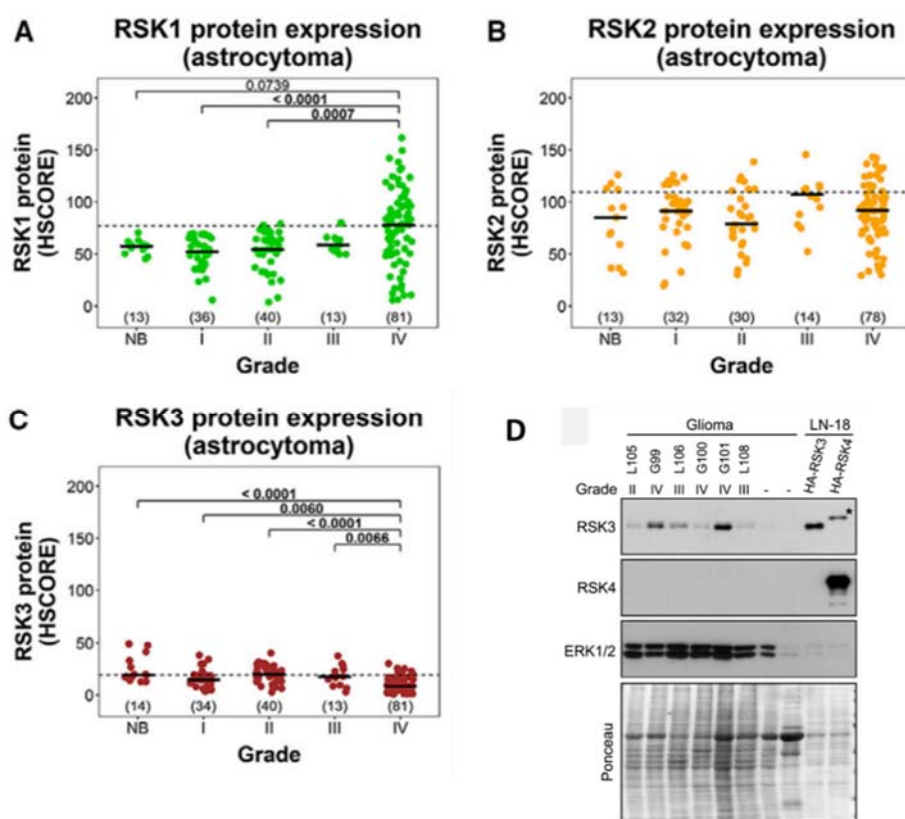
De forma importante, a identificação de um número crescente de tumores que apresentam desregulação da expressão ou da atividade de RSK indica o papel desta proteína no desenvolvimento e/ou manutenção dessas doenças. Em câncer de próstata, as isoformas RSK1 e RSK2 apresentaram aumento de expressão, sendo RSK2 associada a pior prognóstico quando avaliada a progressão local da doença (Clark et al. 2005) e também a ocorrência de metástases ósseas (Yu et al. 2015). Como os genes de RSK1 e RSK2 estão localizados em diferentes cromossomos, provavelmente as alterações são decorrentes de alterações na sinalização e não de amplificação gênica, que precisaria ocorrer de maneira independente (Clark et al. 2005). Outro trabalho, que analisou tecidos de pacientes com câncer de mama, identificou redução nos níveis de RSK1 e RSK3 e associação deste achado com progressão da doença, o que não foi relatado para RSK2 (Zhao et al. 2016). Contrariamente, Kang et al. (2010) reportaram, pela primeira vez, que RSK2 está relacionada aos processos de invasão e metástase em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, ao observarem níveis elevados de RSK2 em linhagens celulares com alta capacidade de invasão e também ao correlacionarem a alta expressão de RSK2 em tumores de pacientes com progressão metastática. Em tumores hematológicos, como mieloma múltiplo e algumas leucemias, RSK2 está envolvida no processo tumorigênico (Elf et al. 2011). De forma interessante, um estudo sobre câncer de pulmão metastático identificou diversas quinases relacionadas ao processo de motilidade nesse tipo de tumor, entre elas RSK1. As análises *in vitro* confirmaram esse achado, assim como a observação de que pacientes com tumores sem a expressão de RSK1 apresentaram menor número de metástases (Lara et al. 2011).

No caso de RSK3 e RSK4, foi identificada redução da expressão em diversos tumores, por exemplo, câncer de ovário, colorretal, mama e leucemia mieloide aguda, o que sugere uma possível função antitumoral para essas isoformas (Romeo et al. 2012). Em câncer de ovário ambas as isoformas, quando expressas, induziram a parada do ciclo celular e apoptose (Bignone et al. 2007). De forma geral, acredita-se que RSK1 e RSK2 promovem a proliferação,

crescimento e sobrevivência de células tumorais, enquanto RSK3 e RSK4 atuam como supressoras tumorais (Houles e Roux 2018).

Em GBMs, o papel das RSKs ainda não é bem estabelecido. Sulzmaier et al. (2016) reportaram que a isoforma RSK2 regula a motilidade e invasão, em experimentos *in vitro*. Esse mesmo estudo analisou bancos de dados públicos e identificou aumento da expressão de RSK2 em GBMs de pacientes, além de associar esse achado com doença em estágio avançado e pior sobrevida global.

Em um trabalho recente do nosso grupo, foi avaliado o nível das isoformas de RSK em GBMs de pacientes. Observou-se que aproximadamente metade dos astrocitomas de grau IV (GBMs) apresentavam altos níveis de RSK1 (RSK1^{hi}) quando comparados com o tecido cerebral não tumoral e com astrocitomas de baixo grau (Figura 9, A). Por outro lado, ao avaliar os níveis de RSK2, nenhuma diferença foi observada entre astrocitomas de diferentes graus (Figura 9, B e C). No caso de RSK3, foi visto uma redução da expressão conforme o aumento da malignidade dos astrocitomas, e a expressão de RSK4 não foi identificada nos gliomas analisados (Figura 9, D). Outro resultado relevante foi a detecção de altos níveis de fosforilação de RSK1 no sítio S380, que é necessária para a ativação da proteína, em parte dos GBMs. Assim, é possível afirmar que ocorre aumento da expressão e da ativação de RSK1 em GBMs (Hajj et al. 2020).



Fonte: HAJJ et al. (2020).

Figura 9 - A expressão de RSK1 aumenta em um grupo de GBMs. A expressão de (a) RSK1, (B) RSK2 e (C) RSK3 em astrocitomas foi avaliada por imunohistoquímica, com identificação de maiores níveis de RSK1 em um grupo de astrocitomas de grau IV (GBM). (D) A expressão de RSK3 e RSK4 em GBMs foi avaliada por western blot. Extratos de células LN-18 transfectadas para expressar HA-RSK3 e HA-RSK4 foram usados como controle positivo. Maior quantidade de extrato proteico das amostras de tumores foi aplicada no gel em comparação ao controle positivo. Além disso, os filmes foram superexpostos para detecção das bandas de RSK3 e RSK4. Os níveis de ERK1/2 e a coloração da membrana por Ponceau foram usados como controle de carregamento.

Neste mesmo estudo, foi avaliada a sobrevida dos pacientes de acordo com a expressão de RSK1 (Figura 10), com pior sobrevida para aqueles que apresentaram maior expressão desta isoforma (Hajj et al. 2020).

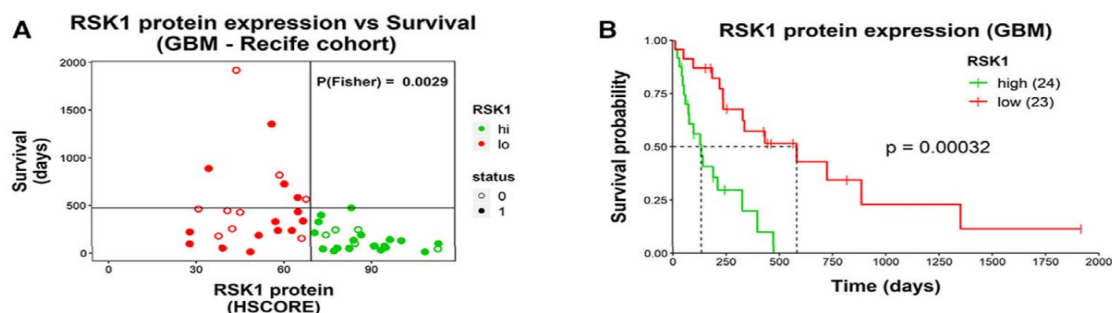


Figura 10 - Alta expressão de RSK1 está associada a pior sobrevida em GBMs. (A) O gráfico mostra a sobrevida para os pacientes de acordo com a expressão de RSK1 (baixa expressão em vermelho e alta expressão em verde). A linha vertical indica o *cutoff* para determinar a expressão de RSK1 e a linha horizontal indica a maior sobrevida observada para o grupo RSK1^{hi}. (B) Curva de sobrevida para pacientes com baixa expressão de RSK1 (em vermelho) ou alta expressão (em verde).

Em resultados anteriores do nosso grupo (não publicados) foi avaliada a expressão das quatro isoformas de RSK em cinco linhagens celulares de GBM (Figura 11). Não foram observadas diferenças no nível de RSK2 entre as linhagens analisadas, enquanto o nível de RSK1 variou de forma importante, inclusive com ausência de detecção na linhagem celular U118-MG. No caso de RSK3, a expressão é baixa ou indetectável, e RSK4 está ausente em todas as linhagens celulares. Estes resultados refletem o que foi observado nos GBMs de pacientes.

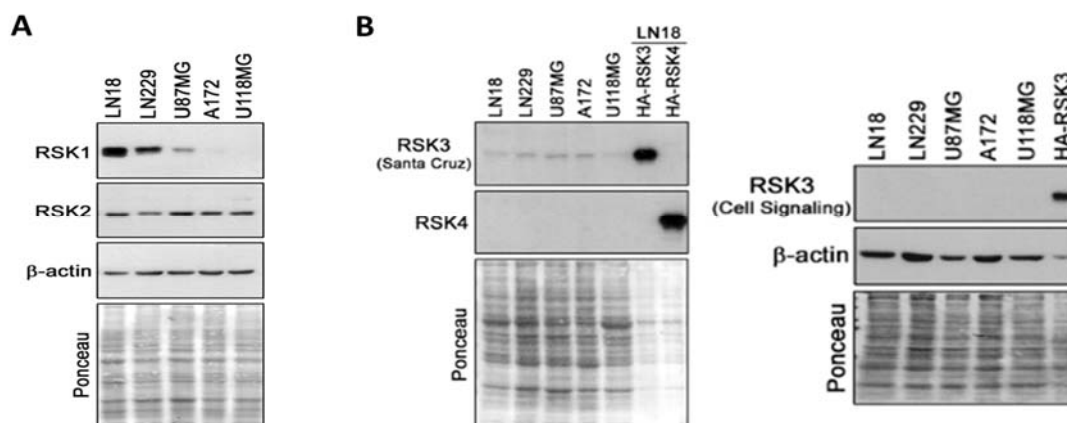


Figura 11 - Níveis das isoformas de RSK em linhagens celulares de GBM. Extratos celulares obtidos das linhagens celulares indicadas foram submetidos à técnica de western blot para detecção das isoformas de RSK. (A) Níveis de RSK1 e RSK2 em diferentes linhagens celulares de GBM. Os níveis de β-actina e a coloração da membrana por Ponceau foram usados como controle de carregamento. (B) Como controle positivo, foram utilizados extratos de células LN-18 transfectadas para expressar HA-RSK3 e HA-RSK4, usando-se para o western blot uma quantidade três vezes menor de extrato em relação ao extrato das outras células. As bandas de RSK3, que apareceram quando a incubação foi feita com o anticorpo anti-RSK3 da Santa Cruz *Biotechnology* (sc-1431), foram identificadas apenas após longo tempo de exposição. Entretanto, ao ser usado o anticorpo da *Cell Signalling* (#9343), a isoforma RSK3 não foi detectada. Os níveis de β-actina e/ou a coloração da membrana por Ponceau foram usados como controle de carregamento.

Com base no que foi apresentado, é possível afirmar que o papel das RSKs no desenvolvimento e manutenção de tumores não é apenas isoforma-específico, mas também varia de acordo com o tipo de tumor. Eles também levantam a possibilidade de que as RSKs podem ter uma função relevante como biomarcadoras em diversos tipos de câncer. De fato, elas surgiram como um alvo promissor para terapias antineoplásicas e o desenvolvimento de diversos inibidores que possuem como alvo o CTKD ou o NTKD já foram descritos. O primeiro composto a ser utilizado foi SL0101, que é um inibidor competitivo de ATP e atua sobre o NTKD das quatro isoformas de RSK (Smith et al. 2005; Bain et al. 2007). Entretanto, ele também atua de forma inespecífica sobre outras quinases. O inibidor BI-D1870, embora seja específico em relação a outras quinases do grupo AGC, também apresenta efeitos sobre outras quinases, o que explica os efeitos *off-target* observados em células de GBM após o uso desses dois inibidores (Roffé et al. 2015). Por sua vez, o inibidor fmk se liga de maneira irreversível no sítio de ligação de ATP, modificando o CTKD das isoformas RSK1, RSK2 e RSK4. No entanto, além de não inibir RSK3, os efeitos do NTKD independentes do CTKD não podem ser inibidos por ele (Aronchik et al. 2014).

Apesar de diversos inibidores terem sido desenvolvidos nos últimos anos, nenhum deles é usado atualmente na clínica, sobretudo devido à inespecificidade (Davies et al. 2015). Além disso, seria interessante o desenvolvimento de inibidores específicos para as diferentes isoformas, devido aos efeitos pró-tumorais e antitumorais que já foram observados para diferentes isoformas, a depender do contexto.

Devido às limitações no uso dos inibidores químicos, estudos anteriores do nosso grupo que buscaram estudar efeitos das isoformas de RSK em GBMs foram conduzidos a partir da geração de células nocautes pelo sistema CRISPR/Cas9. Essas células foram empregadas em experimentos de translatômica, apresentados adiante, que revelaram funções isoforma-específicas para as RSKs.

1.8 TRANSCRIPTÔMICA E TRANSLATÔMICA APLICADAS AO ESTUDO DE GBMS

O desenvolvimento de tecnologias “ômicas” nos últimos anos, como a genômica, a transcriptômica e a proteômica, permitiram um entendimento mais profundo da regulação da expressão gênica (King e Gerber 2014).

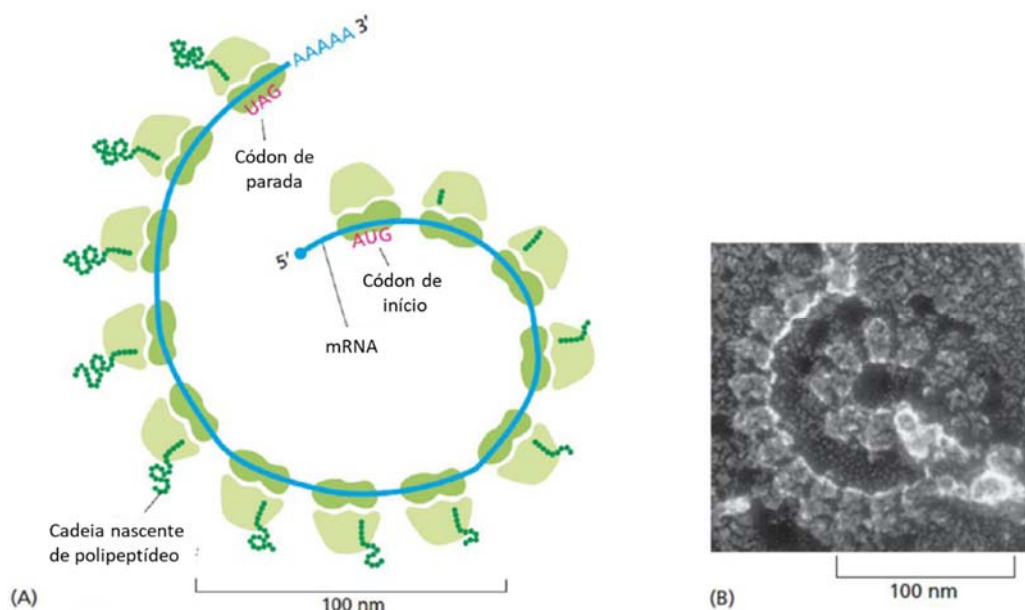
Os estudos baseados em transcriptômica, que analisam os mRNAs na célula (Figura 5), tornaram-se muito comuns porque ferramentas simples estão disponíveis tanto para a extração de RNA quanto para as análises feitas posteriormente, como microarranjo e sequenciamento (RNA-seq). Entretanto, embora as análises de transcriptômica sejam eficientes quando se investiga mudanças na expressão gênica causadas por drogas, hormônios ou por alguma doença, os achados são limitados porque os níveis de mRNA não estão necessariamente correlacionados com os níveis de proteínas. Porém, a análise do transcriptoma é menos complexa do que a análise do proteoma. A ampla diversidade de propriedades físicoquímicas dos aminoácidos, a ocorrência de modificações nas proteínas e a formação de complexos por elas, além de variações em vias de sinalização frente a diferentes estímulos, representam desafios nas análises de proteômica (Altelaar et al. 2012; Aslam et al. 2017). Uma das alternativas usadas pelo TCGA é a técnica de RPPA (do inglês, *reverse-phase protein array*), um ensaio quantitativo que utiliza anticorpos para avaliar múltiplas proteínas em uma amostra. É possível avaliar tanto as proteínas presentes quanto algumas modificações pós-traducionais, no entanto, o número de proteínas analisadas é limitado a algumas centenas (Li et al. 2013).

Em relação a estudos com GBMs, os dados gerados por genômica e por transcriptômica não conseguiram estabelecer uma correlação com parâmetros clínicos. Assim, do ponto de vista clínico, quase nenhum benefício foi gerado para os pacientes acometidos pela doença e, portanto, novas abordagens são indispensáveis.

A compreensão da tradução como um importante mecanismo de controle da expressão gênica e as limitações apresentadas nas análises de transcriptômica levaram ao aperfeiçoamento dos métodos de translômica, que permitem a análise do transloma, ou seja, apenas dos mRNAs ativamente traduzidos na célula (Figura 5). Estudos que exploraram essa estratégia tiveram início na década de 1970, porém tornaram-se mais comuns apenas nos últimos anos, atingindo uma escala global (Piccirillo et al. 2014; Zhao J et al. 2019). Além deles contribuírem para descobertas de novos princípios e mecanismos da tradução, eles também podem auxiliar no entendimento das diferenças observadas entre análises de transcriptômica e de proteômica (Chassé et al. 2017).

Uma das técnicas utilizadas para estudar o transloma é o perfil polissomal. Os mRNAs podem ter sequências longas, consistindo em milhares de bases, porém os ribossomos associam-se apenas com vinte a trinta nucleotídeos de cada vez (Ingolia 2016). Por isso, é possível que mais de um ribossomo esteja associado a um mesmo mRNA, resultando em uma estrutura chamada de polirribossomo ou polissomo (Figura 12). Quanto mais ribossomos estiverem associados a um mRNA, maior será a massa do polissomo. Baseado nisso, é possível

separar os polissomos que possuem quantidades diferentes de ribossomos por meio de um gradiente de sacarose, em que os polissomos com maior quantidade de ribossomos associados sedimentam mais no gradiente do que os polissomos com menor quantidade de ribossomos, cuja tradução não é considerada tão eficaz (Pringle et al. 2019). Isso corresponde ao princípio do perfil polissomal, que será apresentado em detalhes na seção Material e métodos.



Fonte: Adaptado de Alberts et al. (2004).

Figura 12 - Esquema de um polissomo. (A) Esquema de uma molécula de mRNA com diversos ribossomos associados, constituindo um polissomo. (B) Microscopia eletrônica de um polissomo.

1.8.1 Translatômica em GBMs de pacientes

Como comentado anteriormente, análises que empregaram a transcriptômica e a proteômica não se refletiram em benefícios clínicos para os pacientes com GBM. Assim, nosso grupo está envolvido em um projeto que visa investigar o transloma de GBMs de pacientes. Resultados parciais revelaram que a análise do mRNA associado a polissomos (poly mRNA) consegue separar claramente os GBMs em *clusters* bem definidos e com características particulares (Figura 13, A e B). Por outro lado, a existência de *clusters* baseados em mRNA total (equivalente à transcriptômica) não é tão clara (Figura 13, D e E), como observado nos estudos do TCGA. Por isso, ao avaliar a sobrevida, não foi possível fazer a análise a partir dos dados obtidos com o mRNA total. Entretanto, de forma importante, os *clusters* baseados no mRNA polissomal apresentaram diferenças na sobrevida (Figura 13, C). Além disso, a separação em *clusters* a partir dos resultados da translatômica indicou que diferentes mRNAs estão enriquecidos em cada um deles (Figura 13, B): mRNAs relacionados a mTOR (*cluster*

TOR, em verde), enriquecimento de mRNAs mitocondriais (*cluster* MIT, em azul) e enriquecimento de mRNAs de cílio primário (*cluster* CIL, em vermelho).

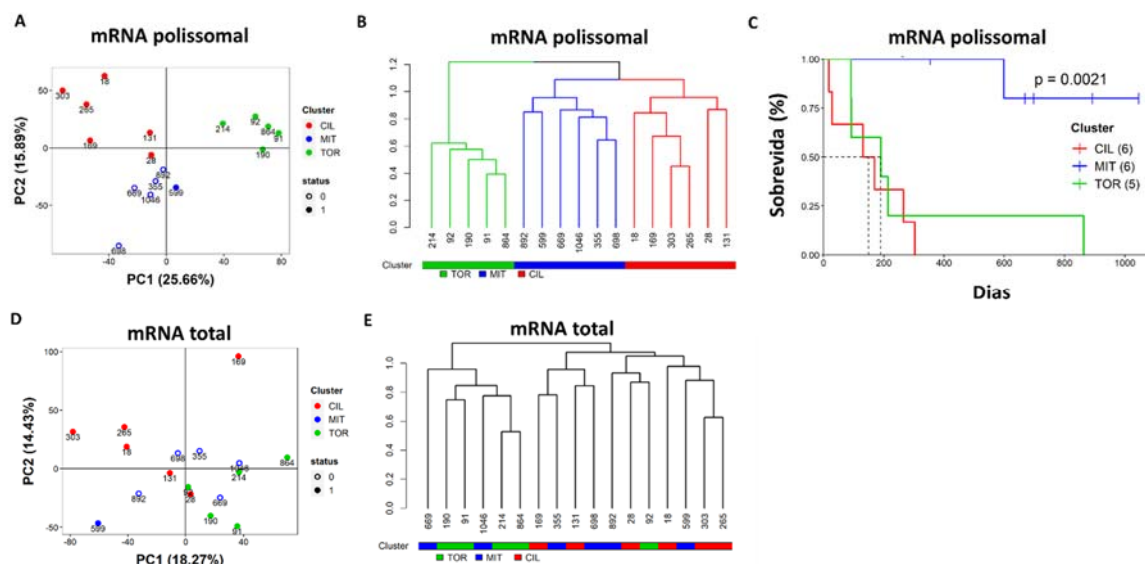


Figura 13 - Separação de pacientes portadores de GBM em diferentes *clusters* a partir das análises da translômica. Análise de componentes principais (PCA) a partir dos dados da (A) translômica e (D) transcriptômica. Os números nos gráficos indicam a sobrevida (em dias) e os círculos abertos (*status* 0) indicam os pacientes censurados. (B) Separação dos pacientes em diferentes *clusters* (TOR, em verde; MIT, em azul e CIL, em vermelho) a partir da translômica e (E) a partir da transcriptômica. (C) Análise de sobrevida para os *clusters* obtidos da translômica (dados não publicados).

Interessantemente, o *cluster* TOR, um dos que apresentou pior sobrevida, foi caracterizado pelo enriquecimento de mRNAs de proteínas ribossomais, que possuem, em sua maioria, a sequência 5'TOP (5'TOP mRNAs) (Figura 14). É importante mencionar que mTORC1 regula a tradução dos 5'TOP mRNAs e que, de fato, foi observado enriquecimento do mRNA de Raptor, um importante regulador positivo da função de mTORC1, e da proteína 1 relacionada a La (LARP1) (Figura 14), que regula a tradução dessa família de mRNAs e é outro alvo de mTORC1 (Fonseca et al. 2015; Lahr et al. 2017). Como resultados interessantes acerca da regulação dos 5'TOP mRNAs também foram previamente identificados pelo nosso grupo em análises de translômica com as células nocautes para RSK, será feita uma breve apresentação sobre essa família de mRNAs antes da discussão destes resultados.

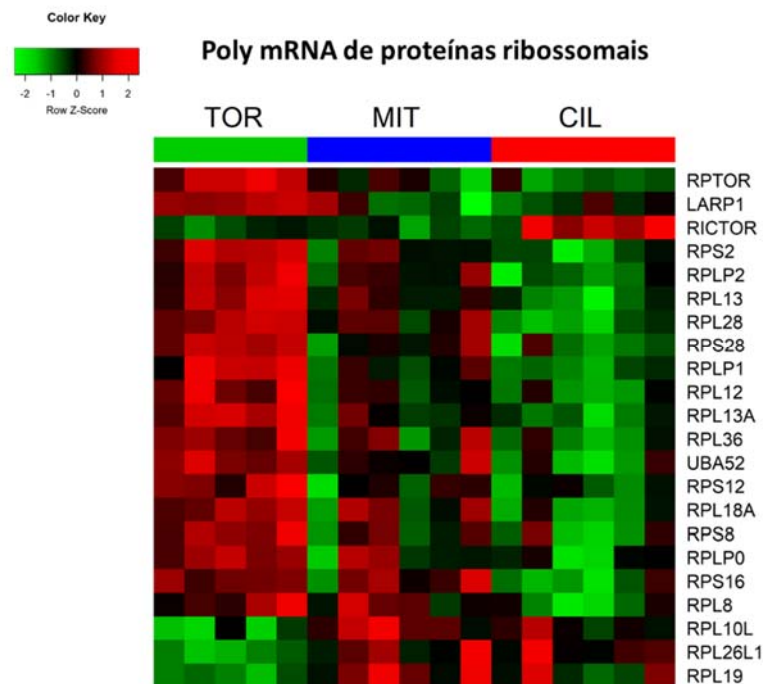


Figura 14 - Transcritos que codificam proteínas ribossomais são diferencialmente expressos no mRNA associado com polissomos em GBMs. O *heatmap* apresenta a expressão de mRNAs que codificam proteínas ribossomais a partir de mRNA purificado de polissomos. A maioria desses mRNAs possuem a sequência 5'TOP. Também se observa a expressão de proteínas relacionadas à regulação da função de mTORC1 e de LARP1, um dos alvos de mTORC1.

1.8.2 Família de mRNAs com sequência 5'TOP

A sequência 5'TOP (do inglês, *5'terminal oligopyrimidine tract*) é encontrada na região 5' não traduzida dos mRNAs (5'UTR) e possui função reguladora. Os componentes da família de mRNAs 5'TOP são caracterizados pela presença de um resíduo de citosina após o *cap*, seguido por uma sequência ininterrupta de quatro a quinze pirimidinas; proporção similar de resíduos de citosina e de uracila nessa sequência; e região rica em G-C *downstream* à sequência 5'TOP (Meyuhas e Kahan 2015). Atualmente 97 mRNAs possuem a sequência 5'TOP, que é encontrada em quase todos os mRNAs que codificam proteínas ribossomais e fatores de tradução (Philippe et al. 2020). Na Figura 15 está destacada a sequência 5'TOP de dois mRNAs 5'TOP, *PABPC4* e *RPS11*, que codificam a proteína citoplasmática 4 de ligação a poli(A) e a proteína ribossomal S11, respectivamente.

PABPC4: 5' **CUCUCUC**gc cccgggucgc ugccgccucc 3'

RPS11: 5' **CUUUUUU**ca ggcggccggg aagatggcgg 3'

Figura 15 - Sequência 5'TOP dos mRNAs *PABPC4* e *RPS11*. São mostrados os 30 primeiros nucleotídeos dos mRNAs de *PABPC4* e *RPS11*, com destaque para a sequência 5'TOP. As sequências foram obtidas da base de dados *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

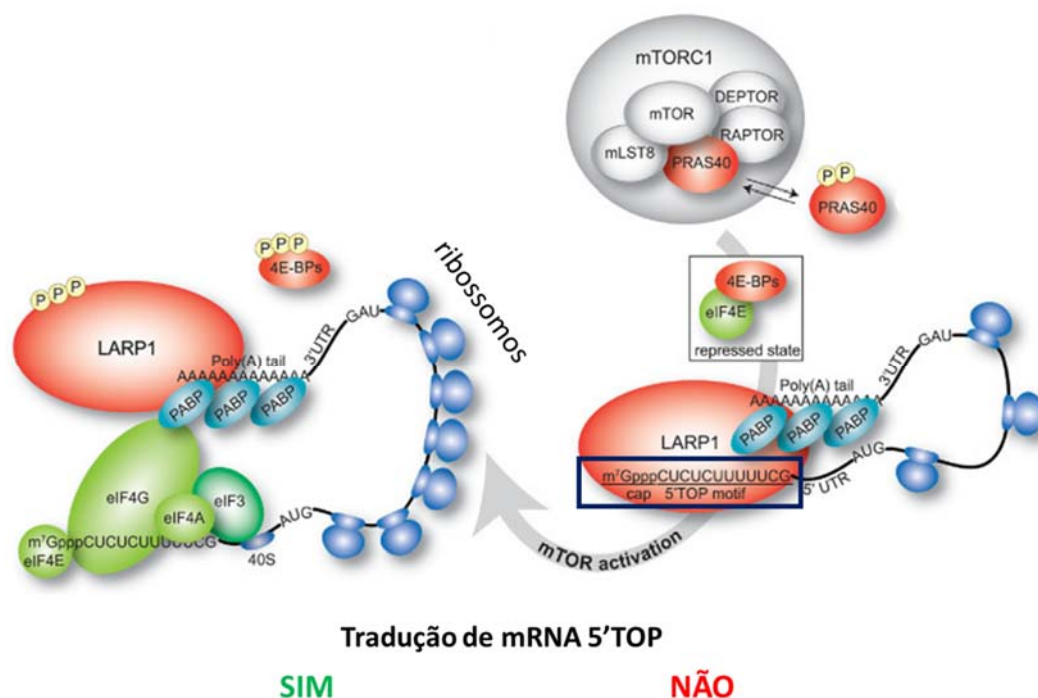
Diversos fatores influenciam a tradução dos 5'TOP mRNAs, como estímulos durante a mitose, fatores de crescimento e disponibilidade de oxigênio e de aminoácidos. No primeiro caso, quando as células param de proliferar e, conseqüentemente, não precisam aumentar a quantidade de ribossomos, é necessário que um mecanismo eficiente de controle promova a redução da produção dos constituintes ribossomais. Assim, a tradução de 5'TOP mRNAs é reprimida quando o ciclo celular é interrompido e as células permanecem na fase G0. Ao contrário, em condições ótimas para a célula, com disponibilidade de nutrientes e oxigênio, a tradução está ativada e ocorre com máxima eficiência. Ainda assim, apenas cerca de 30% dos 5'TOP mRNAs são encontrados em complexos de ribonucleoproteínas nessas condições. No caso de privação de nutrientes ou de oxigênio, a quantidade de 5'TOP mRNAs traducionalmente ativos cai pela metade. Dessa forma, a sequência 5'TOP é um elemento essencial para a repressão da tradução durante a parada do ciclo celular e a carência de nutrientes, além de inibir a biogênese de ribossomos, que demanda grande gasto de energia (Damgaard e Lykke-Andersen 2011). Apesar da sua importante função, os mecanismos de regulação desses mRNAs não foram completamente elucidados (Meyuhas e Kahan 2015). Porém, sabe-se que o controle da tradução dos 5'TOP mRNAs, ao menos em grande parte, é regulado pela via de sinalização de mTORC1 (Fonseca et al. 2018).

A reativação da tradução de 5'TOP mRNAs após disponibilização de fatores de crescimento ou de aminoácidos para células privadas desses fatores é dependente da via PI3K/AKT/mTORC1 (Stolovich et al. 2002; Patursky-Polischuk et al. 2009). Foi demonstrado que a deleção de TSC1 e/ou TSC2 e a superexpressão de Rheb são capazes de promover a ativação da tradução de 5'TOP mRNAs mesmo na ausência de oxigênio. Isso sugere que os sinais desencadeados por mitógenos, aminoácidos e pela presença de oxigênio convergem no complexo TSC1/2 e, através de Rheb, são transduzidos até mTORC1 (Miloslavski et al. 2014). Corroborando esses achados, estudos que utilizaram inibidores farmacológicos de mTORC1

reportaram uma pronunciada repressão da tradução de mRNAs 5'TOP e que eles são os mRNAs mais sensíveis à inativação de mTORC1 (Terada et al. 1994; Jefferies et al. 1994; Thoreen et al. 2012; Hsieh et al. 2012). No entanto, por muito tempo foram feitos trabalhos na tentativa de estabelecer os mecanismos da regulação a partir de mTORC1, o que começou a ser esclarecido nos últimos anos.

Inicialmente, foram utilizadas análises de proteômica para identificar proteínas que estariam relacionadas à regulação da tradução dos 5'TOP mRNAs, de maneira dependente de mTORC1. Entre as proteínas encontradas, LARP1 surgiu como uma candidata a desempenhar essa função. Foi observado que LARP1 é capaz de se unir à região 5'*cap* dos mRNAs com sequências 5'TOP por meio da associação com PABP. Além disso, LARP1 se associa tanto com monossomos quanto com polissomos, sugerindo que a associação com o mRNA ocorre precocemente durante o processo de tradução (Tcherkezian et al. 2012).

No entanto, posteriormente foi demonstrado que, na verdade, LARP1 atua regulando a estabilidade dos 5'TOP mRNAs e inibindo sua tradução. A interação de LARP1 com a estrutura 5'*cap* impede a ligação de eIF4E e, consequentemente, a interação de eIF4F com o mRNA (Fonseca et al. 2015; Lahr et al. 2017). Além disso, LARP1 foi identificada recentemente como um alvo de mTORC1, e essa interação contribui para a regulação da tradução dos 5'TOP mRNAs (Figura 16). A proteína LARP1 se associa com RAPTOR quando mTORC1 está ativo. Por outro lado, quando mTORC1 está inativo, LARP1 se dissocia de mTORC1 e se liga à sequência 5'TOP, com consequente repressão da tradução dos 5'TOP mRNAs (Fonseca et al. 2015). Isso ocorre por meio da região D15 localizada na região C-terminal e específica da família de proteínas LARP (Lahr et al. 2015, 2017). Confirmando esses achados, foi demonstrado que a redução dos níveis de LARP1 através de RNA de interferência atenuou os efeitos inibitórios de rapamicina, Torin1 e de privação de aminoácidos sobre a tradução dos 5'TOP mRNAs (Fonseca et al. 2015). Dessa maneira, a interação entre LARP1 e mTORC1 é fundamental para controlar a síntese de ribossomos e de fatores de tradução, sendo outro alvo de mTORC1 relacionado ao processo de tradução, assim como 4E-BP1 e S6K1.



Fonte: Adaptado de Fonseca et al. (2018).

Figura 16 - Controle da tradução de mRNAs com sequência 5'TOP pela proteína LARP1. LARP1 se associa com a proteína de ligação à cauda poli(A) (PABP), conferindo estabilidade ao mRNA 5'TOP. Ela também inibe a tradução, ao se ligar ao *cap* e à sequência 5'TOP do mRNA, o que ocorre quando mTORC1 está inativo (à direita). Após a ativação de mTORC1, LARP1 se dissocia da extremidade 5' do mRNA. Isso permite a ligação de eIF4E ao *cap*, etapa necessária para dar início à tradução (à esquerda).

1.8.3 Translatômica em linhagens celulares de GBM

Um trabalho anterior do nosso grupo investigou a regulação da tradução em GBMs, particularmente pela família de proteínas RSK, na linhagem celular LN-18. Como comentado anteriormente, uma das principais limitações em estudos que abordam as funções das RSKs é o fato de que os inibidores químicos disponíveis possuem efeitos inespecíficos sobre a via de mTORC1, dificultando o correto entendimento do real efeito das RSKs nesta via. Por isso, optou-se por gerar células LN-18 nocautes para RSK1, RSK2 e RSK1/2 (DKO), através do sistema CRISPR/Cas9 (referidas no texto como células LN-18^{CRISPR}). As células foram tratadas com Torin1, para análise dos efeitos das RSKs que são dependentes e independentes de mTORC1, e os extratos foram submetidos ao perfil polissomal. Posteriormente, o mRNA obtido nas frações do perfil polissomal e o mRNA total foram analisados por microarranjo e a análise do transloma foi feita pelo pacote anota2seq, que identifica diferenças na eficiência da tradução que se refletem nos níveis proteicos (Oertlin et al. 2019). Observou-se que as isoformas RSK1 e RSK2 regulam diferentes conjuntos de mRNAs. Entre eles, os resultados

apontaram que a regulação da tradução de 5'TOP mRNAs ocorre através da isoforma RSK1, porém apenas quando mTORC1 está inativado (Figura 17).

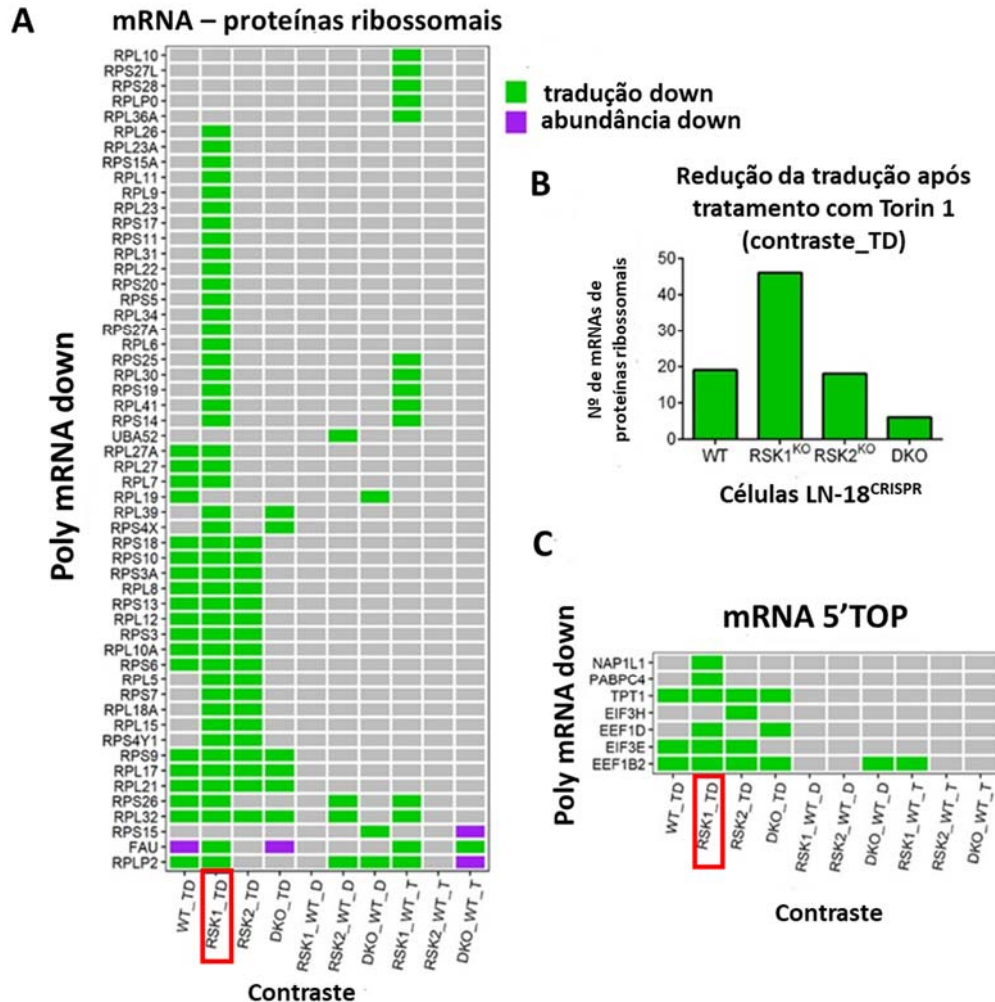


Figura 17 - Regulação da tradução de 5'TOP mRNAs pela isoforma RSK1. (A) Na translômica, a análise dos genes diferencialmente expressos a partir do mRNA polissomal foi feita por meio de contrastes entre as diferentes células LN-18^{CRISPR} e os diferentes tratamentos (DMSO ou Torin1). Por exemplo, o contraste RSK1_TD (destacado em vermelho) representa mRNAs reduzidos após o tratamento com Torin1 nas células LN-18^{CRISPR} RSK1^{KO}. O gráfico apresenta a variação dos níveis de mRNA associados com polissomos (poly mRNA) que codificam proteínas ribossomais (as quais possuem, em sua maioria, a sequência 5'TOP) nos diferentes contrastes analisados. No contraste em destaque, RSK1_TD, observa-se maior quantidade de mRNAs com sequência 5'TOP com tradução reduzida, indicando que essa redução ocorre em células RSK1^{KO} quando elas são tratadas com Torin1, ou seja, quando mTORC1 está inativo. (B) Maior redução da tradução em células RSK1^{KO} após tratamento com Torin1, quando comparadas às demais células LN-18^{CRISPR}. (C) A redução na tradução de outros 5'TOP mRNAs também foi mais proeminente em células RSK1^{KO} após tratamento com Torin1 (destacado em vermelho).

Neste estudo, investigamos mais profundamente o envolvimento da isoforma RSK1 na regulação dos 5'TOP mRNAs, dando continuidade aos resultados apresentados previamente. Inclusive, isso pode estar relacionado a um mecanismo de resistência ao uso de inibidores de mTORC1 no tratamento de GBMs, já que a presença da isoforma RSK1 garantiria a tradução dos mRNAs 5'TOP mesmo após inativação de mTORC1. O entendimento da regulação da tradução desses mRNAs em GBMs é relevante também quanto a aspectos clínicos, porque, como apresentado, os mRNAs de proteínas ribossomais estão enriquecidos num dos *clusters* de pacientes que apresentou pior sobrevida nas análises baseadas no translatooma.

Além disso, diversos experimentos prévios do nosso grupo, além da translátômica, foram feitos com as células LN-18^{CRISPR}. No entanto, as diferentes linhagens celulares humanas de GBM possuem características distintas entre si (Ishii et al. 1999) e, por isso, os resultados obtidos a partir de experimentos com uma linhagem nem sempre podem ser extrapolados para outra. Por exemplo, as células LN-229 expressam a isoforma RSK1, porém em níveis menores que LN-18 (Figura 11). Além disso, elas possuem menores níveis de ativação de AKT/mTORC1 do que as células LN-18 (Roffé et al. 2015). Assim, trabalhamos na geração de outra linhagem celular nocaute para as isoformas das RSKs, a LN-229, que se apresentou como uma opção adequada para esse objetivo por apresentar níveis detectáveis de RSK1 e RSK2 (Figura 11). Dessa maneira, seria possível validar achados anteriores e gerar mais um modelo útil para o entendimento das funções biológicas das RSKs em GBMs.

O presente estudo busca compreender melhor mecanismos moleculares relacionados à tradução que estão alterados nos GBMs, com o potencial de identificação de novos alvos moleculares para o tratamento e/ou a identificação de novas funções biológicas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o papel das RSKs na fosforilação de alvos relacionados à síntese de proteínas e na regulação da tradução de mRNAs com sequência 5'TOP em GBMs.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Gerar uma linhagem celular humana de GBM (LN-229) nocaute para as isoformas RSK1 e/ou RSK2, por meio do sistema CRISPR/Cas9.
- ✓ Investigar os efeitos da depleção das isoformas de RSK nas vias de sinalização Ras/ERK/RSK e PI3K/AKT/mTORC1, utilizando as células LN-229 nocaute para RSK1 e/ou RSK2, e também linhagens celulares de GBM que expressam níveis distintos de RSK1.
- ✓ Analisar os efeitos da perda das isoformas das RSKs na tradução nas células LN-229 nocaute para RSK1 e/ou RSK2.
- ✓ Investigar os efeitos da regulação traducional de mRNAs com sequência 5'TOP, de maneira dependente da família de quinases RSK, utilizando as células LN-18^{CRISPR} e linhagens celulares de GBM que expressam diferentes níveis de RSK1.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CULTURA CELULAR

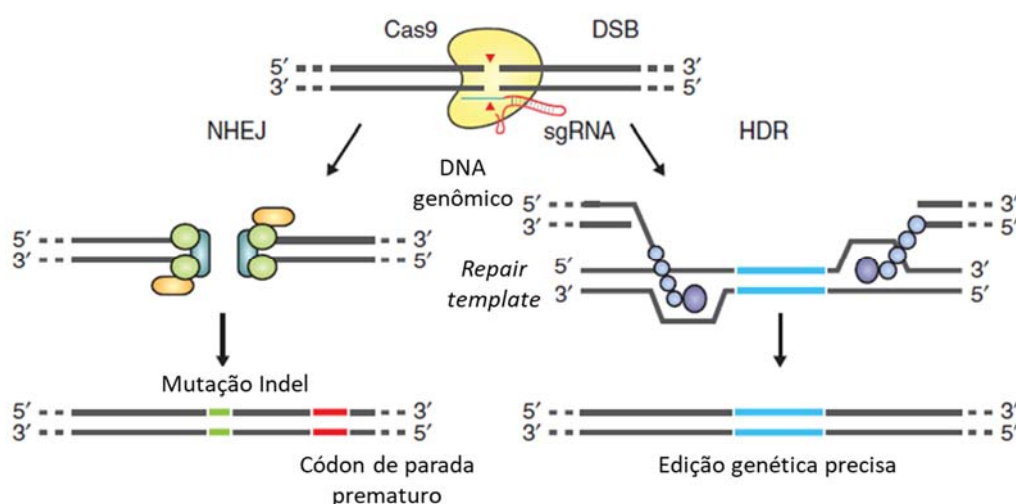
Foram usadas linhagens celulares derivadas de GBM obtidas da empresa *American Type Culture Collection* (ATCC). As linhagens comerciais utilizadas foram: LN-18 (homem, 65 anos; ATCC® CRL-2610™); LN-229 (mulher, 60 anos; ATCC® CRL-2611™); U87-MG (homem, idade desconhecida; ATCC® HTB-14™); A172 (homem, 53 anos; ATCC® CRL-1620™); e U118-MG (homem, 50 anos; ATCC® HTB-15™). Também foram usadas células LN-18 nocautes para as isoformas RSK1, RSK2 e duplo nocaute para RSK1 e RSK2 (DKO), geradas pela técnica de CRISPR/Cas9 em um trabalho prévio do grupo (células LN18^{CRISPR}).

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 do antibiótico Garamicina (Hipolabor Farmacêutica), em estufa úmida, a 37 °C e 5% de CO₂.

3.2 GERAÇÃO DA LINHAGEM CELULAR LN-229 NOCAUTE PARA AS ISOFORMAS RSK1 E RSK2

A geração de células nocautes foi feita por meio da técnica de edição do genoma CRISPR/Cas9, segundo o protocolo descrito por Ran et al. (2013) com pequenas modificações. Essa técnica consiste no direcionamento da endonuclease Cas9 a um sítio específico na sequência de DNA, através de pequenas sequências de RNA, chamadas de RNA guia (sgRNA). Elas são capazes de parear com a região do genoma complementar a sua sequência, permitindo que a Cas9 seja corretamente direcionada e atue clivando a fita de DNA. Em consequência, a quebra na fita dupla de DNA ativa os mecanismos de reparo de dano ao DNA na célula. Há dois tipos de mecanismos que podem ocorrer: junção de pontas não homólogas (NHEJ) ou *Homology-Directed Repair* (HDR). No caso do NHEJ o dano ao DNA é corrigido por inserções ou deleções na sequência de DNA, resultando em mutações do tipo indel. Se essas modificações resultarem em mutações de perda de sentido, alteração da fase aberta de leitura ou geração de um códon de parada prematuro, ocorrem alterações no mRNA formado, que resultam em sua

degradação e/ou perda da expressão normal da proteína. Assim, são induzidas alterações genéticas permanentes e os nocautes de interesse são gerados com sucesso. Na presença de um *repair template*, o reparo ocorre através do processo de HDR, que é menos propenso a erros, pois, em geral, não resulta em mutações. Após a quebra da fita dupla, ocorre o recrutamento de proteínas para a região da quebra, que invadem a fita de DNA intacta, buscando regiões de homologia (Figura 18).



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

Figura 18 - Técnica de CRISPR/Cas9. O princípio da técnica de CRISPR/Cas9 para geração de células nocautes é o direcionamento da enzima Cas9 a uma região específica do genoma por meio de sgRNAs, com clivagem da fita dupla de DNA. Em consequência, a célula pode ativar dois mecanismos de reparo de danos ao DNA, a junção de pontas não homólogas (NHEJ) ou *Homology-Directed Repair* (HDR). A correção do dano ao DNA pela NHEJ é feita através de inserções ou deleções de bases, o que resulta em mutações do tipo indel. Se essas mutações provocarem perda de sentido, alteração da fase aberta de leitura ou geração de um códon de parada prematuro, o mRNA não será corretamente traduzido e a proteína não será expressa. Já na presença de um *repair template*, o mecanismo de reparo ativado pela célula é o HDR.

Neste trabalho, a técnica de CRISPR/Cas9 foi usada com o objetivo de gerar células LN-229 nocautes para RSK1, RSK2 e duplo nocautes RSK1 e RSK2 (identificadas adiante como células LN229^{CRISPR}). As sgRNAs foram geradas por meio de uma ferramenta disponível em <http://crispr.mit.edu/> e foram desenhadas para terem como alvo os primeiros éxons dos genes de RSK1 e RSK2 (genes *RPS6KA1* e *RPS6KA3*, respectivamente). O uso dos primeiros éxons como alvo é estratégico, pois reduz as chances de que proteínas truncadas, que ainda poderiam desempenhar alguma ação, sejam sintetizadas pela célula. Além disso, um fator que contribui para a especificidade da técnica é a sequência PAM, uma sequência curta de DNA localizada após a sequência-alvo. Ela é específica para endonucleases de diferentes microrganismos e é necessária para que a clivagem aconteça. No caso da Cas9 de *Streptococcus*

pyogenes essa sequência corresponde a 5'-NGG, o que foi levado em consideração para o desenho das sgRNAs para ambos os genes. As sgRNAs foram inseridas em um 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)].

Para cada um dos genes a ser alterado, foram desenhadas duas sgRNAs diferentes, o que também é estratégico. Isso permite comparar os efeitos observados nas células nocaute geradas por cada par de guias e excluir a possibilidade de que sejam resultados de efeitos *off-target* em outras regiões do genoma. As guias foram nomeadas A e B e seu éxon alvo e sequência são mostrados na Tabela 2. As definições *top* e *bottom* correspondem aos oligos de DNA sintetizados para serem inseridos nos plasmídeos contendo *overhangs* após o corte com a enzima de restrição BbsI.

Tabela 2 - Sequências das guias A e B para os genes *RPS6KA1* e *RPS6KA3*

Gene	sgRNA	Éxon alvo	Sequência
<i>RPS6KA1</i>	A	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
<i>RPS6KA1</i>	B	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
<i>RPS6KA3</i>	A	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
<i>RPS6KA3</i>	B	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

Os plasmídeos gerados foram transfectados nas células usando-se Lipofectamina 2000® (Invitrogen; 4 µl em 3 ml de meio Opti-MEM®) e 4 µg de DNA em placa de 60 mm, por condição. Foram usadas as seguintes condições: plasmídeo controle sem resistência à puromicina; vetor vazio (sem sgRNA); sgRSK1 A; sgRSK2 A; sgRSK1 A + sgRSK2 A; sgRSK1 B; sgRSK2 B; e sgRSK1 B + sgRSK2 B. Nas condições em que foram empregadas as duas guias simultaneamente, usou-se 2 µg de cada uma delas, para totalizar 4 µg.

A transfecção foi realizada por cinco horas, com retirada do meio Opti-MEM® e substituição pelo meio normal de cultivo. Após 48 horas, as células foram tratadas com 1,0 µl do antibiótico puromicina 1,0 µg/µl (Thermo Fisher Scientific), valor obtido a partir de uma curva de sensibilidade para puromicina realizada previamente. Para seleção das células

contendo o plasmídeo, o meio contendo antibiótico foi trocado a cada dois dias, até o momento em que as células transfectadas com plasmídeo sem resistência morreram, o que foi observado em quatro dias.

Após a seleção, as células foram deixadas por 24h em meio normal de cultivo para recuperação. Depois disso, a expressão de RSK1 e RSK2 foi avaliada no *pool* de células transfectadas com cada conjunto de guias, com o objetivo de verificar se o experimento funcionou e evitar que fossem posteriormente avaliadas apenas células que não são nocaute (Figura 19). É possível observar redução das isoformas RSK1 e RSK2 nas células transfectadas com sgRSK1 e/ou sgRSK2 quando comparado às células controle, que foram transfectadas com plasmídeo vazio. Assim, seguiu-se com o isolamento dos clones derivados de uma única célula, em que 500 células de cada condição foram plaqueadas em uma placa de 100 mm. A placa permaneceu em estufa úmida a 37 °C até a formação de colônias derivadas de uma única célula. Após o tempo necessário, as colônias individuais foram transferidas para uma placa de 24 micropoços com auxílio de uma micropipeta. No momento em que foi observada confluência de 80% em cada poço, os clones foram expandidos em placas cada vez maiores até a obtenção de quantidade suficiente de material para fazer um extrato proteico.

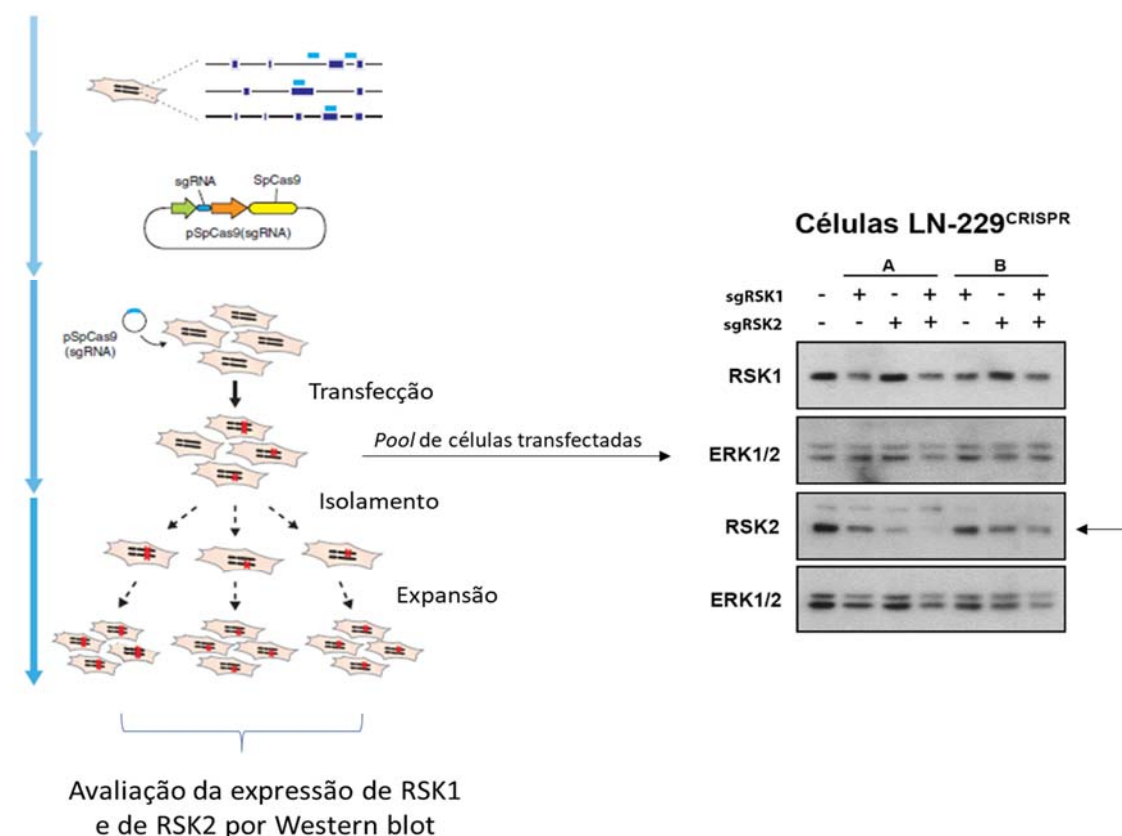


Figura 19 - Geração das células nocautes para RSK1 e RSK2. Após confecção dos plasmídeos contendo a sgRNA para o gene de interesse (RSK1 ou RSK2), as células foram transfectadas com 4 µg total de DNA por placa, em que foi adicionado também 4 µl de Lipofectamina 2000® e 3 ml de meio Opti-MEM®. Após seleção das células transfectadas com o antibiótico puromicina (1,0 µg/µl - Thermo Fisher Scientific), elas foram deixadas em meio normal de cultivo para recuperação. Antes de iniciar a etapa de isolamento dos clones, a expressão de RSK1 e RSK2 foi analisada no *pool* de células transfectadas com plasmídeo vazio e sgRSK1 e/ou sgRSK2 dos dois conjuntos de guias, A e B. A seta indica a banda específica referente à proteína RSK2. ERK1/2 foi usada como proteína normalizadora. Após essa avaliação, as células foram submetidas a subsequentes expansões e, depois de crescerem em quantidade suficiente para obtenção de extratos proteicos, a expressão de RSK1 e RSK2 em células derivadas de um único clone foi avaliada por western blot.

3.2.1 Superexpressão de RSK3 E RSK4

Como parte de estudos anteriores do nosso grupo, foi demonstrado que células LN-229 selvagens, bem como as células LN-18, U87, A172 e U118-MG, possuem níveis muito baixos ou indetectáveis das isoformas RSK3 e RSK4. Para avaliar se houve alteração nos níveis dessas isoformas nas células LN-229^{CRISPR}, a expressão de RSK3 e RSK4 foi avaliada por western blot. Como controle positivo, foram usadas células LN-229 selvagens transfectadas com plasmídeo para expressar HA-RSK3 e HA-RSK4. Para isso, foram plaqueadas $3,0 \times 10^5$ células em placas de 60 mm (Corning). No dia seguinte, as células foram carenciadas de SFB e assim mantidas por 24 horas, para realização da transfecção. Os plasmídeos foram transfectados nas células usando-se

Lipofectamina 2000® (Invitrogen; 4 µl em 3 ml de meio Opti-MEM®) e 4 µg de DNA em cada placa de 60 mm. A transfecção foi feita por cinco horas e após esse tempo o meio Opti-MEM® foi trocado pelo meio normal de cultivo. Depois de um período de recuperação de 24 horas, foram feitos os extratos para serem aplicados no western blot. Foi aplicada uma quantidade três vezes menor de extrato obtido das células transfectadas em relação ao extrato obtido das células LN-229^{CRISPR}.

3.2.2 Avaliação das vias de sinalização

Torin1 é um inibidor potente e seletivo do sítio ativo de mTOR, atuando tanto sobre mTORC1 quanto mTORC2 (Thoreen et al. 2009). Neste trabalho, Torin1 foi utilizado também em ensaios de avaliação da sinalização celular das células LN-229^{CRISPR} e das linhagens celulares LN-18, LN-229, U87-MG, A172 e U118-MG, para determinar efeitos das RSKs dependentes e independentes de mTORC1.

Para realização dos ensaios, foram plaqueadas $3,0 \times 10^5$ células em placas de 60 mm (Corning). As células foram carenciadas de SFB por 48 horas e, após esse tempo, foram tratadas com veículo (DMSO) ou Torin1 (250 nM) por 30 minutos, em estufa úmida a 37 °C. Em seguida, foram estimuladas por 15 minutos, também em estufa úmida a 37 °C, com PMA na concentração de 100 ng/mL (do inglês, *phorbol-12-myristate-13-acetate* - LC Laboratories). O PMA ativa a via RAS/ERK/RSK (Tee et al. 2003). Seguiu-se então com a preparação dos extratos e análise por western blot.

3.2.3 Preparação dos extratos celulares e quantificação das proteínas

O meio de cultura foi removido das placas de células e estas foram lavadas duas vezes com PBS gelado. As células, mantidas sobre gelo, foram lisadas com 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; coquetel de inibidores de fosfatase - Thermo Fisher Scientific; coquetel de inibidores de protease - Roche), cujo volume aplicado nas placas variou de acordo com a quantidade de células em cada uma. Em seguida, com o auxílio de um *cell scraper* (raspador), as placas foram raspadas e o conteúdo obtido foi centrifugado a 14000 RPM (centrífuga 5427R, Eppendorf) por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e utilizado para determinar a concentração de proteínas presentes nas amostras, que foi feita pelo método de Bradford, em placa de 96 poços. Para a quantificação, foi feita uma curva-padrão com 1 mg/mL BSA (Sigma Aldrich) e foi usado o reagente Protein Assay Dye Reagent Concentrate®

(Bio-Rad). A absorbância do conteúdo dos poços foi medida em um leitor de placa i-Mark (Bio-Rad) a 595 nm. Ao final, as amostras a serem analisadas por western blot foram preparadas com 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), nas proporções adequadas.

3.3 WESTERN BLOT

As amostras previamente preparadas foram aquecidas a 95 °C durante cinco minutos para desnaturação das proteínas. Em seguida, elas foram adicionadas a um gel SDS-PAGE, de porcentagens diferentes (8% a 14%), de acordo com o peso molecular da proteína analisada.

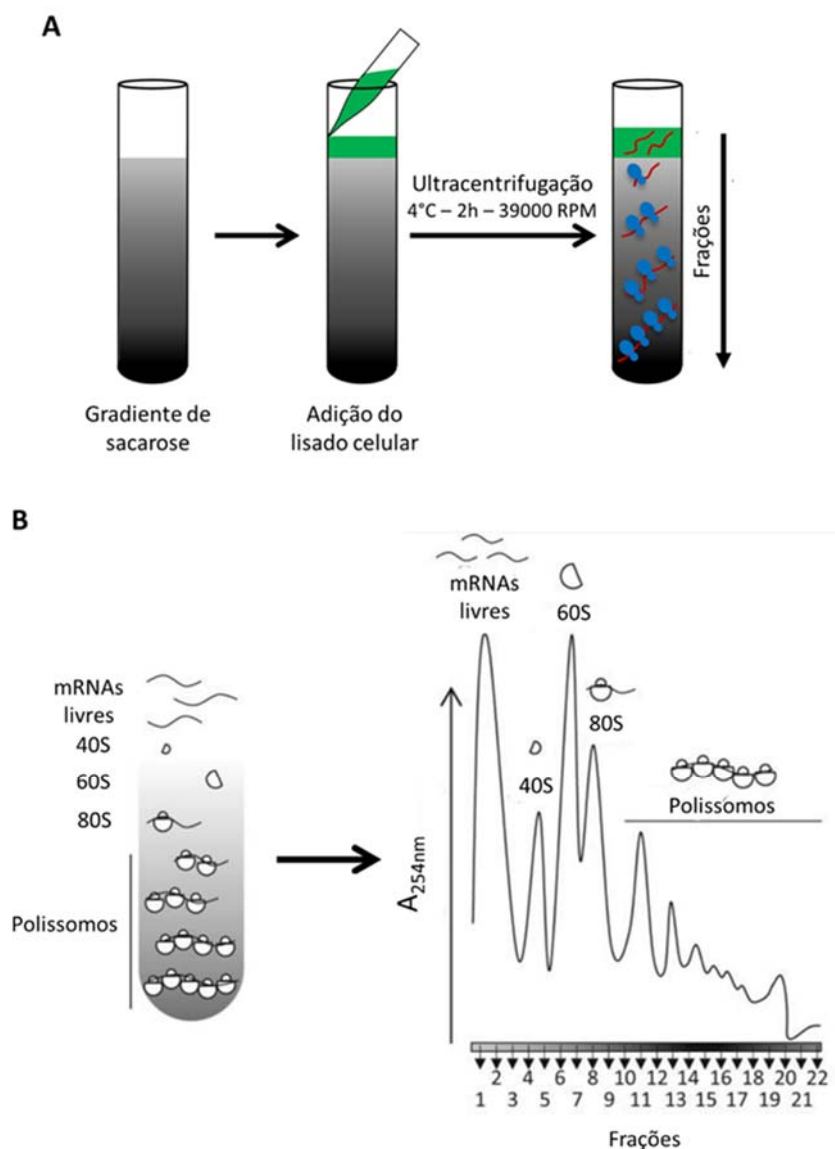
As amostras foram aplicadas em gel SDS-PAGE e a corrida foi realizada em tampão de corrida (25 mM Tris; 191 mM Glicina (Sigma Aldrich); 0,1% SDS) com voltagem constante de 65 V durante 20 minutos e 120 V até finalizar. Após essa etapa, as proteínas presentes no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham), etapa realizada a 100 V durante 1,5 hora em tampão de transferência (25 mM Tris-base; 191 mM Glicina; 0,1% SDS; 20% Metanol). A seguir, a membrana foi bloqueada em solução contendo 5% leite em pó livre de gordura diluído em 0,1% TBS-T (150 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl pH 7,4; 0,1% Tween® - Sigma Aldrich), durante uma hora. Depois disso, foi feita a incubação com o anticorpo primário de interesse *overnight* (diluído em solução de TBS-T com 5% BSA; Tabela 3) e, em seguida, adicionado o anticorpo secundário acoplado a peroxidase (anti-rabbit, anti-mouse ou anti-goat, Amersham; 1:2500 ou Santa Cruz; 1:2500), por 1 hora. A membrana foi revelada com kit de quimioluminescência (PierceTM ECL Western Blotting Substrate ou Immobilon® Western Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore) em filme (Amersham Hyperfilm ECL). Os filmes foram digitalizados para documentação dos resultados. A análise densiométrica dos resultados foi feita pelo programa ImageJ e os gráficos construídos através do programa GraphPad Prism.

Tabela 3 - Anticorpos primários usados nas análises por western blot

Proteína	Marca/Catálogo	Diluição	Anticorpo secundário
RSK1	Santa Cruz / sc-231	1:5000	Rabbit
RSK2	Novus Biologicals / NBP1-85552	1:2000	Rabbit
RSK3	Santa Cruz / sc-1431	1:1000	Goat
RSK4	Santa Cruz / sc-100424	1:1000	Mouse
P(Thr202/Tyr204)-ERK 1/2	Cell Signaling / #9101	1:2000	Rabbit
ERK 1/2	Cell Signaling / #9102	1:1000	Rabbit
P(Ser235/236)-rpS6	Cell Signaling / #4856	1:2000	Rabbit
rpS6	Santa Cruz / sc-74459	1:1000	Mouse
P(Ser422)-eIF4B	Cell Signaling / #3591	1:700	Rabbit
eIF4B	Santa Cruz / sc-390912	1:700	Mouse
P(Thr37/46)-4E-BP1	Cell Signaling / #9459	1:1000	Rabbit
4E-BP1	Cell Signaling / #9644	1:1000	Rabbit
P(Ser366)-eEF2K	Cell Signaling / #3691	1:1000	Rabbit
eEF2K	Santa Cruz / sc-390710	1:500	Mouse

3.4 PERFIL POLISSOMAL

A técnica de perfil polissomal permite isolar os mRNAs que estão sendo ativamente traduzidos em proteínas pelos ribossomos, a partir de sua associação com os polissomos, dos mRNAs não traduzidos. Para isso, os lisados celulares são aplicados em gradientes de sacarose e, por meio de ultracentrifugação, as partículas ribossomais presentes na amostra sedimentam no gradiente de acordo com a densidade (Figura 20, A). Após essa etapa, é feita a leitura do gradiente a 254 nm, que detecta RNAs, com obtenção de frações contendo o mRNA livre na célula, as subunidades ribossomais 40S e 60S, os monossomos (80S) e os polissomos (Figura 20, B). A tradução é considerada eficiente quando ocorre a partir dos polissomos “pesados”, ou seja, aqueles que possuem mais de três ribossomos associados ao mRNA (Gandin et al. 2014; Poria e Ray 2017), e é possível obter uma medida do nível de tradução por meio da razão entre a área sob os picos dos polissomos e a área sob o pico dos monossomos.

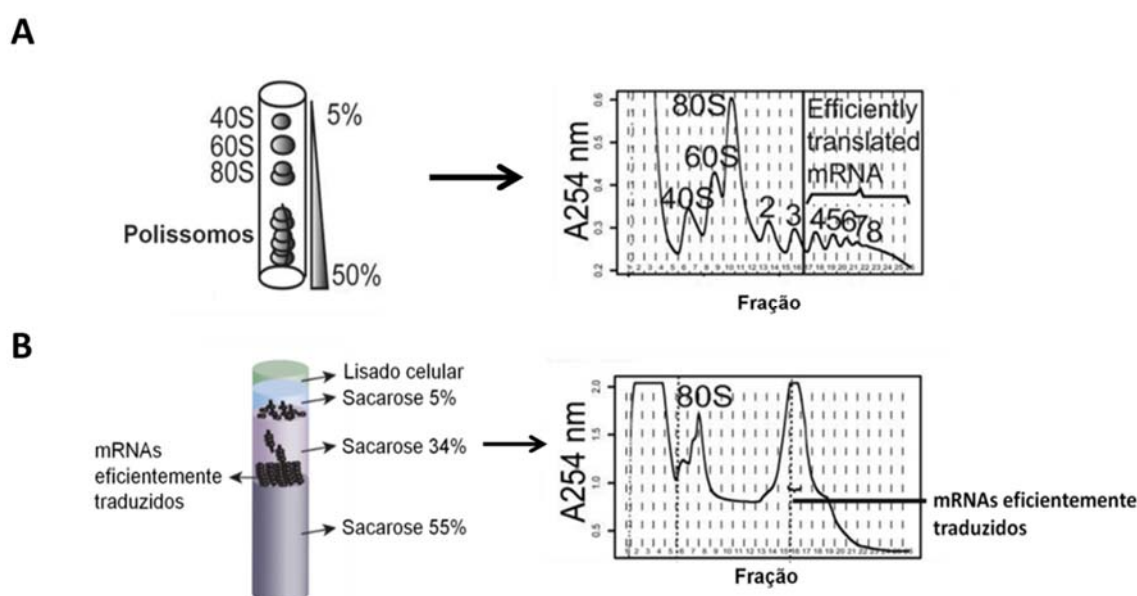


Fonte: Adaptado de Panda et al. (2017); Chassé et al. (2017).

Figura 20 - Representação esquemática do perfil polissomal, visão geral. (A) Inicialmente, prepara-se um gradiente de sacarose com diferentes concentrações, que variam de acordo com o protocolo. O gradiente é incubado a 4 °C por aproximadamente uma hora e, após estabilização, adiciona-se o extrato celular na parte superior. Em seguida, o gradiente é submetido à ultracentrifugação, com sedimentação dos componentes da amostra de acordo com a densidade. (B) No gradiente, distribuem-se os mRNAs livres, que estão no topo do gradiente, as subunidades ribossomais (40S e 60S), monossomos (80S) e mRNAs associados aos ribossomos (os polissomos). Após a ultracentrifugação, é feita a leitura do gradiente a 254 nm, com obtenção de uma representação gráfica, e simultânea separação das frações por meio de um coletor de frações.

Diferentes protocolos são utilizados para o perfil polissomal, de acordo com as análises a serem feitas, o que influencia na forma como os mRNAs se distribuem nas frações. Neste trabalho optamos por utilizar o perfil polissomal feito a partir de gradiente de sacarose linear e também a partir de gradiente de sacarose não-linear, de acordo com os objetivos dos experimentos. O gradiente linear foi preparado a partir de soluções de sacarose nas

concentrações 5%-50%, o que permite resolver em um mesmo perfil os picos das subunidades ribossomais e dos monossomos, além de separar os polissomos por diversas frações. Dessa forma, é útil para observar alterações na tradução em maiores detalhes. O gradiente de sacarose não-linear foi padronizado recentemente junto a colaboradores do nosso grupo e é uma abordagem otimizada em relação ao uso do gradiente linear (Liang et al. 2017). Ele é preparado a partir de soluções de sacarose nas concentrações 5%-34%-55% e os polissomos são encontrados na interface das soluções de sacarose 34% e 55%. Assim, é possível separar os polissomos em uma ou duas frações, facilitando a extração dos mRNAs associados aos polissomos (poly mRNA) a partir das frações coletadas e minimizando as perdas durante esse processo. A Figura 21 mostra a comparação entre os métodos que usam o gradiente linear e o gradiente não-linear (otimizado).



Fonte: Adaptado de Liang et al. (2017).

Figura 21 - Perfil polissomal com gradiente linear e não-linear (otimizado). (A) O gradiente linear pode ser preparado com concentrações de sacarose 5-50% e os polissomos, que correspondem aos mRNAs eficientemente traduzidos, distribuem-se por várias frações. (B) O gradiente não-linear (otimizado) é preparado com concentrações de sacarose 5%-34%-55% e os polissomos são obtidos a partir da interface entre as soluções de sacarose de 34% e 55%, no pico indicado na figura.

As análises que podem ser feitas com as frações obtidas incluem RT-qPCR, RNA-seq e microarranjo, em que é possível identificar os mRNAs que estão sendo traduzidos em cada fração ou analisar o *pool* de mRNAs traduzidos em diferentes frações (Poria e Ray 2017).

Neste estudo, as frações obtidas do perfil polissomal foram usadas para analisar o nível de expressão de mRNAs 5'TOP nas células LN18^{CRISPR} e em três linhagens celulares de GBM

selvagens (LN18, A172 e U118-MG), que possuem naturalmente níveis diferentes de RSK1 (Figura 11). Para isso, a partir das frações, o mRNA foi extraído e submetido à RT-qPCR, o que será explicado em detalhes adiante.

3.4.1 Preparação dos extratos para o perfil polissomal

Inicialmente, cerca de $3,0 \times 10^6$ células foram plaqueadas em placas de 150 mm (Corning). No dia seguinte, foram carenciadas de SFB e assim mantidas por 48 horas. Para avaliar efeitos das RSKs que são dependentes e independentes de mTORC1, as células foram tratadas, após o carenciamento, com veículo (DMSO) ou com Torin 1 (250 nM) por 30 minutos em estufa úmida a 37 °C. Após esse tempo, foram estimuladas com SFB 10% por seis horas para ativação de vias de sinalização, e seguiu-se com as etapas de preparação dos extratos de polissomos. As células foram tratadas com o antibiótico cicloheximida (100 µg/mL - Sigma Aldrich) por sete minutos, em estufa úmida a 37 °C. A cicloheximida interrompe a tradução por inibir a translocação dos ribossomos durante a fase de elongação, impedindo que os ribossomos se desassociem do mRNA (Pringle et al. 2019).

Em seguida, o meio de cultura foi removido das placas e estas foram lavadas duas vezes com PBS gelado contendo 100 µg/mL de cicloheximida. Ele também foi usado na etapa seguinte, em que 1 mL de PBS + cicloheximida foi aplicado em cada placa e, com o auxílio de um *cell scraper*, as células foram raspadas. O conteúdo obtido foi submetido à centrifugação a 4 °C por 3 minutos a 500 xg. O sobrenadante foi retirado e seguiu-se com a lise celular por meio do 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 cicloheximida - Sigma Aldrich; 40 U/mL RNasin - Promega; e coquetel de inibidores de protease livre de EDTA - Thermo Fisher Scientific). Foi adicionado 400 µL do tampão de lise a cada amostra, seguido por vórtex rápido para ressuspender as células. Para completa lise, as células foram deixadas em gelo por dez minutos. Após esse tempo, foi feita uma segunda centrifugação, a 4 °C por 10 minutos a 10.000 xg para sedimentação de núcleos e restos celulares. A partir do sobrenadante, separou-se 30 µL para análise de proteínas, 50 µL para extração e análise do RNA total e o restante do conteúdo (cerca de 300 µL) foi aplicado em gradientes de sacarose para execução do perfil polissomal.

3.4.2 Perfil polissomal - Gradiente linear

Para a composição do gradiente de sacarose contínuo, foram preparadas as soluções de sacarose (20 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM KCl; 5 mM MgCl₂; 1 mM DTT; % de sacarose indicadas - 5% ou 50%; e água livre de nucleases) e seguiu-se com o preparo dos gradientes. Para isso, o tubo de ultracentrífuga Open-Top Polyallomer (Beckman Coulter), com volume de 12,5 mL, foi colocado no interior de um cilindro de gradiente (Biocomp), e o nível superior deste serviu como referência para desenhar uma linha ao redor do tubo para demarcar a correta aplicação das soluções de sacarose (a altura da linha corresponde a um volume de aproximadamente 5,5 mL). Com uma seringa, aplicou-se primeiramente a solução de sacarose 5% até a linha demarcada. Em seguida, com outra seringa, a solução de sacarose 50% foi aplicada cuidadosamente no fundo do tubo, até atingir a linha demarcada. Os tubos foram então fechados e o gradiente linear foi preparado automaticamente (Gradient Master™, Biocomp). O gradiente foi estabilizado a 4 °C por uma hora e, após esse tempo, foram retirados 300 µL da parte superior de cada gradiente para adição dos extratos celulares. Seguiu-se com a ultracentrifugação e leitura de absorbância, como descrito no item anterior.

3.4.3 Perfil polissomal - Gradiente não-linear

Para a composição do gradiente de sacarose não-linear, foram preparadas as soluções de sacarose (20 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM NaCl ou 100 mM KCl; 5 mM MgCl₂; 1 mM DTT; % de sacarose indicadas - 5%, 34% ou 55%; e água livre de nucleases) e seguiu-se com o preparo dos gradientes. Para fazer o gradiente descontínuo, o tubo de ultracentrífuga Open-Top Polyallomer (Beckman Coulter), com volume de 12,5 mL, foi colocado no interior de um cilindro de gradiente (Biocomp), e o nível superior deste serviu como referência para desenhar uma linha ao redor do tubo para demarcar a correta aplicação das soluções de sacarose (a altura da linha corresponde a um volume de aproximadamente 5,5 mL). Aplicou-se, primeiramente 2 mL da solução de sacarose 5% com uma micropipeta de 1000 µL. Em seguida, com o auxílio de uma seringa, a solução de sacarose 34% foi aplicada no fundo do tubo cuidadosamente para não ocorrer a formação de bolhas, até que a parte superior da solução de sacarose 5% atingisse a linha demarcada previamente. Com outra seringa, a solução de sacarose 55% foi aplicada no fundo do tubo, também de forma cuidadosa, até que a interface 34%-55% atingisse a linha demarcada. Após o preparo, os tubos foram deixados a 4 °C por pelo menos uma hora para estabilização do gradiente. Decorrido esse tempo, 300 µL da parte superior de cada gradiente foram retirados para adição dos extratos celulares e foi feita a ultracentrifugação, a 4 °C por 2

horas a 39.000 RPM em rotor SW41Ti (Beckman Coulter). Os gradientes foram então submetidos à leitura de absorbância a 254 nm (BioLogic LP, Bio-Rad) e as frações foram separadas por um coletor de frações (Bio-Rad).

3.4.4 Extração de RNA das frações do perfil polissomal

No caso dos experimentos de perfil polissomal feitos com as células LN-229^{CRISPR}, em que foi utilizado o gradiente linear de sacarose, foram coletadas 15 frações, de 750 µL cada. Para a extração de RNA, as frações foram divididas em cinco grupos, contendo três frações em cada (Figura 22). Foram utilizados 200 µL de cada fração para compor os grupos, seguido pela adição de 1 mL de reagente Tri a cada tubo contendo as frações, com agitação em vórtex e incubação por cinco minutos. Depois disso, foi adicionado 200 µL de clorofórmio, seguido por agitação em vórtex e outra incubação por cinco minutos. As amostras foram então centrifugadas a 19000 xg e 4 °C durante 15 minutos, com posterior transferência da fase aquosa para um novo tubo e adição de 1 µL de GlycoBlue (Thermo Fisher Scientific) e 600 µL de isopropanol gelado. As amostras foram incubadas a 4 °C *overnight* e depois centrifugadas a 19000 xg por 10 minutos a 4 °C para obtenção do pellet. O pellet de RNA foi inicialmente lavado com 1 mL de etanol 70% gelado, seguido por centrifugação a 19000 xg por 5 minutos a 4 °C. Após descarte do sobrenadante, foi feita uma segunda lavagem com etanol absoluto gelado, seguida por centrifugação a 19000 xg por 5 minutos a 4 °C e descarte do sobrenadante. O RNA foi eluído em 30 µL de água livre de nucleases (Sigma). A concentração final dos RNAs obtidos e as razões de absorbância 260/280 nm e 260/230 nm foram determinadas pelo espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare).

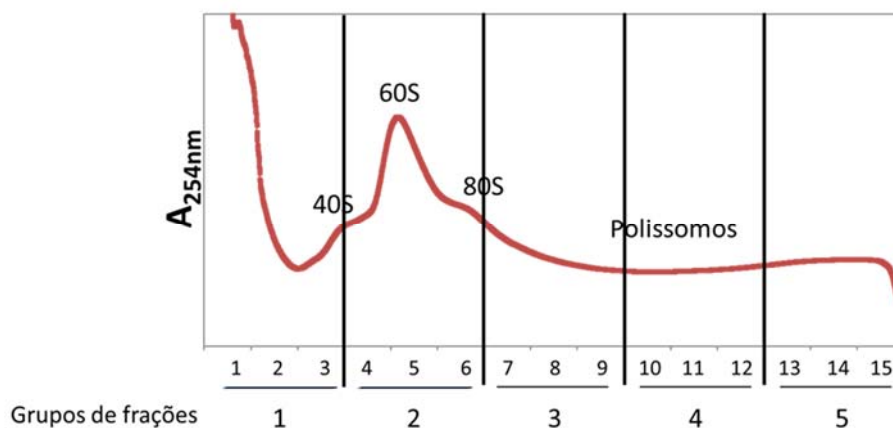


Figura 22 - Preparação das frações do perfil polissomal em gradiente linear para a extração de mRNA. Através do perfil polissomal, as partículas ribossomais se distribuem no gradiente de sacarose de acordo com a sua densidade e, portanto, as frações obtidas diferem quanto ao conteúdo. A partir de cada amostra, foram obtidas 15 frações. Para posterior extração do mRNA e análise da expressão gênica, elas foram divididas em cinco grupos, contendo três frações cada.

Já a partir do perfil polissomal preparado com o gradiente não-linear de sacarose, foram coletadas 18 frações, de 500 μ L cada. Essas frações foram divididas em três grupos, chamados subpolissomal 1 - SP1 (frações 1 a 5), subpolissomal 2 - SP2 (frações 6 a 10) e polissomal - Poli (frações 11 a 15), como mostrado na Figura 23. Foram utilizados 400 μ L de cada fração para compor os respectivos grupos, adicionados em um tubo Falcon, totalizando 2 mL para a extração do mRNA.

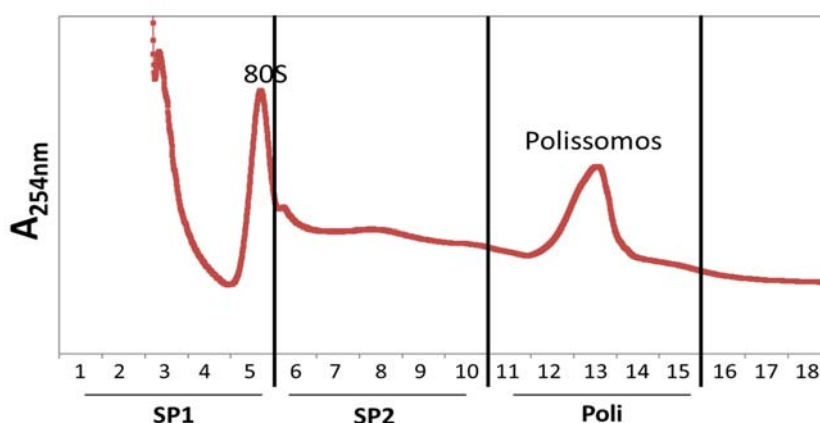


Figura 23 - Preparação das frações do perfil polissomal em gradiente não-linear para a extração de mRNA. Através do perfil polissomal, as partículas ribossomais se distribuem no gradiente de sacarose de acordo com a sua densidade e, portanto, as frações obtidas diferem quanto ao conteúdo. Cada amostra foi fracionada em 18 frações e, para posterior extração do mRNA e análise da expressão gênica, elas foram agrupadas da seguinte maneira: frações 1 a 5, no grupo subpolissomal 1 (SP1); frações 6 a 10, no grupo subpolissomal 2 (SP2); e frações 11 a 15 no grupo polissomal (Poli), onde são encontrados os mRNAs ativamente traduzidos.

A extração foi feita de acordo com as instruções do kit Direct-Zol RNA MiniPrep (Zymo Research), adaptada para um maior volume de amostra. Assim, em cada tubo contendo 2 mL do material obtido a partir das frações, foi adicionado 6 mL de reagente-Tri (Sigma-Aldrich) e 6 mL de etanol absoluto (Sigma-Aldrich), seguido por agitação vigorosa em vórtex. As amostras foram adicionadas à coluna Zymo-Spin IIC™ com o tubo coletor e centrifugadas a 16000 xg por 30 segundos, com descarte do conteúdo filtrado. Essa etapa foi repetida diversas vezes até que todo o conteúdo do tubo tivesse passado pela coluna. Em seguida, ela foi transferida para um novo tubo coletor e lavada com RNA Wash Buffer. Depois disso, foi feito o tratamento com DNase por 15 minutos a temperatura ambiente e duas lavagens com Direct-zol™ RNA. A lavagem final foi feita com RNA Wash Buffer e, após essa etapa, a coluna foi transferida para um tubo RNase-free. Para eluição do RNA, adicionou-se 30 µL de água livre de nucleases a cada coluna. A concentração final dos RNAs obtidos e as razões de absorbância 260/280 nm e 260/230 nm foram determinadas pelo espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare).

3.4.4.1 Adição do mRNA controle de luciferase

O mRNA controle de luciferase (Promega) foi utilizado como forma de controlar as variações que poderiam acontecer durante a extração de RNA e/ou o procedimento de RT-qPCR, permitindo a posterior normalização dos resultados. Para isso 2,5 ng do mRNA controle de luciferase foram adicionados a cada uma das frações, imediatamente antes do início da extração de RNA (Thoreen et al. 2012).

3.5 RT-qPCR

A síntese de cDNA por reação de transcrição reversa (RT) e a PCR em tempo real (qPCR) foram realizadas em duas etapas distintas, por meio do sistema GoTaq® 2-Step RT-qPCR (Promega) e de acordo com as instruções do fabricante. As duas etapas são descritas a seguir.

3.5.1 Síntese de cDNA

Para os RNAs polissomais usou-se 8 µL de cada amostra e para os RNAs totais foi calculado o volume a partir da amostra de menor concentração, com volume máximo a ser aplicado de 8 µL. Assim, em uma placa de 96 poços (MicroAmpOptical 96-Well Reaction Plate

- Applied Biosystems) foram aplicadas as amostras de RNA, sobre gelo. A cada poço foi adicionado 1 μL de iniciador Oligo(dT)₁₅ (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e 1 μL de iniciadores randômicos (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e a placa foi incubada a 70 °C por 5 minutos para desnaturação do RNA e dos iniciadores. Em seguida, foi preparado o mix para a reação de cDNA (tampão de reação GoScript™ 5x, MgCl₂, nucleotídeos, inibidor de ribonuclease, transcriptase reversa e água livre de nucleases), de acordo com o manual, sendo adicionado 10 μL do mix por poço. Em termociclador (Applied Biosystems), a reação seguiu mais duas etapas: incubação a 42 °C por uma hora e incubação a 70 °C por 15 minutos para inativação da transcriptase reversa.

As amostras de cDNA obtidas a partir do RNA total foram diluídas para 10 ng e o mesmo volume de água foi adicionado para diluir as amostras obtidas do RNA polissomal. Além disso, foi preparado um *pool* com todas as amostras de RNA total (20 μL de cada amostra) para normalização dos resultados, e também um *pool* com amostras de mRNA polissomal. Neste último caso, para uma determinada célula da condição controle ou tratada com Torin1, existem três amostras diferentes (oriundas dos grupos SP1, SP2 e Poli), que foram utilizadas na preparação de um *pool* contendo 15 μL de cDNA de cada uma das três amostras.

3.5.2 qPCR

Na etapa de preparação da reação, as amostras foram pipetadas em placa MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems). Foram aplicados 2 μL de cada amostra de cDNA por poço, sempre em duplicata e sobre gelo. Em seguida foi preparado o Master mix, conforme indicado na Tabela 4, com aplicação de 11 μL por poço, totalizando um volume final de reação de 13 μL .

Tabela 4 - Componentes para preparo do Master Mix

Reagente	Volume por amostra (μL)
GoTaq® Probe qPCR Master Mix 2X	6,5
Primer Forward (100 μM)	0,26
Primer Reverse (100 μM)	0,26
Corante de referência (ROX)	0,13
Água livre de nucleases (Sigma)	3,85

Foram usados *primers* para análise da expressão de dois genes que possuem a sequência 5'TOP em seus mRNAs: *PABPC4*, que codifica a proteína citoplasmática 4 de ligação a poli(A), e *RPS11*, que codifica a proteína ribossomal S11; para genes endógenos, usados como

controle; e para o RNA controle de luciferase, adicionado às frações do perfil polissomal. A Tabela 5 apresenta todos os *primers* usados e suas respectivas sequências.

Tabela 5 - Sequência dos *primers forward* (F) e *reverse* (R) para RT-qPCR

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>
PABPC4 (F)	5'- ATC CTC TCT GGC GTG GTG A -3'
PABPC4 (R)	5'- AAG CGG TTG TAC TTG CGG AT -3'
RPS11 (F)	5'- CAG CCC TCA TCC TGC CAT AC -3'
RPS11 (R)	5'- ACA AGC GTT CTC CCA GCA T -3'
GAPDH (F)	5'- CTT CGC TCT CTG CTC CTC C T-3'
GAPDH (R)	5'- ACC AAA TCC GTT GAC TCC GAC -3'
β-actina (F)	5' - AGG CAC CAG GGC GTG A -3'
β-actina (R)	5' - TCT CCA TGT CGT CCC AGT TG -3'
Luciferase (F)	5'- GCC AGT CAA GTA ACA ACC GC -3'
Luciferase (R)	5'- TTG GAC TTT CCG CCC TTC TT -3'

A placa foi centrifugada e a reação foi feita no termociclador StepOne Plus™ Real-Time PCR (Applied Biosystems), através do sistema de detecção SYBR green. O SYBR green é um corante intercalante de DNA de fita dupla e o aumento na intensidade de fluorescência é proporcional à quantidade de DNA amplificado (Yang et al. 2016).

Para amplificação, foi utilizado o seguinte protocolo:

- Estágio de desnaturação inicial: 95 °C por dez minutos - 1x
- Estágio de ciclagem: 95 °C por quinze segundos, seguido de 60 °C por um minuto-40 x
- Estágio da curva de *melting*: 95 °C por quinze segundos, seguido de 60 °C por um minuto e novamente 95 °C por quinze segundos - 1x

Os dados foram analisados no programa Microsoft Office Excel.

3.5.2.1 Análise dos resultados

Para análise da expressão gênica a partir da RT-qPCR no caso dos mRNAs polissomais, inicialmente foi calculado o ΔC_t para cada amostra, pela diferença entre o C_t da amostra e o C_t do respectivo *pool* (SP1 + SP2 + Poli) (Tabela 6). Em seguida, aplicamos a fórmula $2^{(-\Delta C_t)}$. Para relativização dos resultados, foi feita uma média dos valores de $2^{(-\Delta C_t)}$ de todas as amostras de cada grupo SP1, SP2 ou Poli. Por fim, a expressão gênica foi calculada pela razão entre o valor de $2^{(-\Delta C_t)}$ e a média correspondente.

Tabela 6 - Cálculo da expressão gênica relativa

- $\Delta Ct = Ct_{\text{gene alvo amostra}} - Ct_{\text{gene alvo pool}}$
- $2^{(-\Delta Ct)}$
- Média dos valores de $2^{(-\Delta Ct)}$ de cada grupo
- Expressão gênica relativa = $2^{(-\Delta Ct)} / \text{média}$

Também avaliamos a expressão gênica usando como referência o mRNA controle de luciferase (Tabela 7). Neste caso, subtraiu-se o valor de Ct do RNA controle de luciferase do valor de Ct do gene de interesse (*PABPC4* ou *RPS11*). Em seguida, aplicamos a fórmula $2^{(-\Delta Ct)}$. Para relativização dos resultados, os valores de $2^{(-\Delta Ct)}$ das amostras referentes a uma mesma célula e tratamento foram somados e o valor de $2^{(-\Delta Ct)}$ da amostra em questão foi dividido valor desta soma.

Tabela 7 - Cálculo da expressão gênica relativa utilizando o mRNA controle de luciferase

- $\Delta Ct = Ct_{\text{gene alvo}} - Ct_{\text{luciferase}}$
- $2^{(-\Delta Ct)}$
- Expressão gênica relativa =
 $= 2^{(-\Delta Ct)} / (2^{(-\Delta Ct)} \text{ SP1} + 2^{(-\Delta Ct)} \text{ SP2} + 2^{(-\Delta Ct)} \text{ Poli})$

A expressão dos mRNAs nas amostras de mRNA total foi calculada através do método $\Delta\Delta Ct$. Para o cálculo do $\Delta\Delta Ct$, o *pool* de RNAs totais foi escolhido como amostra normalizadora e, então, foi subtraído o valor de ΔCt da amostra normalizadora do valor de ΔCt do gene alvo. O resultado final da expressão gênica foi obtido por meio da fórmula $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$.

Os gráficos foram construídos através do programa GraphPad Prism.

4 RESULTADOS

Com o objetivo de validar e generalizar resultados obtidos anteriormente em experimentos feitos a partir das células LN-18 nocautes e também analisar as funções biológicas das RSKs em outro contexto, já que as linhagens celulares possuem diferenças na ativação de vias de sinalização, geramos neste trabalho outra linhagem celular nocaute para RSK1, RSK2 e duplo-nocaute para RSK1 e 2, utilizando a técnica de CRISPR/Cas9. Foi escolhida a linhagem celular de GBM LN-229 que apresenta, depois da LN-18, os maiores níveis de RSK1 (aproximadamente três vezes menos que a LN-18). Nos referimos a essas células como LN-229^{CRISPR}. As demais linhagens apresentam níveis muito baixos ou ausentes de RSK1 e, portanto, não seriam um modelo útil para avaliar os efeitos de diferentes isoformas.

4.1 GERAÇÃO E SELEÇÃO DAS CÉLULAS LN-229 NOCAUTES PARA RSK1, RSK2 E DKO

As células LN-229 nocautes foram geradas pelo sistema CRISPR/Cas9, com o uso de dois conjuntos de sgRNAs distintos (A e B). Ao usar esse sistema, é possível que ocorram alterações em sequências *off target* devido ao *mismatch* entre a sgRNA e a sequência de DNA genômico. Por isso, uma sequência que não corresponde à região alvo da sgRNA pode ser alterada, com a possibilidade de causar efeitos inespecíficos. Em nosso estudo, utilizamos duas guias com sequências diferentes para cada isoforma pois a probabilidade de que elas gerem os mesmos efeitos *off target* é baixa. Assim, é possível comparar os efeitos em células nocaute obtidas a partir de cada guia e confirmar que esses efeitos se devem, de fato, à ausência de expressão da proteína correspondente. Após a avaliação do *pool* de células transfectadas (Figura 19), seguimos com o isolamento dos clones e avaliação da expressão de RSK1 e RSK2 para selecionar as células nocaute. Um dos resultados é mostrado na Figura 24.



Figura 24 - Geração de clones nocautes para as isoformas RSK1, RSK2 e nocautes duplos a partir da linhagem celular LN-229. Células LN-229 foram submetidas à técnica de CRISPR/Cas9, usando duas sgRNAs diferentes (A ou B). Elas foram transfectadas com 4 µg de plasmídeo contendo a guia para RSK1, para RSK2 ou 2 µg de cada plasmídeo para geração das células duplo nocautes. A transfecção foi feita com 4 µL de Lipofectamina 2000 em 3 mL de meio Opti-MEM®, por cinco horas. Após esse tempo, o meio foi trocado e as células foram selecionadas com o antibiótico puromocina (1 µg/µl) por cerca de cinco dias, seguido pela troca do meio para recuperação das células. Após 24 horas, 500 células de cada condição foram plaqueadas em placas de 100 mm para formação de colônias derivadas de uma única célula. Após expansões progressivas dos clones obtidos, foram feitos extratos proteicos dos clones controle e dos clones nocautes para avaliação dos níveis de RSK1 e RSK2 por western blot. A seta indica a banda específica de RSK2. ERK1/2 foi usado como proteína normalizadora.

A partir do conjunto de guias A, foi possível obter todas as células de interesse, RSK1^{KO}, RSK2^{KO} e DKO. Entretanto, ao usar a guia B, obtivemos apenas células nocautes para RSK1, o que impediu estudos comparativos entre células nocaute geradas por conjuntos de guias distintos. A eficiência de cada conjunto de guias é mostrada na Tabela 8.

Tabela 8 - Eficiência da geração de células nocautes pelo sistema CRISPR/Cas9

Célula / Guia	Clones testados	Clones nocautes	Eficiência
RSK1 ^{KO} gA	10	2	20%
RSK2 ^{KO} gA	17	3	17,64%
DKO gA	15	1	6,66%
RSK1 ^{KO} gB	12	2	16,66%
RSK2 ^{KO} gB	8	0	0%
DKO gB	19	0	0%

Nas células nocaute geradas, também foi avaliada a expressão das isoformas RSK3 e RSK4, que poderiam ser expressas alternativamente caso houvesse algum mecanismo de compensação (Figura 25). Como controle positivo, células LN-229 selvagens foram transfectadas com plasmídeo para expressar HA-RSK3 e HA-RSK4. No western blot, foi aplicado três vezes menos quantidade de extratos de proteína obtidos das células transfectadas. Observa-se ausência tanto de RSK3 quanto de RSK4 nas células LN-229^{CRISPR}.

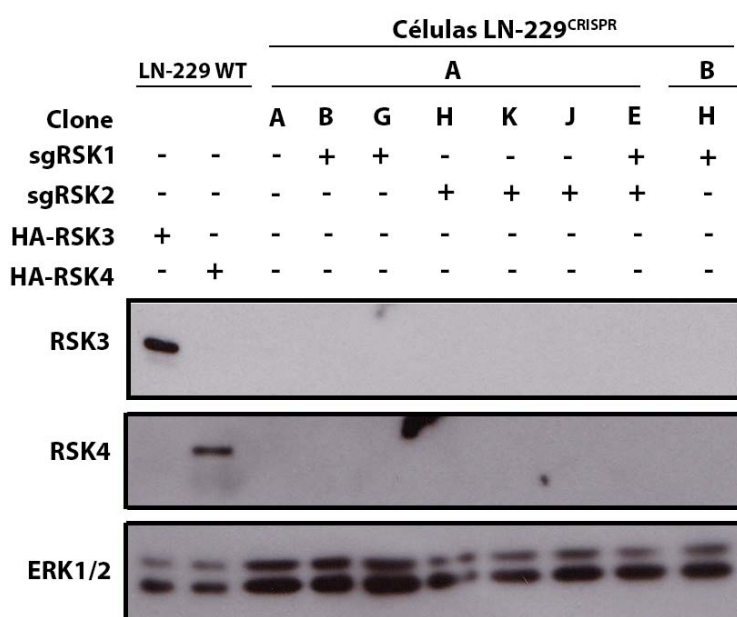


Figura 25 - Avaliação dos níveis de RSK3 e RSK4 nas células LN-229^{CRISPR}. Extratos das células LN-229^{CRISPR} foram avaliados quanto à presença ou ausência das isoformas RSK3 e RSK4 por western blot. Como controle positivo, foram usados extratos de células LN-229 selvagens transfectadas para superexpressar HA-RSK3 e HA-RSK4. A transfecção foi feita com 4 µL de Lipofectamina 2000 em 3 mL de meio Opti-MEM® por cinco horas. Após esse tempo, o meio Opti-MEM® foi trocado pelo meio normal de cultivo das células durante 48 horas. O extrato obtido das células transfectadas foi aplicado em quantidade três vezes menor do que os outros extratos. Os filmes foram superexpostos para tentar detectar a presença de alguma banda.

4.2 VIAS DE SINALIZAÇÃO NAS CÉLULAS LN-229^{CRISPR}

A importância do papel das RSKs sobre a fosforilação de eIF4B nas células LN-18 foi demonstrada por Roffé et al. (2015). Neste trabalho, foi observado que não ocorreu redução na fosforilação de eIF4B em células tratadas com o inibidor de mTORC1, rapamicina. Entretanto, quando as mesmas células foram tratadas concomitantemente com inibidores químicos de RSK, SL0101 e BI-D1870, elas apresentaram menores níveis de fosforilação de eIF4B. Ainda, em um outro estudo do nosso grupo feito com as células LN-18^{CRISPR}, foi observada deficiência na

fosforilação de P(S422)-eIF4B nas células RSK1^{KO} e DKO após estímulo tanto com PMA quanto com 10% SFB, sugerindo um papel importante das RSKs nesse processo (Nascimento 2019).

Como eIF4B é um dos alvos compartilhados pelas vias PI3K/AKT/mTORC1 e Ras/ERK/RSK e como as RSKs poderiam ativar a via de mTORC1 pelo *cross-talk*, decidimos incluir em nossa análise com as células LN-229^{CRISPR} o inibidor de mTORC1, Torin1, com o objetivo de definir efeitos das RSKs que são dependentes e independentes de mTORC1. Analisamos também a fosforilação de outros alvos compartilhados pelas duas vias acima mencionadas, P(S235/236)-rpS6 e P(S366)-eEF2K.

Após a obtenção das células nocautes, demos início à avaliação de componentes das vias de sinalização de PI3K/AKT/mTORC1 e Ras/ERK/RSK. Inicialmente, as células foram tratadas com PMA, que ativa a via Ras/ERK/RSK, por 15 minutos. Na Figura 26, observa-se que todas as células tratadas com PMA tiveram aumento na fosforilação de ERK1/2, como esperado. As outras proteínas avaliadas são alvos compartilhados por S6K e RSK. Em relação a elas, houve aumento da fosforilação de rpS6 em todos os clones testados após tratamento com PMA, exceto no clone RSK1^{KO} H da guia B. Além disso, o aumento da fosforilação de eIF4B foi menor nos clones nocautes para RSK1, o que pode sugerir uma regulação por essa isoforma nas células LN-229. Também se observa aumento na fosforilação de eEF2K após estímulo com PMA, exceto no clone RSK1^{KO} H da guia B, que parece ter um comportamento diferente das outras células nocautes para RSK1. Escolhemos usar as células nocautes RSK1^{KO} B e RSK2^{KO} K nos experimentos subsequentes, devido ao comportamento observado, além do controle e da única célula duplo nocaut que foi gerada, RSK1/2^{DKO} E.

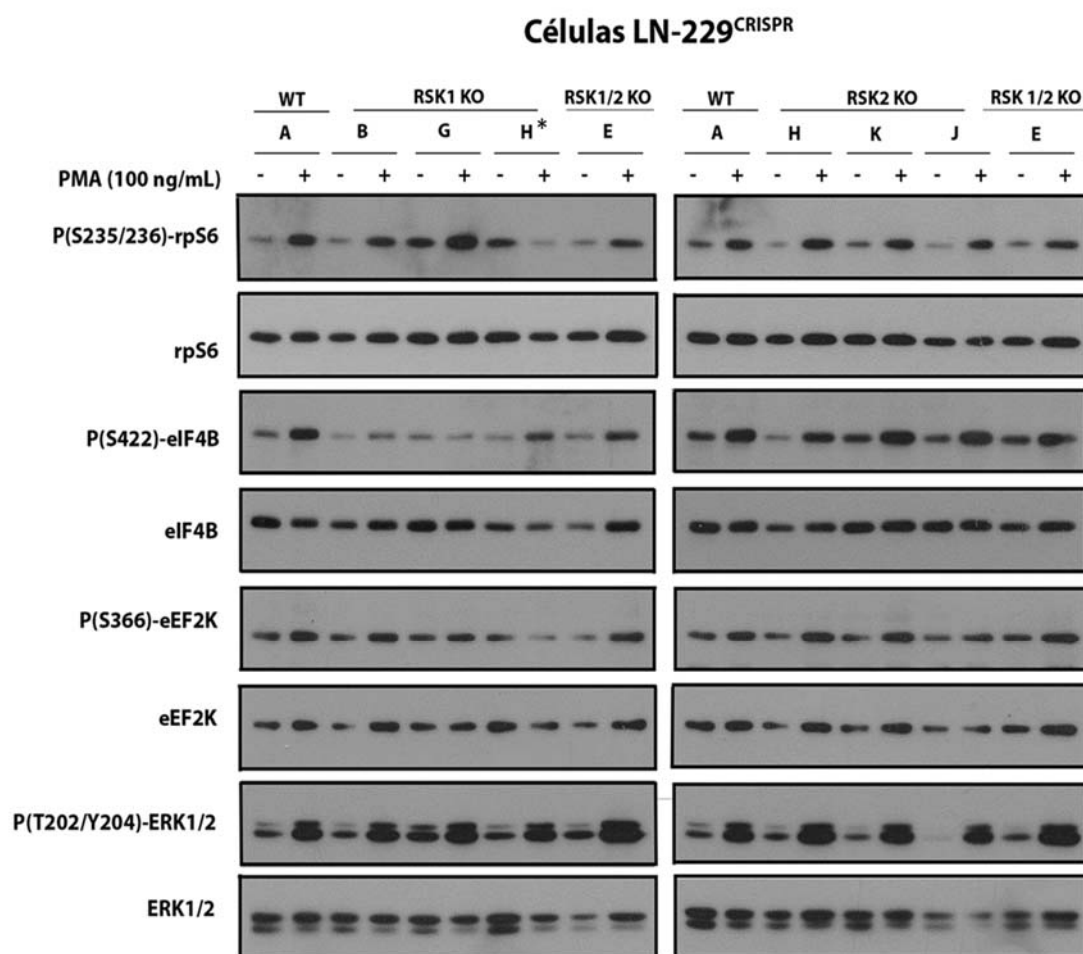


Figura 26 - Avaliação de vias de sinalização nas células LN-229^{CRISPR}. As células foram plaqueadas e, no dia seguinte, carenciadas por 48 horas. Em seguida, foram tratadas com veículo (DMSO) ou PMA (100 ng/mL) por 15 minutos. Logo após o tratamento, seguiu-se com a preparação dos extratos proteicos, que foram usados para avaliação dos níveis de rpS6, eIF4B, eEF2K e ERK1/2 (fosforilado e total) por western blot. O asterisco indica a célula RSK1^{KO} obtida a partir do conjunto de guias B que foi testada.

No experimento preliminar acima com as células LN-229^{CRISPR}, a redução da fosforilação de P(S422)-eIF4B foi observada nas células RSK1^{KO}. Considerando este resultado e nosso interesse em avaliar também a fosforilação de rpS6 e eEF2K, outros alvos compartilhados pelas vias PI3K/Akt/mTORC1 e Ras/ERK/RSK, as células LN-229^{CRISPR} foram estimuladas com PMA e tratadas com Torin1 (Figura 27). A redução da fosforilação de 4E-BP1, alvo de mTORC1, após o tratamento com Torin1 confirma o efeito deste inibidor. Como esperado, a fosforilação de rpS6 e de eIF4B aumentou nas células tratadas com PMA em relação ao controle. Entretanto, após tratamento com Torin1, enquanto a fosforilação de rpS6 foi praticamente inibida, a fosforilação de eIF4B reduziu apenas parcialmente em relação ao estímulo com PMA. Isso indica que as isoformas RSK1 e RSK2 não possuem efeito sobre a fosforilação de rpS6 quando mTORC1 está inibido e que elas devem exercer algum efeito sobre

a fosforilação de eIF4B nessa mesma condição. Assim, é possível inferir que a fosforilação de rpS6 é mais dependente de mTORC1/S6K, enquanto a fosforilação de eIF4B é mais dependente de ERK/RSK

Além disso, ao comparar a fosforilação de eIF4B entre as células LN-229^{CRISPR}, observa-se que ela foi menor nas células RSK1^{KO} após estímulo com PMA, enquanto as células RSK2^{KO} mantiveram o maior nível de fosforilação de eIF4B. Interessantemente, nas células DKO também foi observada fosforilação de eIF4B, dessa maneira é possível que ocorra algum mecanismo de compensação na ausência de todas as isoformas de RSK ou que outro mecanismo, ainda não conhecido, também esteja envolvido na regulação da fosforilação de eIF4B. Os resultados apresentados aqui são similares ao observado nas células LN-18^{CRISPR} em um estudo anterior a este.

Diferentemente de rpS6 e eIF4B, não foi observada alteração na fosforilação de eEF2K após o estímulo com PMA ou o tratamento com Torin1 nas células nocautes, sugerindo que outras formas de regulação podem estar envolvidas.

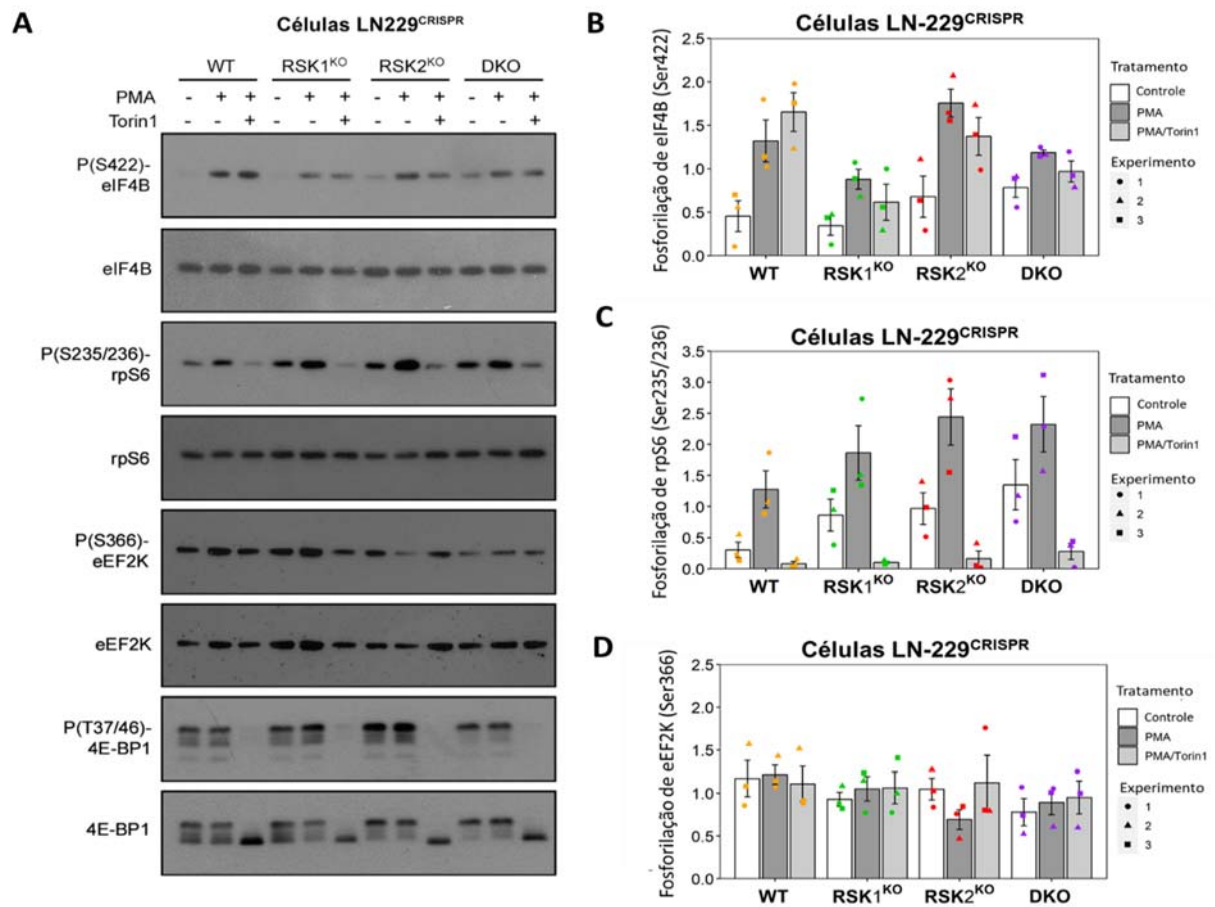


Figura 27 - Efeito da inibição de mTORC1 nas células LN-229^{CRISPR}. (A) As células foram plaqueadas e, no dia seguinte, carenciadas por 48 horas. Após esse tempo, foram pré-tratadas com veículo (DMSO) ou com Torin1 (250 nM) por 30 minutos, seguido pelo tratamento com PMA (100 ng/mL) durante 15 minutos, como indicado. Os extratos proteicos foram usados para avaliação dos níveis de rpS6, eIF4B, 4E-BP1 e eEF2K (fosforilado e total) por western blot. (B) Análise densitométrica da fosforilação de eIF4B, (C) rpS6 e (D) eEF2K nas células LN-229^{CRISPR}, com indicação da média e erro padrão da média. Resultados representativos de três experimentos independentes.

4.3 FOSFORILAÇÃO DE EIF4B E RPS6 EM LINHAGENS CELULARES SELVAGENS DE GBM

Levando em consideração os resultados obtidos com as células LN-229^{CRISPR} quando avaliada a fosforilação de eIF4B e rpS6, decidimos utilizar outro modelo para analisar a ativação destas proteínas em GBMs. Para isso, foram usadas cinco linhagens celulares de GBM: LN-18, LN-229, U87-MG, A172 e U118-MG, que, como apresentado anteriormente, possuem níveis similares de RSK2 e níveis diferentes de RSK1, os quais estão reduzidos ou ausentes nas células U87-MG, A172 e U118-MG (Figura 11). As células foram tratadas com 10% SFB e também com o inibidor de mTORC1, Torin1, conforme indicado na Figura 28. A redução da fosforilação de 4E-BP1, alvo de mTORC1, após o tratamento com Torin1 confirma o efeito

deste inibidor. A fosforilação de rpS6, como esperado, aumentou nas células tratadas com 10% SFB em relação ao controle. Por outro lado, após tratamento com Torin1, ela foi praticamente inibida nas células LN-229, U87-MG e U118-MG. Já para as células LN-18 e A172, foi possível observar fosforilação de rpS6 mesmo após tratamento com Torin1. Além disso, para A172, maior fosforilação de rpS6 ocorreu nas células não estimuladas com 10% SFB (condições D e DS no gráfico da Figura 28, B).

A fosforilação de eIF4B também aumentou após estímulo com 10% SFB. Entretanto, após tratamento com Torin1, ela reduziu apenas parcialmente em relação às células estimuladas com 10% SFB. Isso sugere que S6K não é a principal quinase envolvida na regulação da fosforilação de eIF4B, de forma semelhante ao resultado observado para as células LN-229^{CRISPR}.

Em relação à fosforilação isoforma-específica de eIF4B, os resultados com as cinco linhagens celulares de GBM (Figura 28, B) também sugerem um papel da isoforma RSK1 nesta regulação. As células LN-18, LN-229 e U87-MG possuem níveis mais elevados de RSK1 quando comparado às células A172 e U118-MG, em que os níveis de RSK1 são praticamente indetectáveis. De acordo, as células LN-18, LN-229 e U87-MG apresentaram níveis de fosforilação de eIF4B mais elevados do que as células U118-MG, após tratamento com Torin1.

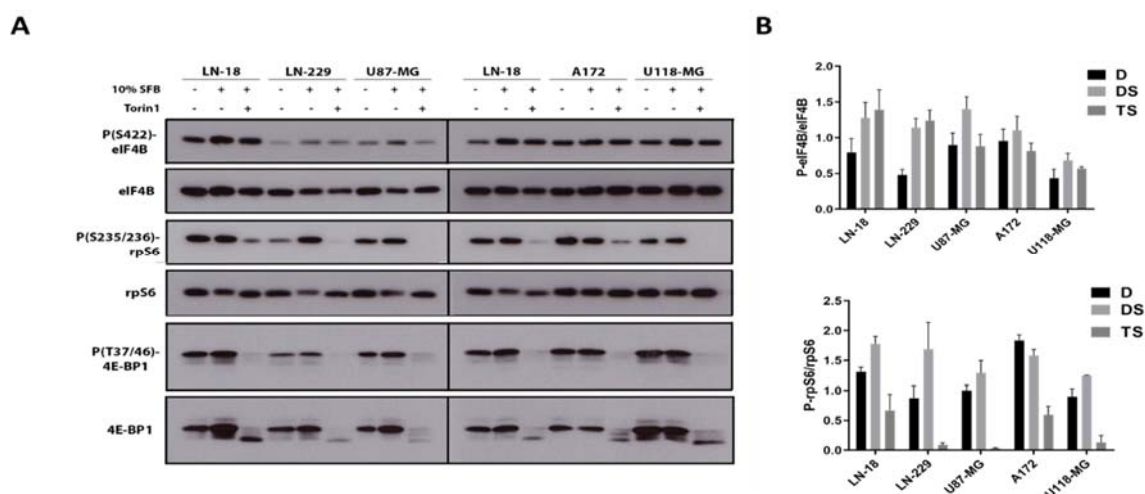


Figura 28 - Níveis de fosforilação de eIF4B e rpS6 nas linhagens celulares de GBM. (A) As células LN-18, LN-229, U87-MG, A172 e U118-MG foram carenciadas por 48 horas e pré-tratadas com veículo (DMSO) ou 250 nM Torin1 por 30 minutos e em seguida tratadas com SFB por 15 minutos, conforme indicado. Os extratos proteicos foram usados para avaliação dos níveis de rpS6, eIF4B e 4E-BP1 (fosforilado e total) por western blot. Extratos das células LN-18 foram aplicados em ambos os géis para serem usados como referência. (B) Análise densiométrica da fosforilação de eIF4B e rpS6 nas cinco linhagens celulares, com indicação da média e erro padrão da média. Os resultados da quantificação de todas as bandas foram normalizados pela média dos valores obtidos para as três amostras da linhagem LN-18 de cada filme. Resultados representativos de três experimentos independentes.

4.4 AVALIAÇÃO DA TRADUÇÃO NAS CÉLULAS LN-229^{CRISPR}

Além de investigar a regulação da ativação de proteínas relacionadas ao processo de tradução, também buscamos descrever as taxas de tradução nas células LN-229^{CRISPR} (Figura 29, A). Para isso, as células foram tratadas com Torin1 e os extratos celulares foram preparados para serem aplicados no perfil polissomal. Inicialmente, avaliamos a fosforilação de 4E-BP1 após tratamento com Torin1. A ausência de fosforilação nas células tratadas confirma a inibição de mTORC1 (Figura 29, B). Em seguida, foi feito o perfil polissomal utilizando o gradiente de sacarose linear 5-50%, onde é possível identificar os picos referentes às subunidades ribossomais 40S e 60S, aos monossomos 80S e aos polissomos. Entretanto, não foi possível visualizar os picos referentes aos polissomos em nenhum dos três experimentos (Figura 29, C-F). Inclusive, em um deles foi utilizado maior quantidade de células para obtenção de mais material para ser aplicado no gradiente de sacarose, porém também não foi possível visualizar os polissomos. Assim, concluímos que a taxa de tradução é baixa nas células LN-229, mesmo para as células da condição controle.

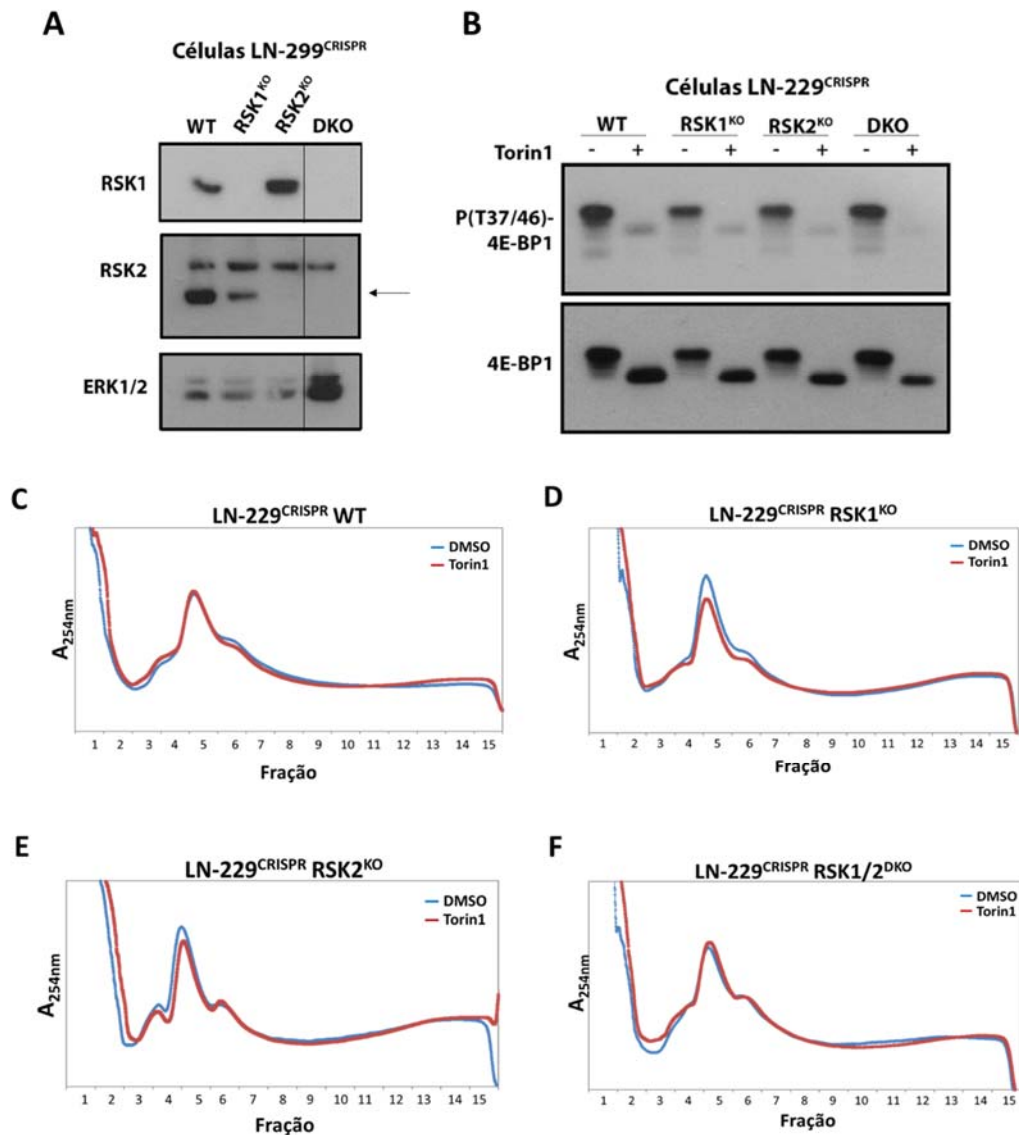


Figura 29 - Avaliação da tradução nas células LN-229^{CRISPR}. (A) Antes de realizar os experimentos, foi avaliada a expressão de RSK1 e RSK2 nas células nocaute geradas. A seta indica a banda específica de RSK2. ERK1/2 foi utilizada como proteína normalizadora. O western blot foi cortado para melhor visualização do resultado. (B) As células foram carenciadas por 48 horas, pré-tratadas com Torin1 (250 nM) por 30 minutos e, após esse tempo, com 10% SFB por seis horas. Após adição de cicloheximida (100 µg/mL) por sete minutos, seguiu-se com a preparação dos extratos citoplasmáticos e avaliação da fosforilação de 4E-BP1 com o objetivo de confirmar a efetividade do tratamento com Torin1. (C) Os extratos citoplasmáticos foram também aplicados em gradientes de sacarose 5%-50% para execução do perfil polissomal das células LN-229^{CRISPR} WT, (D) RSK1^{KO}, (E) RSK2^{KO} (F) DKO. As imagens são representativas de três experimentos independentes.

Também analisamos os níveis de mRNAs nas frações obtidas do perfil polissomal. Assim, seria possível visualizar diferenças na distribuição dos mRNAs ao longo do perfil polissomal que refletiriam um processo de tradução mais ou menos ativo. Para isso, as frações foram separadas em grupos contendo três frações cada (Figura 30, A). Após a extração do RNA, seguiu-se com a análise dos níveis dos mRNAs *RPS11* e *β -actina* por RT-qPCR (Figura 30, B e C). Os resultados, referentes a um experimento, são preliminares. Para *RPS11*, o mRNA encontra-se predominantemente no *pool* polissomal 2, onde os mRNAs não estão sendo traduzidos. No caso das células selvagens, também há níveis elevados de mRNA no *pool* polissomal 3, onde os mRNAs são traduzidos com baixa eficiência. Assim, os níveis de tradução de *RPS11* sugerem que os 5'TOP mRNAs estão sendo traduzidos de maneira pouco eficiente, o que pode estar relacionado com uma menor ativação da via de PI3K/AKT/mTORC1 nas células LN-229 (Roffé et al. 2015). Já a distribuição do mRNA de *β -actina* sugere que as células sem RSK1 têm menor tradução geral, pois apenas nelas o mRNA encontra-se predominantemente no *pool* polissomal 2. Outra observação importante é que a mudança dos mRNAs para frações mais leves do gradiente após o tratamento com Torin1, especialmente nas células que não têm RSK1, indica que Torin1 funcionou. Ou seja, a inibição de mTORC1 levou à redução da tradução. É interessante mencionar que os níveis de 4E-BP1 fosforilado são bem altos (Figura 29, B), mesmo que a tradução geral é baixa na célula.

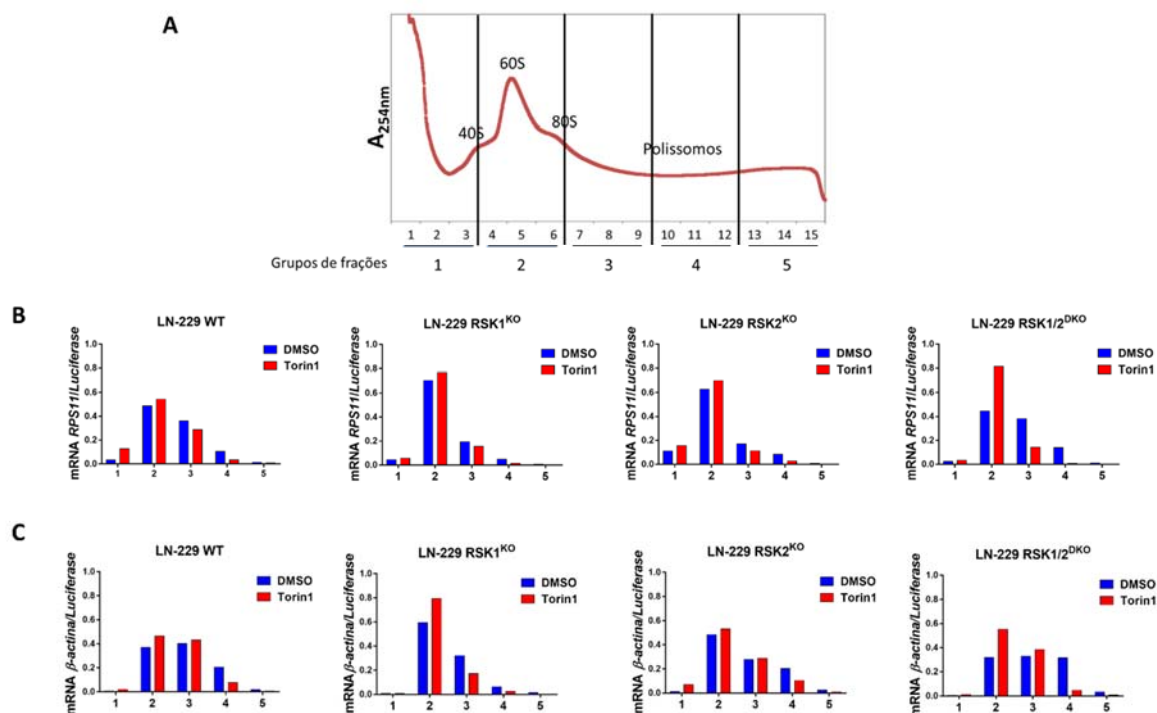


Figura 30 -Variação nos níveis de mRNAs nas frações do perfil polissomal das células LN-229^{CRISPR}. (A) Na figura estão indicados os picos referentes às subunidades ribossomais 40S e 60S e aos monossomos em uma representação gráfica do perfil polissomal. As frações do perfil polissomal foram separadas em cinco grupos, com três frações em cada um deles. À cada fração foi adicionado 2,5 ng do mRNA controle de luciferase, com posterior extração do mRNA. (B) O mRNA obtido foi utilizado para avaliar os níveis do mRNA de (B) *RPS11* e (C) β -actina por RT-qPCR, que foram normalizados pelos níveis de luciferase. Os gráficos foram construídos com o programa GraphPad Prism. Resultado de um experimento.

4.5 AS RSKS E A TRADUÇÃO DE 5'TOP MRNAS EM CÉLULAS DE GBM

Em um estudo anterior do nosso grupo, foi avaliado os níveis das isoformas de RSK em cinco diferentes linhagens celulares de GBM, LN-18, LN-229, U87-MG, A172 e U118-MG (Figura 11). A maior expressão de RSK1 foi detectada nas células LN-18, que foram, por isso, utilizadas para a geração de células nocautes para RSK1, RSK2 e DKO, através da técnica de CRISPR/Cas9. Dessa maneira, foi estabelecido um modelo para investigação das alterações moleculares associadas às isoformas RSK1 e RSK2 em GBMs, sobretudo em relação ao processo de tradução.

Os experimentos de translátômica com as células LN-18^{CRISPR} foram feitos em um estudo prévio do grupo, o trabalho de mestrado da aluna Danielle Nascimento Pereira (Nascimento 2019). Um de seus objetivos foi identificar mRNAs regulados pelas isoformas RSK1 e RSK2 de forma dependente e independente de mTORC1. Por meio do perfil polissomal e subsequente análise dos mRNAs associados aos polissomos para cada célula nocaute, foi

observado que as isoformas RSK1 e RSK2 regulam diferentes mRNAs. De forma interessante, nas células nocautes para RSK1 tratadas com Torin1 ocorreu maior perda de mRNAs que possuem a sequência 5'TOP, quando comparado às outras células. É importante lembrar que esse grupo de mRNAs é regulado por mTORC1. Assim, esses resultados indicaram que a tradução de mRNAs com sequência 5'TOP é dependente de RSK1, porém apenas quando mTORC1 está inativado, devido ao efeito de inibição provocado por Torin1.

Nesse contexto, a isoforma RSK1 pode estar mediando um mecanismo de resistência a inibidores de mTORC1 em GBMs, por continuar promovendo a tradução de certos mRNAs. Além disso, o controle da tradução de 5'TOP mRNAs ainda não foi completamente elucidado, tornando ainda mais relevante os achados anteriores, que podem indicar uma alternativa de regulação destes mRNAs.

Neste trabalho, buscamos validar os resultados obtidos em relação ao controle traducional em células de GBM pela família de proteínas RSK. Com o objetivo de investigar o possível papel da isoforma RSK1 na regulação de mRNAs 5'TOP, foram usadas as células LN-18^{CRISPR} RSK1^{KO}, RSK2^{KO} e DKO e, à parte, células selvagens das linhagens LN-18, A172 e U118-MG, que apresentam níveis diferentes da isoforma RSK1. Utilizamos a técnica do perfil polissomal para obter os mRNAs ativamente traduzidos em células de GBM, após tratamento com Torin1. As frações obtidas a partir do perfil polissomal foram separadas em três grupos (subpolissomal 1, subpolissomal 2 e polissomal), para subsequente extração dos mRNAs. Em seguida, foi usada a RT-qPCR para detecção dos níveis de dois mRNAs com sequências 5'TOP, *PABPC4* e *RPS11*, nos três grupos de frações.

4.5.1 Tradução de 5'TOP mRNAs nas células LN-18^{CRISPR}

Após o tratamento das células com Torin1 (250 nM), os extratos celulares para serem aplicados no perfil polisomal foram preparados. Parte do volume das amostras foi separado para avaliar os níveis de fosforilação de 4E-BP1 por western blot e, como esperado, não foi observada fosforilação de 4E-BP1 nas amostras tratadas com Torin1 (Figura 31).

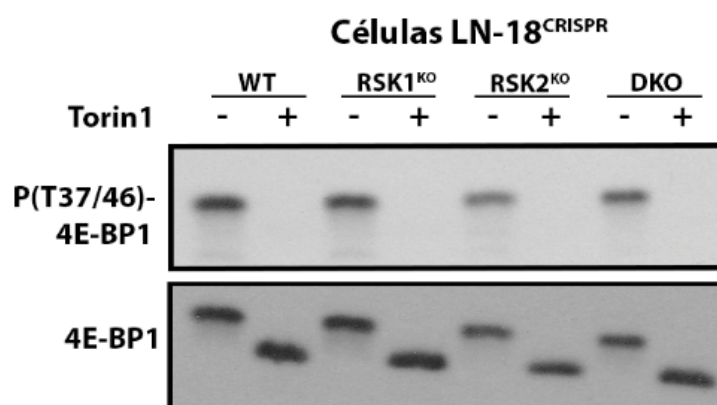


Figura 31 - Avaliação do nível de fosforilação de 4EBP1 nas células LN-18^{CRISPR} após tratamento com Torin1. As células LN-18^{CRISPR} foram pré-tratadas com veículo (DMSO) ou Torin 1 (250 nM) por trinta minutos e, em seguida, estimuladas com 10% SFB por seis horas. Após tratamento durante sete minutos com cicloheximida, seguiu-se com o protocolo para extração de polissomos. Ao final, uma alíquota do extrato clarificado foi separada para análise dos níveis de 4E-BP1 fosforilada e total por western blot.

Em um trabalho publicado recentemente, com a participação do nosso grupo, a técnica do perfil polissomal foi otimizada para facilitar as análises subsequentes. A partir dessa técnica, que emprega um gradiente de sacarose não-linear (5%-34%-55%), os polissomos são obtidos em um reduzido número de frações, diminuindo os riscos de perda de material. Devido às vantagens apresentadas e à manipulação necessária para a extração de RNA com o reagente Tri, optamos por usar esse gradiente. A Figura 32 apresenta resultados representativos de um experimento de perfil polissomal para as células LN-18^{CRISPR}. É possível observar um aumento nos picos dos monossomos e diminuição no pico dos polissomos nas células tratadas com Torin1, consistente com a redução esperada nas taxas de tradução.

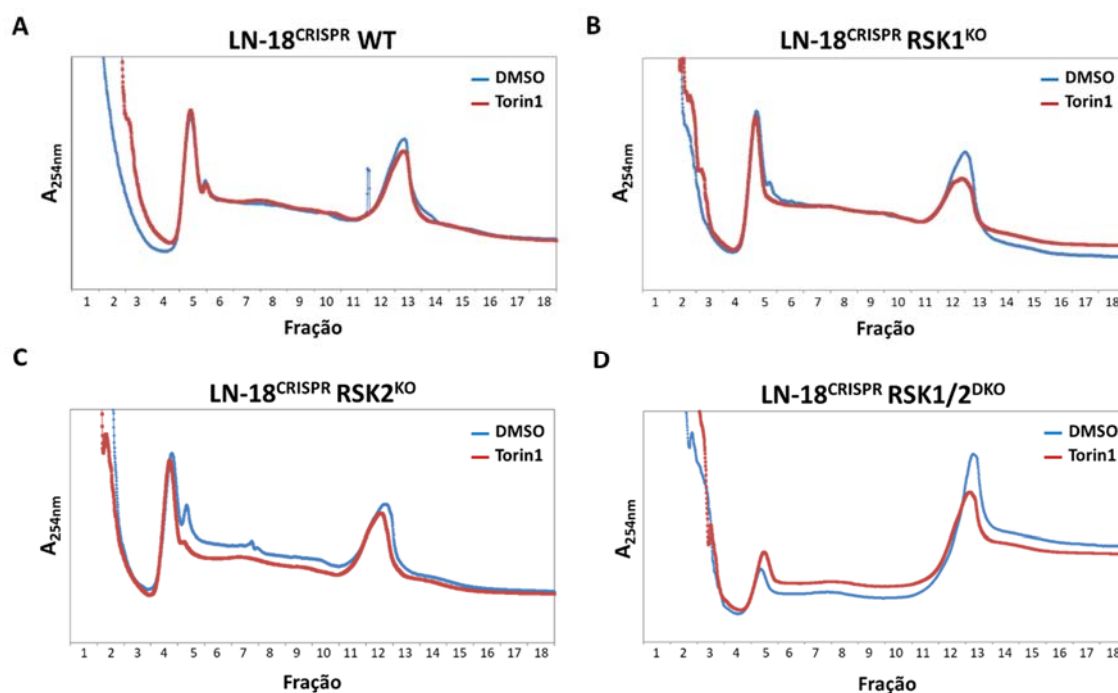


Figura 32 - Perfil polissomal em gradiente não-linear para as células LN-18^{CRISPR}. As células foram carenciadas por 48 horas e pré-tratadas ou não com Torin1 (250 nM) por 30 minutos, seguido da adição de 10% SFB por seis horas. Após esse tempo, as células foram tratadas com 100 µg/mL cicloheximida e seguiu-se com a etapa de preparação dos extratos citosólicos. Os extratos foram aplicados em gradientes de sacarose 5%-34%-55% para realização do perfil polissomal, cujos resultados são apresentados para as células LN-18^{CRISPR} (A) WT, (B) RSK1^{KO} (C) RSK2^{KO} e (D) DKO. As imagens são representativas de dois experimentos independentes.

Antes da extração de RNA a partir das frações, foi adicionado a cada uma delas o mRNA controle de luciferase (2,5 ng/µl). A adição de um mRNA exógeno nas frações foi uma estratégia usada como um fator de correção para variações que poderiam ocorrer decorrentes de perda de material durante a extração dos mRNAs e durante o processo de retrotranscrição. Essa perda pode variar de um grupo de frações para o outro, assim, usando o mRNA da luciferase, conseguimos corrigir os resultados obtidos na RT-qPCR (Thoreen et al. 2012). Analisamos os níveis dos mRNAs de interesse em cada amostra normalizados pelos níveis do mRNA controle de luciferase.

Nossos mRNAs de interesse correspondem àqueles que possuem a sequência 5'TOP. Por isso, fizemos a RT-qPCR para dois mRNAs incluídos nessa família, *PABPC4* e *RPS11*. O gene *PABPC4* codifica uma proteína citoplasmática de ligação à cauda poli(A), que possui um importante papel na regulação da expressão gênica. Ela é responsável por unir as duas extremidades do mRNA, contendo o *cap* e a cauda poli(A) (Goss e Kleiman 2013). O gene *RPS11* codifica a proteína ribossomal S11 (Higa et al. 1999). A Figura 33 apresenta o resultado de dois experimentos independentes, após normalização dos níveis de *PABPC4* (Figura 33, B)

e *RPS11* (Figura 33, C) pelos níveis de luciferase. Para ambos os mRNAs, observa-se uma maior redução nos níveis de mRNA nas células nocautes para RSK1 após tratamento com Torin1. Esse resultado está em acordo com os achados anteriores, acerca da manutenção da tradução de mRNAs que possuem a sequência 5'TOP quando mTORC1 está inativado pela isoforma RSK1. Também foi avaliado o nível do mRNA total de *PABPC4* e *RPS11* (Figura 33, D e E). Diferentemente dos resultados obtidos com o mRNA polissomal, nenhuma diferença nos níveis de *PABPC4* foi observada para células RSK1^{KO} controle e tratadas com Torin1, ressaltando as limitações de se analisar apenas o mRNA total (transcriptômica). Também não houve redução nos níveis de mRNA total após o tratamento com Torin1.

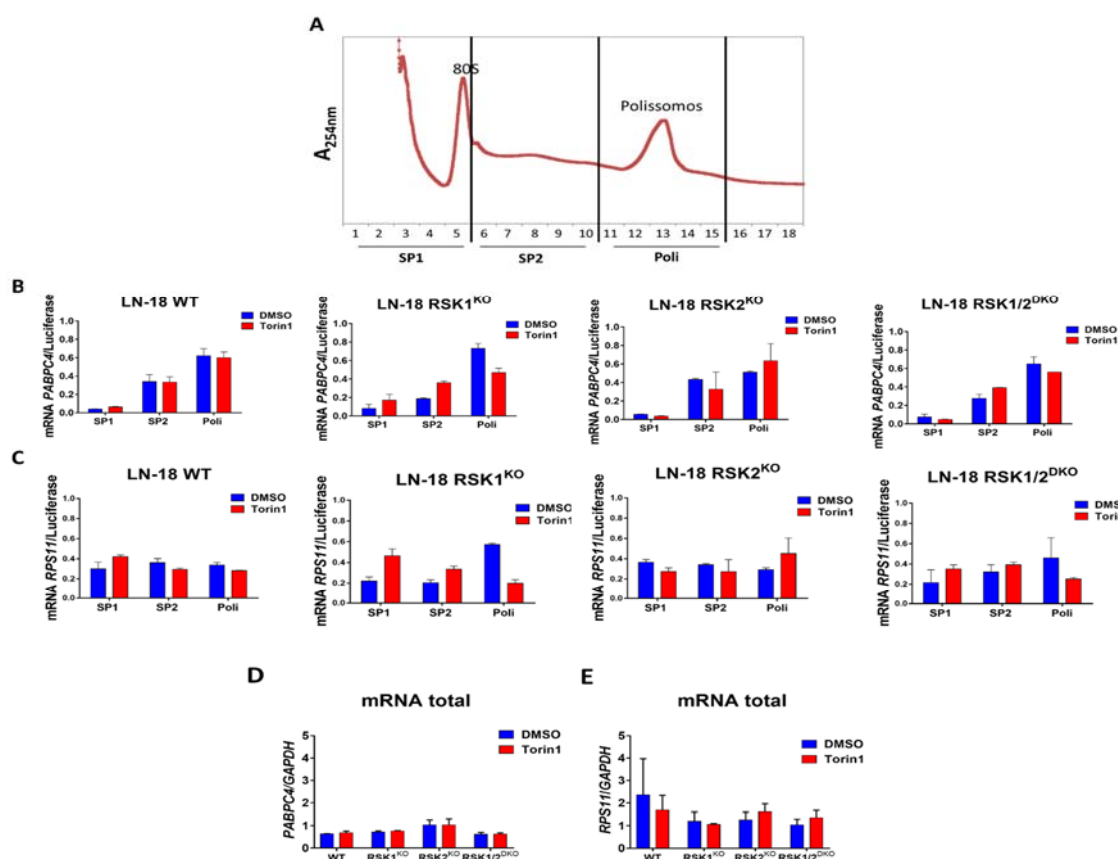


Figura 33 - Expressão de dois 5'TOP mRNAs, *PABPC4* e *RPS11*, nas frações obtidas do perfil polissomal das células LN-18^{CRISPR}. (A) O perfil polissomal foi feito a partir de extratos de células previamente tratadas com Torin1 (250 nM) ou veículo e estimuladas com 10% SFB por seis horas. As frações obtidas foram separadas em três grupos com a mesma quantidade de frações em cada, subpolissomal 1 (SP1), subpolissomal 2 (SP2) e polissomal (poli). À cada fração, foi adicionado 2,5 ng do mRNA controle de luciferase, seguido da extração do mRNA presente nas frações com o reagente Tri. O mRNA obtido foi submetido à RT-qPCR para avaliar a expressão de dois 5'TOP mRNAs, (B) *PABPC4* e (C) *RPS11*, com normalização pelos níveis de luciferase. (D) Avaliação dos níveis de mRNA total de *PABPC4* e (E) *RPS11* nos extratos celulares. Os gráficos foram construídos com o programa GraphPad Prism e são representativos de dois experimentos independentes.

4.5.2 Tradução de 5'TOP mRNAs em diferentes linhagens celulares de GBM

Para avaliar o efeito da isoforma RSK1 sobre a tradução de 5'TOP mRNAs em outro modelo, fizemos os mesmos experimentos com três linhagens celulares de GBM, LN-18, A172 e U118-MG, que apresentam naturalmente níveis variáveis da isoforma RSK1. Inicialmente, utilizamos o gradiente linear de sacarose 5%-50% para melhor visualização dos efeitos do tratamento com Torin1 nestas células. Devido a maior resolução deste gradiente, é possível identificar mudanças mais sutis na tradução (Figura 34). Neste perfil polissomal, vemos os picos referentes às subunidades ribossomais 40S e 60S, aos monossomos (80S) e aos polissomos, que estão distribuídos por um maior número de frações. Podemos observar que nas células tratadas com Torin1 o pico referente aos monossomos é maior e os picos referentes aos polissomos é menor, quando comparadas às células da condição controle.

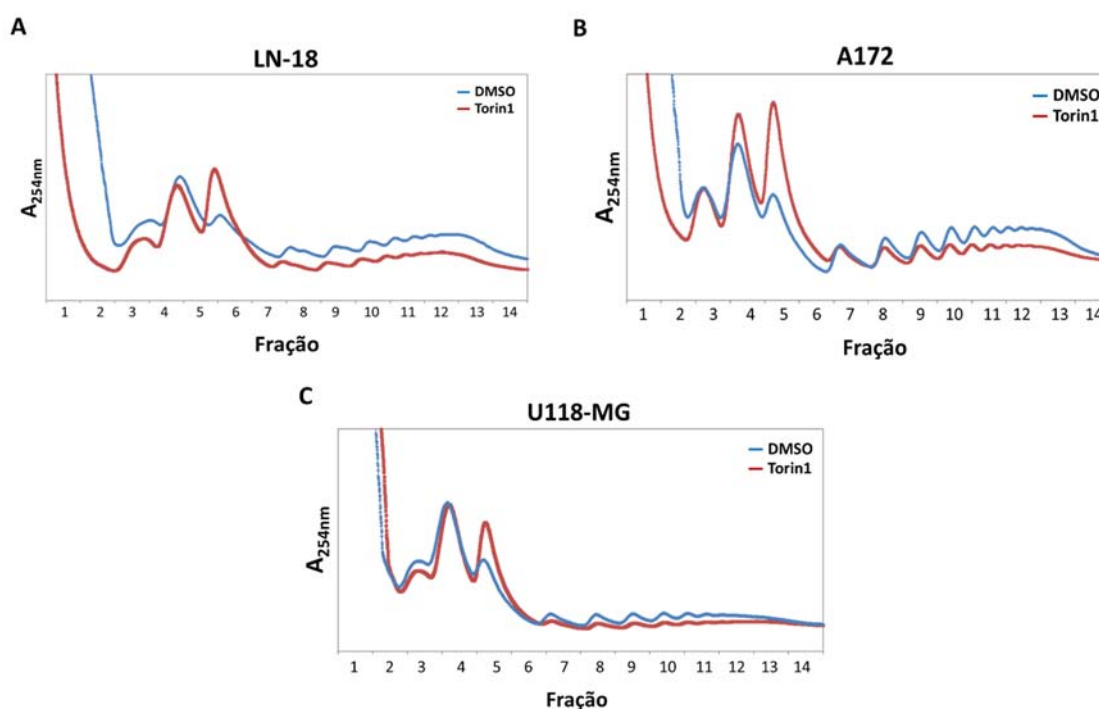


Figura 34 - Efeito de Torin1 na tradução em linhagens celulares de GBM. As células foram carenciadas por 48h e pré-tratadas com veículo (DMSO) ou Torin1 (250 nM) por 30 minutos, seguido de tratamento com 10% SFB por seis horas. Após esse tempo, as células foram tratadas com 100 µg/mL cicloheximida por sete minutos e seguiu-se com a etapa de preparação dos extratos celulares. Os extratos foram aplicados em gradiente de sacarose linear 5%-50% para execução do perfil polissomal, cujos resultados são apresentados nos gráficos em (A) para as células LN-18, (B) células A172 e (C) células U118-MG. Para estimar o nível de tradução de cada linhagem celular, observa-se a razão entre a área sob o pico de 80S e a área sob os picos dos polissomos.

Com o objetivo de analisar os níveis de mRNAs nas frações do perfil polissomal, optamos pelo uso do gradiente não-linear, que, comentado anteriormente, facilita a posterior extração de RNA devido ao menor número de frações pelas quais os polissomos se distribuem. Avaliamos os efeitos do tratamento com Torin1 a partir da fosforilação de 4E-BP1 nos extratos citoplasmáticos das linhagens celulares submetidas a este tratamento. Como esperando, não houve fosforilação de 4E-BP1 nas células tratadas com Torin1 (Figura 35, A). Os perfis polissomais foram preparados com o gradiente não-linear de sacarose 5%-34%-55%, em que se observa aumento nos picos dos monossomos e diminuição no pico dos polissomos nas células tratadas com Torin1 (Figura 35, B, C e D), o que indica redução das taxas de tradução após o tratamento. Em seguida, agrupamos as frações obtidas em três diferentes grupos (SP1, SP2 e Poli) e o mRNA foi extraído para avaliação dos níveis de dois mRNAs 5'TOP, *PABPC4* e *RPS11* (Figura 35, E e F), e de um mRNA que não tem a sequência 5'TOP, *GAPDH* (Figura 35, G). Nesse momento, ainda não tínhamos implementado a adição do mRNA controle de luciferase às frações, pois a princípio não esperávamos que a purificação das frações pelas colunas não fosse quantitativa. Por isso, a análise dos resultados para o mRNA polissomal foi feita inicialmente considerando o *pool* de amostras e a relativização pelos grupos SP1, SP2 e Poli (Tabela 6). Não foi observada diferença entre as células controle e tratadas com Torin1 no grupo polissomal, das células LN-18, que possuem níveis elevados de RSK1. Entretanto, ao comparar o grupo polissomal das células A172 e U118-MG, nas quais a expressão de RSK1 é baixa ou ausente, verifica-se redução dos níveis de mRNA 5'TOP após tratamento com Torin1 (Figura 35, E e F). Este resultado é similar ao observado nas células LN-18 nocautes para a isoforma RSK1 (Figura 33, B e C).

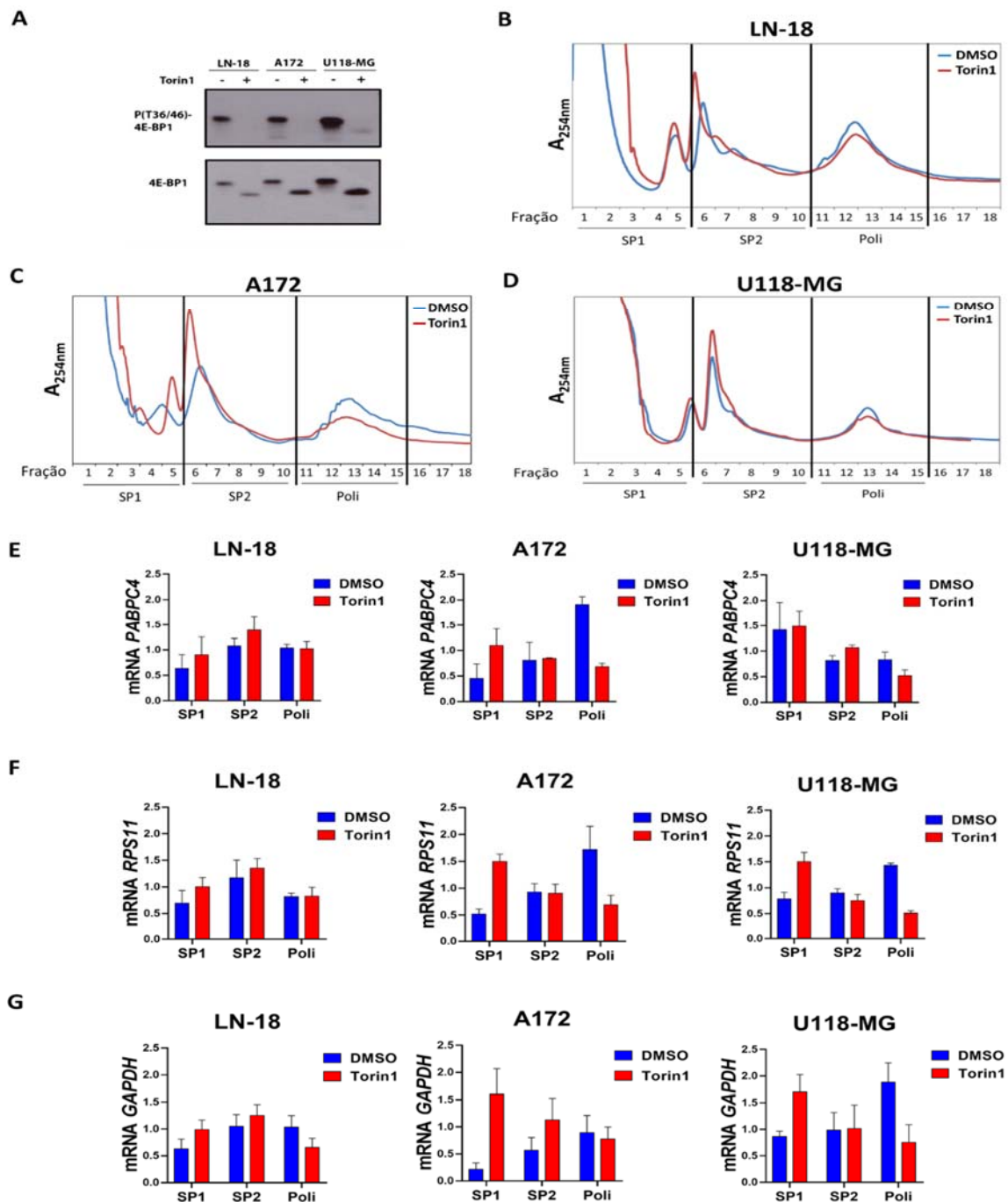


Figura 35 - A expressão de 5'TOP mRNAs é diferente em linhagens celulares com níveis diferentes de RSK1. (A) As células LN-18, A172 e U118-MG foram pré-tratadas com veículo (DMSO) ou Torin 1 (250 nM) por trinta minutos e, em seguida, estimuladas com 10% SFB por seis horas. Após tratamento durante sete minutos com cicloheximida 100 µg/mL, seguiu-se com o protocolo para extração de polissomos. Ao final, uma alíquota do extrato clarificado foi separada para análise dos níveis de 4EBP1 fosforilado e total por western blot. (B) Os extratos foram também aplicados em gradientes de sacarose 5%-34%-55% (não-linear) para execução do perfil polissomal para as células (B) LN-18, (C) A172 e (D) U118-MG. As frações obtidas foram separadas em três grupos, subpolissomal 1 (SP1), subpolissomal 2 (SP2) e polissomal (poli). Em seguida, o mRNA presente nas frações foi extraído com reagente Tri e submetido à RT-qPCR para avaliar a expressão de dois 5'TOP mRNAs, (E) *PABPC4* e (F) *RPS11*, e também a expressão de um gene que não possui a sequência 5'TOP, (G) *GAPDH*. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

Também avaliamos o nível do mRNA total de *PABPC4* e *RPS11* nos extratos citoplasmáticos das três linhagens celulares (Figura 36), mas essa análise não mostrou nenhuma diferença entre as células LN-18 e as células A172 e U118-MG, ao contrário do observado na análise do mRNA polissomal.

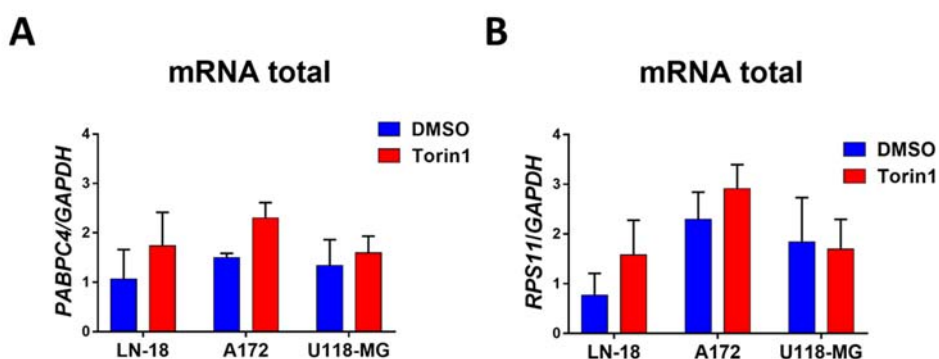


Figura 36 - mRNA total de *PABPC4* e *RPS11* nas células LN-18, A172 e U118-MG. As células foram pré-tratadas com veículo (DMSO) ou Torin 1 (250 nM) por trinta minutos e, em seguida, estimuladas com 10% SFB por seis horas. Após tratamento durante sete minutos com cicloheximida 100 µg/mL, seguiu-se com o protocolo para extração de polissomos. Ao final, uma alíquota do extrato clarificado foi separada para extração do RNA e mensuração dos níveis do mRNA total de (A) *PABPC4* e (B) *RPS11* por RT-qPCR. Resultados representativos de três experimentos independentes.

Para minimizar possíveis variações nos níveis de mRNA devido ao processo de extração e/ou retrotranscrição, é possível adicionar um mRNA exógeno nas amostras, antes da extração, para posterior normalização dos resultados. Assim, decidimos utilizar o mRNA controle de luciferase. Os resultados da RT-qPCR, com a normalização pelo mRNA controle de luciferase são apresentados na Figura 37. Embora o resultado seja referente a apenas um experimento, observa-se maior diferença entre os níveis de *PABPC4* e *RPS11* no grupo Poli ao comparar as células A172 controle e tratada com as demais células. Não houve diferença na expressão de *PABPC4* nas células U118-MG neste experimento, sendo necessário confirmação com experimentos adicionais.

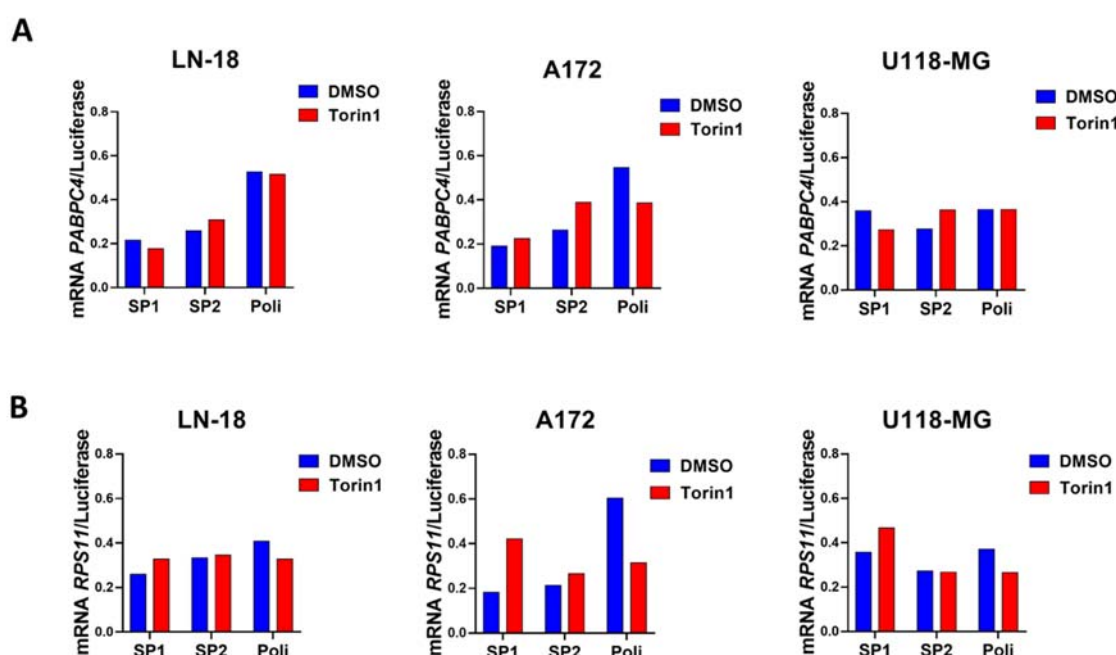


Figura 37 - Expressão de *PABPC4* e *RPS11* normalizada pelo mRNA controle de luciferase nas frações do perfil polissomal das linhagens celulares LN-18, A172 e U118-MG. O perfil polissomal foi feito a partir de extratos de células previamente tratadas com veículo (DMSO) ou Torin1 (250 nM) e estimuladas com SFB 10% por seis horas. As frações obtidas foram separadas em três grupos, subpolissomal 1 (SP1), subpolissomal 2 (SP2) e polissomal (poli). Previamente à extração do mRNA das frações, foi adicionado a cada fração 2,5 ng do mRNA controle de luciferase. O mRNA foi então submetido à RT-qPCR para avaliar a expressão dos mRNAs (A) *PABPC4* e (B) *RPS11*, que possuem a sequência 5'TOP, e também a expressão de luciferase. Resultado de um experimento.

Os resultados obtidos com as células LN-18^{CRISPR} e com as linhagens celulares LN-18, A172 e U118-MG demonstram que a isoforma RSK1 desempenha um importante papel na tradução de 5'TOP mRNAs, cuja regulação ainda não é completamente compreendida.

5 DISCUSSÃO

O GBM é um tumor cerebral maligno associado a prognóstico desfavorável. O esquema terapêutico empregado na prática clínica permanece o mesmo há muitos anos e nem todos os pacientes respondem a ele. Dessa maneira, a busca por novos tratamentos é essencial. Nos últimos anos, estudos, especialmente do TCGA, permitiram compreender em mais detalhes as características moleculares dos GBMs, revelando potenciais alvos terapêuticos. A via PI3K/Akt/mTOR encontra-se frequentemente alterada em GBMs e, portanto, há grande interesse em compreender como a sua desregulação afeta o desenvolvimento e progressão destes tumores e, consequentemente, as implicações clínicas relacionadas. De fato, inibidores de mTORC1 já foram incluídos em ensaios clínicos para pacientes portadores de GBM, porém sem benefícios relevantes (Mecca et al. 2018). De forma interessante, a via PI3K/Akt/mTORC1 possui alvos em comum com a via Ras/ERK/RSK, que também apresenta elevada frequência de alterações em GBMs. A proteína RSK faz o *crosstalk* entre essas duas vias, que estão relacionadas a diversos processos celulares, inclusive à síntese de proteínas. O papel da família de proteínas RSK em diversos tipos de tumor vem sendo investigado nos últimos anos. Entretanto, ela parece ter tanto uma função pró-tumoral quanto antitumoral, a depender da origem do tumor e da isoforma de RSK (Houles e Roux 2018). Até o momento, existem poucos estudos que buscaram investigar o papel das RSKs em GBMs. Em Sulzmaier et al. (2016) foi reportado que a isoforma RSK2 regula os processos de invasão e migração. Entretanto, este estudo apresentou algumas limitações que comprometem essa conclusão, como o uso de um inibidor não específico de RSK, BI-D1870 (Roffé et al. 2015), e o uso de uma linhagem celular que apresenta níveis baixos ou indetectáveis de RSK1, RSK3 e RSK4, impedindo a compreensão dos reais efeitos destas isoformas. Em experimentos anteriores do nosso grupo (não publicados), o processo de migração foi avaliado nas células LN-18^{CRISPR} por meio do ensaio de *wound scratch*. Foi utilizado o inibidor do sítio ativo de mTOR, Torin1, para avaliar efeitos diretos da via Ras/ERK/RSK ou indiretos através da modulação da via de mTORC1. Os resultados mostraram menor migração em todas as células nocaute após tratamento com Torin1 quando comparado às células selvagens, indicando um possível papel das RSKs na migração de células de GBM. Em relação à expressão das isoformas de RSK em GBMs, um estudo recente do nosso grupo identificou que RSK1 e RSK2 possuem maior expressão em GBMs de pacientes, RSK3 está presente em níveis baixos e RSK4 não foi detectada (Hajj et al. 2020).

Isso está de acordo com a expressão das RSKs em linhagens celulares comerciais de GBM (Figura 11). Neste estudo, seguiu-se com a análise da expressão de RSK1 e RSK2 por imunohistoquímica, com a identificação de uma maior expressão e ativação de RSK1 em um subgrupo de astrocitomas de grau IV, que são os GBMs, quando comparado a astrocitomas de menores graus e tecido cerebral não tumoral. Além disso, a análise de sobrevida baseada na expressão de RSK1 e RSK2, mostrou que não havia pacientes com longa sobrevida entre aqueles cujos tumores tinham alta expressão de RSK1, ao contrário do observado em pacientes com alta expressão de RSK2. Também foi comparada a expressão de RSK1 em tumores primários de baixo grau e no respectivo tumor recorrente (GBM), sendo um aumento de RSK1 observado após a recorrência (Hajj et al. 2020). Esses resultados sugerem que a isoforma RSK1 desempenha importantes funções em GBMs, ressaltando a relevância de compreender quais processos são regulados por ela neste tipo de tumor.

Neste estudo, buscamos identificar o papel das RSKs na ativação de proteínas relacionadas ao processo de tradução e também no controle da tradução de mRNAs 5'TOP, como continuação de trabalhos anteriores do nosso grupo.

Na dissertação da aluna Danielle Pereira Nascimento, intitulada “Efeitos da regulação da tradução via RSKs em glioblastomas”, foram geradas as células LN-18 nocaute para RSK1 e/ou RSK2 como ferramenta para investigar o papel das RSKs na tradução (Nascimento 2019). Entretanto, as linhagens celulares comerciais de GBMs possuem diferenças em relação aos níveis de ativação de vias de sinalização celular. Por isso, nem sempre um resultado obtido para uma linhagem pode ser extrapolado para outra. Como forma de dar continuidade à investigação do papel das RSKs em vias de sinalização de GBMs e validar resultados anteriores, geramos células nocautes para RSK1, RSK2 e DKO a partir da linhagem celular LN-229. Esta possui menor expressão de RSK1 e menor ativação de Akt/mTORC1 do que as células LN-18 (Roffé et al. 2015). Ela também apresenta deleção do gene *NFI* (Mcgillicuddy et al. 2009), que regula negativamente a atividade de Ras (Cichowski et al. 2003). Portanto, a ativação da via Ras/ERK/RSK deve ser maior nestas células, como demonstrado em GBMs de pacientes com deleção ou mutação em *NFI* em estudos do TCGA (Brennan et al. 2013). Devido a essas diferenças, a geração de células LN-229 nocaute para RSK1 e/ou RSK2 é mais um modelo útil para o estudo de alterações moleculares em GBMs.

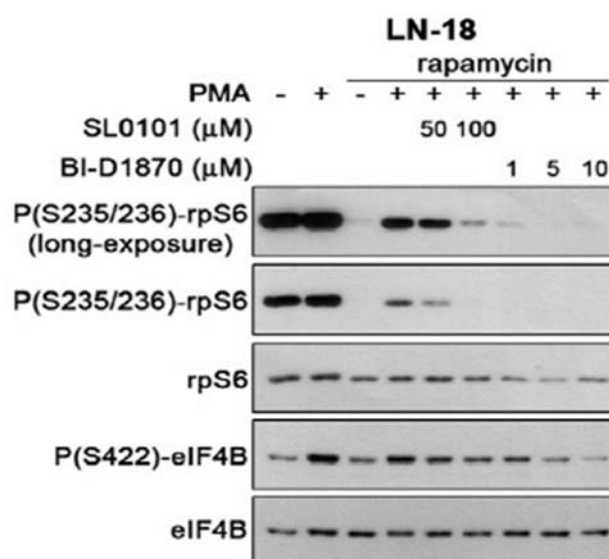
As células nocaute foram geradas a partir do sistema CRISPR/Cas9, uma técnica que possui diversas vantagens, como a facilidade de padronização; a possibilidade de utilizar sgRNAs que têm como alvo diferentes regiões do genoma, tornando possível uma edição genética *multiplex*; e a eficiência na geração de nocautes (Ran et al. 2013; Xiao-Jie et al. 2015).

Entretanto, uma das principais limitações do sistema CRISPR/Cas9 é a ocorrência de efeitos *off target*, o que interfere com resultados experimentais e é um importante obstáculo para a aplicação terapêutica desta técnica (Listgarten et al. 2018). Os efeitos *off target* podem estar relacionados com particularidades de determinada célula, por exemplo, a integridade dos mecanismos de reparo de danos na fita dupla e a metilação do DNA em ilhas CpG, que reduz a eficiência de ligação da Cas9, ou ainda com variáveis experimentais. Algumas estratégias utilizadas para minimizar a ocorrência dos efeitos *off target* são o uso de Cas9 e sgRNAs sem estarem incorporadas a um plasmídeo, por serem rapidamente degradadas (Zhang et al. 2015); o uso de sgRNAs contendo cerca de vinte nucleotídeos, além da necessidade da sequência PAM adjacente à região alvo do genoma; e o uso da Cas9 *nickase*, que requer duas sgRNAs em que os alvos estejam adjacentes, de forma a introduzir simultaneamente cortes em cada uma das fitas de DNA da região alvo e, assim, quebrar a fita dupla, o que aumenta a especificidade da técnica (Ran et al. 2013). Neste estudo, as sgRNAs utilizadas foram desenhadas com um algoritmo que auxilia na identificação de sequências alvo que tenham menor probabilidade de gerar efeitos *off target*, porém, ainda é possível que isso aconteça. Assim, como estratégia adicional, duas sgRNAs diferentes para cada isoforma (RSK1 e RSK2) foram utilizadas. O uso de dois pares de guias, A e B, permitiria a geração de dois conjuntos de células nocaute e a comparação dos efeitos observados entre células nocaute geradas por guias diferentes. Como a probabilidade de que duas guias com sequências diferentes causem os mesmos efeitos *off target* é baixa, esta seria uma abordagem simples para controlar a ocorrência desses efeitos. Entretanto, não foi possível gerar todas as células nocaute de interesse ao utilizar a guia B, como ocorreu também para as células LN-18^{CRISPR}, o que limitou as análises comparativas. Existem diversos métodos que poderiam ser utilizados alternativamente para detectar possíveis efeitos *off target* nas células geradas, como sequenciamento de nova geração (NGS); sequenciamento do exoma; avaliação do transcriptoma por microarranjo ou RNA-seq, entre outros (Wu et al. 2014). De forma mais simples, os resultados poderiam ser comparados com os efeitos observados após re-expressão das RSKs nas células nocaute ou comparados com células que possuem diferentes níveis endógenos da proteína em questão.

Após a geração das células nocaute de interesse, analisamos a expressão das isoformas RSK3 e RSK4 (Figura 25), que permaneceu indetectável, como demonstrado anteriormente para as células LN-229 selvagens (Figura 11). Essa confirmação foi importante, pois a ausência das outras isoformas poderia desencadear algum mecanismo de compensação que levasse à expressão de RSK3 e/ou RSK4. Além disso, comparamos o comportamento das células nocaute antes de prosseguir com os experimentos. De forma preliminar, foi possível observar diferenças

no nível de P(S422)-eIF4B ao comparar as células RSK1^{KO} e RSK2^{KO} geradas pela guia A, com menor fosforilação de eIF4B nas células RSK1^{KO}.

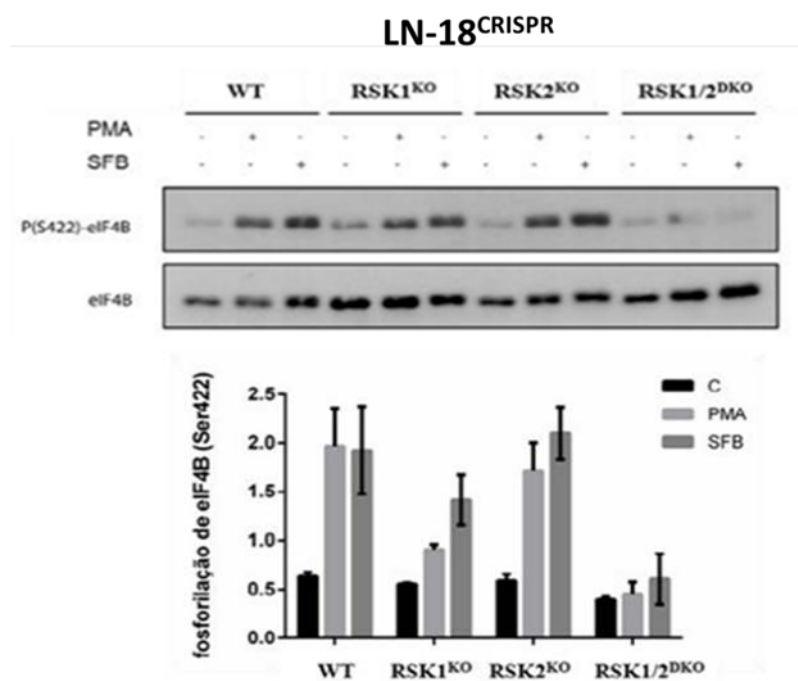
O efeito das RSKs sobre a fosforilação de eIF4B já havia sido avaliado em alguns trabalhos anteriores do nosso grupo. Inicialmente, Roffé et al. (2015) demonstraram que as RSKs possuem um papel importante sobre a fosforilação de eIF4B em células LN-18 selvagens (Figura 38). Quando essas células foram tratadas com rapamicina, inibidor alostérico de mTORC1, não houve redução da fosforilação de eIF4B. Em um estudo com células hematopoiéticas, o efeito do tratamento com rapamicina sobre a fosforilação de eIF4B foi similar ao observado nas células LN-18 (Van Gorp et al. 2009). Ainda, o tratamento das células LN-18 com inibidores químicos de RSK (BI-D1870 e SL-0101) e/ou rapamicina, resultou em menor fosforilação de eIF4B após o uso dos inibidores de RSK quando comparado com as células tratadas apenas com rapamicina (Figura 38) (Roffé et al. 2015). Esses resultados sugeriram que a fosforilação de eIF4B no sítio Ser422 é mais dependente da via Ras/ERK/RSK do que de mTORC1/S6K nas células de GBM LN-18, o que foi confirmado neste estudo a partir das células LN-229^{CRISPR} e utilizando Torin1 para inibir mTORC1. Outro resultado interessante no trabalho de Roffé et al. (2015) foi a redução na fosforilação de rpS6 após tratamento apenas com rapamicina, diferentemente do observado para eIF4B (Figura 38).



Fonte: Roffé et al. (2015).

Figura 38 - Efeitos do tratamento com rapamicina e/ou inibidores de RSK na fosforilação de eIF4B e rpS6. As células foram carenciadas por 48 horas e tratadas com rapamicina, SL0101 e/ou BI-D1870 por 30 minutos, nas concentrações indicadas. Em seguida, foram estimuladas com 100 ng/mL PMA por 15 minutos. Os extratos proteicos foram preparados e aplicados no western blot para avaliação dos níveis de P-rpS6 e P-eIF4B.

Como inicialmente o efeito das RSKs foi investigado apenas a partir do uso dos inibidores SL0101 e BI-D1870 (Figura 38), não era possível determinar se os efeitos observados seriam mediados por uma das isoformas de RSK de maneira específica ou não. Posteriormente, após a geração das células LN-18^{CRISPR}, o efeito das RSKs sobre a fosforilação de eIF4B pôde ser melhor investigado (Nascimento 2019). Após estímulo das células LN-18^{CRISPR} com PMA ou 10% SFB, observou-se acentuada redução na fosforilação de P(S422)-eIF4B nas células RSK1^{KO} e DKO, indicando uma inédita regulação isoforma-específica por RSK1 (Figura 39).



Fonte: Nascimento (2019).

Figura 39 - Avaliação dos níveis de fosforilação de eIF4B nas células LN-18 nocaute para RSK1 e/ou RSK2. As células LN-18 *wild type*, RSK1^{KO}, RSK2^{KO} e DKO foram carenciadas por 48h e em seguida estimuladas com 100 ng/mL PMA ou 10% SFB por 15 minutos. A partir dos extratos celulares, foi avaliado o nível de p-eIF4B. Resultados de três experimentos independentes

Neste estudo, pudemos avaliar a fosforilação das proteínas de interesse nas células LN-299^{CRISPR}. Foi avaliada não apenas a fosforilação de eIF4B, mas também de rpS6 e eEF2K, que são outros alvos compartilhados por S6K e RSK. Também foi utilizado Torin1, capaz de inibir mTORC1 e mTORC2. A rapamicina, utilizada no experimento com as células LN-18 (Figura 38) não inibe completamente as funções de mTORC1, sendo mais adequado o uso do inibidor de sítio ativo Torin1 para determinar efeitos independentes de mTOR na fosforilação de eIF4B, rpS6 e eEF2K. A ausência de fosforilação de 4E-BP1 após tratamento com Torin1 confirma os efeitos deste inibidor nas células, já que, embora 4E-BP1 seja fosforilada por outras quinases,

em geral elas dependem de uma fosforilação prévia por mTORC1 para que possam fosforilar os sítios correspondentes (Qin et al. 2016). Neste experimento (Figura 27), alguns resultados interessantes foram observados. Primeiro, a fosforilação de rpS6 e de eIF4B parece ser regulada de maneiras diferentes nas células de GBM quando mTORC1 está inativo. Após tratamento com Torin1, a fosforilação de rpS6 foi praticamente inibida em todas as células LN-229^{CRISPR}, indicando que ela é mais dependente da via PI3K/Akt/mTORC1 do que da via Ras/ERK/RSK e que a contribuição das isoformas RSK1 e RSK2 é a mesma no contexto de inibição de mTORC1. Considerando o cenário das alterações moleculares frequentemente encontradas em GBMs, a regulação da fosforilação de rpS6 poderia ser diferente do relatado na literatura para outros tipos celulares. Ainda assim, a menor contribuição de RSK na fosforilação de rpS6 nas linhagens celulares de GBM foi similar a resultados obtidos em células HeLa e HEK293. Após *knockdown* com RNA de interferência para S6K1, S6K2, RSK1 e RSK2, as células foram tratadas com wortmanina (inibidor de PI3K), rapamicina, U0126 (inibidor de MEK) ou fmk (inibidor de RSK) para avaliação dos efeitos sobre a fosforilação de rpS6 (Roux et al. 2007). Em outro estudo, hepatócitos de camundongos nocautes para S6K1 e S6K2 foram tratados com wortmanina, rapamicina, U0126 e outro inibidor de MEK, PD184352 (Pende et al. 2004), chegando a semelhantes conclusões. Em relação à fosforilação de rpS6 nos sítios Ser235/236, foi reportado que seus níveis aumentam de acordo com o grau dos gliomas e que esse aumento está associado a pior prognóstico (Yang et al. 2011; Mueller et al. 2012). Interessantemente, em GBMs há aumento da expressão e fosforilação de AKT, que contribui para a ativação de rpS6 (Alvarenga et al. 2017), e aumento também da fosforilação de rpS6 nos sítios 240 e 244 (Machado et al. 2018), todos esses achados relacionados a pior sobrevida. Estes trabalhos indicam a relevância da ativação de rpS6 em GBMs e a importância de compreender os mecanismos relacionados a sua fosforilação, como apresentado em nossos resultados.

No caso da fosforilação de eIF4B, houve redução nas células tratadas com Torin1 em comparação às células tratadas apenas com PMA, porém, de forma importante, ela não foi completamente inibida. A manutenção da fosforilação de eIF4B é, possivelmente, um mecanismo importante para as células tumorais. Em um trabalho com células HeLa, foi demonstrado que eIF4B controla a tradução de mRNAs relacionados à sobrevivência e proliferação celular, como c-myc e Bcl-2 que, inclusive, possuem estruturas secundárias na região 5'UTR. A tradução de mRNAs com estruturas secundárias depende da ação de eIF4A, cuja atividade de helicase é estimulada por eIF4B (Shahbazian et al. 2010). Em outro estudo, com células de levedura, foram identificados mais de 100 mRNAs cuja tradução é dependente de eIF4B e, adicionalmente, que eIF4B consegue atuar no controle da tradução de forma

independente de eIF4A (Sen et al. 2016). Em relação à regulação da fosforilação de eIF4B, Shahbazian et al. (2006) foram os primeiros a demonstrar a contribuição tanto de mTORC1/S6K quanto de ERK/RSK, em células HeLa, porém ressaltando que a contribuição relativa de cada quinase varia de forma dependente de fatores de crescimento e das cinéticas de ativação. Assim, a regulação da fosforilação de eIF4B pode acabar sendo influenciada pelas alterações moleculares presentes em determinado contexto que, por sua vez, levam à ativação aberrante de vias de sinalização. No estudo de Degen et al. (2013) com linhagens celulares de carcinoma de células escamosas, foi observada redução na fosforilação de eIF4B após tratamento com rapamicina em algumas células, enquanto em outras não, indicando a complexidade desta regulação. Outro resultado interessante foi a diferença na fosforilação de eIF4B após inibição com Torin1 de acordo com a célula nocaute analisada. Nas células LN-229 RSK1^{KO} e DKO, ocorreu menor fosforilação do que nas células RSK2^{KO}, o que está de acordo com a fosforilação isoforma específica por RSK1, observada nas células LN-18^{CRISPR} (Figura 39). É interessante mencionar que as células LN-18 possuem níveis proteicos de RSK1 três vezes maiores do que de RSK2 (dados não publicados; Figura 40) e, portanto, RSK1 poderia ter um papel mais importante nessa linhagem celular do que nas outras. Entretanto, nas células LN-229, em que a expressão de RSK1 é equivalente à expressão de RSK2, a falta de efeito sobre a fosforilação de eIF4B no nocaute de RSK2 após tratamento com Torin1 foi similar ao observado nas células LN-18 RSK2^{KO}. Dessa maneira, é provável que a fosforilação de eIF4B seja um evento predominantemente mediado por RSK1, ou seja, isoforma específico.

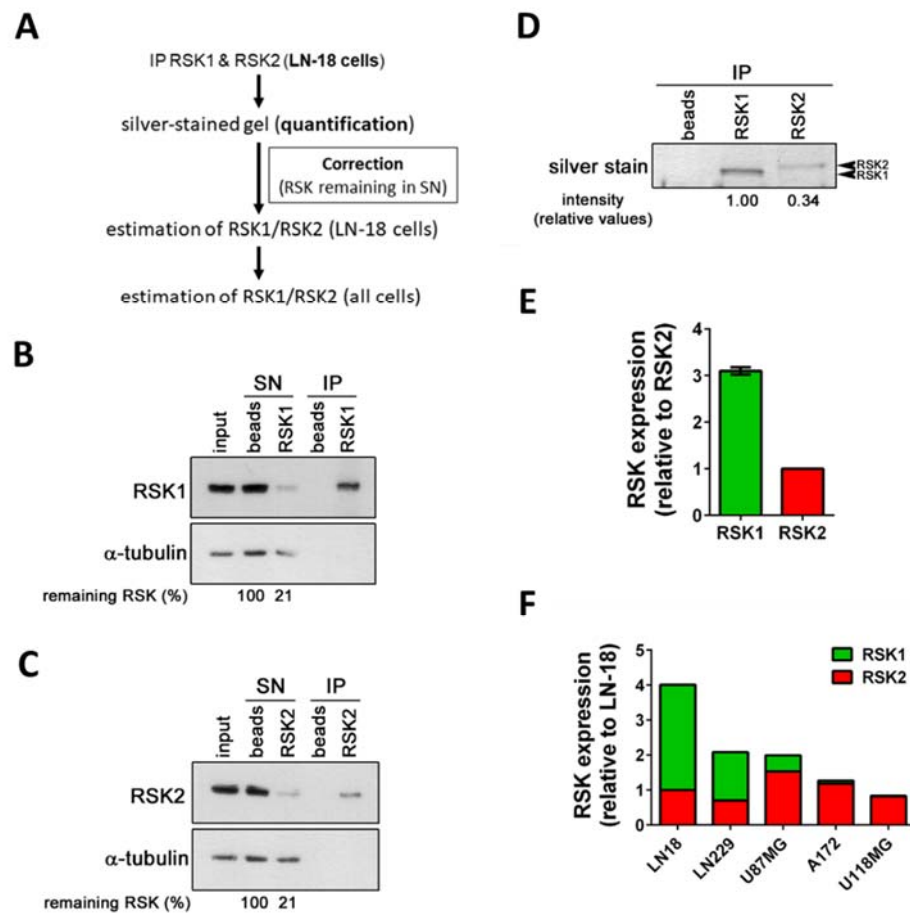


Figura 40 - Quantificação dos níveis de RSK1 e RSK2 em linhagens celulares de GBMs. (A) Esquema do desenho experimental, em que foi feita a imunoprecipitação (IP) de RSK1 e de RSK2 a partir de extratos de células LN-18. Após IP, as amostras foram aplicadas em gel de poliácridamida com SDS, que foi posteriormente corado com prata para quantificar RSK2 em relação à RSK1. (B) IP de RSK1 e de (C) RSK2. As porcentagens de RSK que permaneceram no sobrenadante (SN) foram usadas para corrigir os níveis de RSKs. (D) Isoformas RSK1 e RSK2 imunoprecipitadas. (E) Quantificação das isoformas imunoprecipitadas, corrigidas pelo sobrenadante. (F) Estimativa da quantidade de RSK1 e RSK2 nas linhagens celulares de GBM a partir dos resultados da IP e dos resultados da Figura 11 (Dados não publicados).

Outro ponto a ser destacado é a manutenção da fosforilação de eIF4B nas células DKO após tratamento com Torin1 nas células LN229^{CRISPR}. Considerando que eIF4B aumenta a atividade de helicase de eIF4A (Harms et al. 2014), a tradução de mRNAs com regiões 5'UTR complexas e longas é mantida mesmo após inibição de mTORC1 e na ausência de RSK, favorecendo a tradução de determinados mRNAs nesse contexto.

Em relação à proteína eEF2K, a fosforilação foi mantida nas células controle não estimuladas com PMA e não houve redução em nenhuma célula nocaute após tratamento com Torin1. Considerando as vias de sinalização envolvidas com sua ativação, esses resultados não eram esperados. Leprivier e et al. (2013) relataram redução da fosforilação de eEF2K no sítio Ser366, em fibroblastos, após tratamento com inibidores químicos de MEK (PD184352) e de

RSK (BI-D1870). Como em nossos resultados a fosforilação se manteve até mesmo após o tratamento com Torin1 nas células DKO, é provável que outras quinases estejam envolvidas na fosforilação de eEF2K em GBM, principalmente se levarmos em consideração as funções desta proteína. Além de participar da síntese de proteínas, ela também regula a diferenciação celular e a transformação maligna e confere tolerância a condições de estresse, como privação de nutrientes, hipóxia e danos ao DNA, em células tumorais (Zhu et al. 2015). De forma interessante, altos níveis de eEF2K foram associados a pior sobrevida em meduloblastomas e GBMs, e a expressão de eEF2K foi maior em GBMs do que em tecido cerebral normal (Leprivier et al. 2013). Além de tumores do SNC, o aumento da expressão eEF2K foi reportado em outros tumores sólidos, como de pâncreas, mama e pulmão (Karakas e Ozpolat 2020). Além disso, a presença de mutações em dois sítios de fosforilação regulados por mTORC1, Ser366 e Ser396, levou a um aumento na ativação de eEF2K em células HEK293 mutantes quando comparadas às células selvagens. Os autores sugerem que a ativação causada pelas mutações pode sobrepor os estímulos dependentes de mTORC1/S6K. Em tumores, mutações no sítio Ser366 foram descritas em carcinoma urinário e de esôfago (Wang et al. 2014). Embora inibidores de eEF2K ainda não tenham sido avaliados em ensaios clínicos, estudos pré-clínicos em células de câncer de mama (Tekedereli et al. 2012), pâncreas (Ashour et al. 2014) e GBM (Zhang et al. 2011) reportaram aumento da apoptose após inibição de eEF2K, por diferentes mecanismos. Em duas linhagens celulares de GBM, a inibição de eEF2K com RNA de interferência ou com o inibidor farmacológico NH125 aumentou a apoptose induzida pelo tratamento com *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) (Zhang et al. 2011). Considerando o importante papel desempenhado por eEF2K em tumores, ela surge como um potencial alvo terapêutico. Além disso, essa quinase possui um único alvo descrito até o momento e sua inibição não compromete a viabilidade de células não tumorais, o que possivelmente proporcionaria o desenvolvimento de inibidores com menos efeitos colaterais (Liu e Proud 2016).

Com o objetivo de analisar a fosforilação de eIF4B e rpS6 em outro modelo, utilizamos cinco linhagens celulares selvagens de GBM (LN-18, LN-229, U87-MG, A172 e U118-MG) que, inclusive, expressam diferentes níveis de RSK1 (Figura 11). Em três linhagens celulares (LN-229, U87-MG e U118-MG) observou-se inibição quase completa da fosforilação de rpS6 após tratamento com Torin1. Curiosamente, isso não foi observado nas células LN-18 e A172, que mantiveram um nível de fosforilação considerável de rpS6 após tratamento com Torin1. A fosforilação de rpS6 observada na linhagem LN-18 pode ser explicada pela elevada expressão de EGFR nessas células, como descrito no trabalho de Berezowska et al. (2010). Foi reportado

que, quando as células LN-18 foram estimuladas apenas com EGF, observou-se um grande aumento na fosforilação de ERK1/2 em relação às células não-estimuladas. O SFB utilizado em nosso experimento estimula receptores como o EGFR, devido aos fatores de crescimento presentes, o que resultaria na ativação de ERK. Como discutido anteriormente, a fosforilação de ERK ativa seus substratos, sendo um deles RSK. Por sua vez, RSK é capaz de fosforilar rpS6. Inclusive, a linhagem celular LN-18 possui maior nível de RSK1, que poderia contribuir, juntamente com a maior ativação da via, para a fosforilação de rpS6. No caso da linhagem celular A172, é possível que os efeitos da ativação anormal da vias de sinalização não sejam completamente revertidos pelo tratamento com Torin1. Liu et al. (2017) também encontraram níveis maiores de fosforilação de rpS6 nas células A172 do que na linhagem celular LN-229. Outra observação em nossos resultados foi a de que o nível de fosforilação de rpS6 foi maior nas células controle do que quando as células A172 foram estimuladas com 10% SFB. Possivelmente, alterações genéticas levam à ativação das vias de sinalização independentemente de estímulos.

Nas linhagens celulares de GBM, também foi observada a manutenção da fosforilação de eIF4B após inibição de mTORC1. Além da participação na síntese de proteínas, eIF4B controla a sobrevivência e proliferação celular (Shahbazian et al. 2010). Portanto, a fosforilação pode favorecer a resistência ao uso de inibidores de mTORC1, sendo provável que a fosforilação ocorra porque a proteína RSK, que também fosforila eIF4B, permanece ativa. Entretanto, mesmo nas células que não possuem nenhuma das isoformas de RSK (DKO), quando tratadas com Torin1, foi observada fosforilação de eIF4B. Este resultado também sustenta o envolvimento de outra quinase, seguramente da família AGC, quando mTORC1 e RSK não estão ativas.

Nossos resultados ajudam a entender o comportamento de diferentes células de GBM quando tratadas com o inibidor de mTORC1, Torin1. Considerando que inibidores de mTORC1 são potenciais terapias para pacientes portadores de GBMs, é de grande importância compreender quais são os possíveis mecanismos moleculares associados à resistência a esses inibidores. Isto também permite avaliar os potenciais benefícios clínicos para os pacientes e evitar que eles sejam submetidos a tratamentos que não serão efetivos.

Além de avaliar componentes das vias de sinalização Ras/ERK/RSK e PI3K/Akt/mTORC1 relacionados à síntese de proteínas, também buscamos avaliar a tradução das células LN-229^{CRISPR} por meio do perfil polissomal. Neste caso, optamos por usar o gradiente de sacarose 5-50%, em que é possível analisar a tradução de forma mais detalhada através de um perfil polissomal onde se visualizam picos referentes às subunidades ribossomais,

monossomos e polissomos. Entretanto, tivemos dificuldade em obter os picos referentes aos polissomos. Uma possível explicação para isso seria a necessidade de obter maior quantidade de amostra para o perfil polissomal. Por isso, também fizemos um experimento partindo de uma maior quantidade de células, mas, ainda assim, o resultado foi igual aos anteriores. No trabalho de Bell et al. (2018), o perfil polissomal para as células LN-229 apresenta picos discretos referentes aos polissomos. Nossos resultados indicam que as taxas de tradução desta linhagem celular são baixas, mesmo nas células que não foram tratadas com Torin1. Para avaliar a tradução sob outra perspectiva, decidimos analisar a distribuição dos mRNAs nas frações obtidas do perfil polissomal (Figura 33). Embora nossos resultados sejam preliminares, eles sugeriram que as células RSK1^{KO} apresentam menor tradução geral. Neste contexto, as alterações moleculares nas células LN-229 podem explicar as menores taxas de tradução, como a menor ativação de Akt/mTORC1 (Roffé et al. 2015) e a mutação em *NFI*, o que torna essas células mais dependentes da ativação de Ras/ERK. Para comparação, as células A172 e U118-MG têm perda de *PTEN* (Ishii et al. 1999), o que resulta na hiperativação de PI3K/Akt/mTORC1 e, para elas, foi possível avaliar as taxas de tradução através do perfil polissomal e o efeito do tratamento com Torin1 na tradução foi evidente (Figura 34).

Neste trabalho, também investigamos o controle da tradução de 5'TOP mRNAs pelas RSKs. Na dissertação da aluna Danielle Pereira Nascimento, resultados interessantes foram obtidos com as células LN-18^{CRISPR} em experimentos de translatômica, com o objetivo de determinar o papel das RSKs na tradução (Nascimento 2019). Também foi utilizado o inibidor Torin1, para eliminar os efeitos da ativação de mTORC1, e foi observado que as isoformas RSK1 e RSK2 controlam a tradução de famílias específicas de mRNAs quando mTORC1 está inativado. As células RSK1 nocaute apresentaram um maior número de mRNAs regulados negativamente, entre eles, 5'TOP mRNAs.

Além da participação de mTORC1 na regulação da tradução dos 5'TOP mRNAs, como demonstrado em estudos em que a inibição de mTORC1 resultou na inibição da tradução de 5'TOP mRNAs (Thoreen et al. 2012; Hsieh et al. 2012), por muito tempo buscou-se identificar quais seriam as outras proteínas relacionadas à regulação da tradução dessa família de mRNAs. Atualmente, sabe-se que LARP1 regula a estabilidade dos 5'TOP mRNAs e também inibe sua tradução, ao interagir com a estrutura 5'cap e impedir a ligação de eIF4E. Consequentemente, a etapa de iniciação da tradução é inibida (Fonseca et al. 2015; Lahr et al. 2017). Também é importante ressaltar que LARP1 foi identificada recentemente como um alvo de mTORC1 e que a interação entre essas proteínas contribui, ao menos em parte, para a regulação dos 5'TOP mRNAs (Fonseca et al. 2015). Entretanto, os resultados anteriores da translatômica apontaram

que RSK1 também desempenha um papel na regulação da tradução dos 5'TOP mRNAs, quando mTORC1 está inativado, sugerindo a importância de outros mecanismos de regulação.

O estudo dos 5'TOP mRNAs é relevante na área de oncologia, pois a sequência 5'TOP é um dos elementos regulatórios *cis* presente na 5'UTR que, junto com proteínas de ligação ao RNA e fatores *trans-acting*, modulam a tradução de mRNAs específicos e, portanto, o proteoma. Essa sequência foi associada à regulação da tradução de mRNAs envolvidos com síntese de proteínas, proliferação e metástase (Schuster e Hsieh 2019). Assim, diversos 5' TOP mRNAs possuem potencial oncogênico. Por exemplo, o aumento da expressão de *PABPC1* foi relacionado à progressão tumoral e ocorrência de metástases em diferentes tipos de tumor, como câncer gástrico (Zhu J et al. 2015), de tireoide (Erinjeri et al. 2018) e de esôfago (Takashima et al. 2006). Wang et al. (2020) reportaram, a partir de dados do TCGA, que gliomas de alto grau apresentaram menor expressão de *PABPC1*, entretanto, esses dados são referentes aos níveis de transcritos (mRNA total), o que pode ser uma limitação, como discutido adiante. Além disso, a maior expressão de *PABPC1* foi associada a melhor prognóstico. Por outro lado, o aumento da expressão de RPS11 (um dos 5'TOP mRNAs analisados em nosso estudo) e/ou de RPS20, tanto a nível de mRNA quanto de proteína, foi associado a pior prognóstico. A análise de 578 GBMs utilizando dados do TCGA confirmaram essas conclusões (Yong et al. 2015). Interessantemente, Awah et al. (2020) mostraram que a proteína RPS11 contribui para a sensibilidade ao tratamento com os quimioterápicos etoposídeo e doxorrubicina, em linhagens celulares primárias de GBM, com a observação de que em células nocaute para RPS11 houve redução na resposta ao tratamento devido a alterações no processo de apoptose. Em relação a outras proteínas ribossomais, a expressão de RPS27 é maior tanto em gliomas de baixo grau (até 8,8 vezes) quanto em GBMs (até 4,6 vezes) quando comparado ao tecido normal. Também foi observado aumento na expressão de RPS27 em células-tronco de gliomas. Embora ela não tenha impactado a sobrevida, esses resultados sugerem que essa proteína pode desempenhar importante funções no processo de gliomagenese. De fato, o papel oncogênico de RPS27 já foi observado em outros tipos de tumores (Feldheim et al. 2020). De forma similar, a expressão de rpS6 foi maior em áreas de tecidos de GBM onde havia predominância de células-tronco tumorais. Além disso, rpS6 induziu características de células-tronco em linhagens celulares de GBM (Shirakawa et al. 2020). Esses resultados ressaltam a importância de compreender os mecanismos que regulam a tradução de 5'TOP mRNAs em tumores. O papel desses mRNAs é particularmente importante no caso de GBMs, já que sua regulação envolve mTORC1 e a via de sinalização PI3K/Akt/mTORC1 está hiperativada na maioria dos GBMs.

A transcriptômica envolve a análise de todos os mRNAs transcritos na célula, que podem estar envolvidos com a síntese de proteínas ou não, pois eles podem ser, por exemplo, armazenados ou degradados. Por outro lado, a translatômica corresponde à análise dos mRNAs que são ativamente traduzidos (Piccirillo et al. 2014) e, portanto, ela fornece informações melhor correlacionadas com o proteoma (Larsson et al. 2007). Além disso, devido aos mecanismos de controle traducional, a expressão gênica é, em grande parte, regulada a nível da tradução e não a nível da transcrição. Um dos mecanismos de controle traducional envolve eIF4E, que faz parte do complexo eIF4F, cuja formação é um dos pontos limitantes da etapa de iniciação da tradução. Sua hiperativação está relacionada à tumorigênese (Siddiqui e Soneberg 2015). Ao se avaliar os efeitos da superexpressão de eIF4E na expressão gênica através do translatoma e do transcriptoma, uma diferença quase dez vezes maior foi observada entre genes regulados a nível da tradução (1518) do que a nível da transcrição (141). Muitos desses genes estavam associados à regulação de processos oncogênicos, como proliferação e motilidade (Larsson et al. 2007). Diversos estudos também compararam a aplicação de análises de transcriptômica e translatômica para avaliação da expressão gênica. Tebaldi et al. (2012) investigaram os efeitos do tratamento com EGF, que reprograma a expressão gênica, no transcriptoma e no translatoma de células HeLa. Dentre os genes diferencialmente expressos, 90% foram identificados pela análise do translatoma e menos de 5% deles apresentaram alterações tanto no transcriptoma quanto no translatoma. Além disso, a comparação entre processos biológicos afetados pelas alterações identificadas no transcriptoma ou no translatoma predisseram fenótipos diferentes. Em outro trabalho, foi investigado o efeito da ativação de mTOR sobre o nível de mRNAs regulados a nível transcrricional ou pós-transcrricional em hepatócitos. Ausência de correlação foi observada entre as alterações identificadas na análise do RNA total e do mRNA associado aos polissomos, indicando que a regulação em cada um desses níveis abrange diferentes mRNAs. Além disso, os resultados sugeriram que a atividade de mTOR tem como principal alvo os transcritos modificados em nível pós-transcrricional (Parent et al. 2007). Em GBMs, os efeitos da radiação ionizante sobre o transcriptoma e o translatoma foram comparados, com uma variação dez vezes maior nos mRNAs traduzidos, sendo essa alteração similar às mudanças identificadas a nível de proteínas. Assim, o controle traducional da expressão gênica pode proporcionar um melhor entendimento dos mecanismos da resposta celular à radiação ionizante (Lü et al. 2006). Em um trabalho anterior do nosso grupo, análises de transcriptômica foram comparadas à translatômica para o estudo da expressão gênica em oito fragmentos obtidos de um caso de GBM. Dentre 326 genes diferencialmente expressos 162 deles não teriam sido identificados caso a translatômica não

tivesse sido incluída (Lupinacci et al. 2019). Todos esses achados evidenciam a relevância da aplicação da translatoômica em estudos de expressão gênica.

Assim, neste trabalho, buscamos validar o papel da isoforma RSK1 na regulação da tradução de 5'TOP mRNAs por meio da análise dos mRNA associados aos polissomos. Também comparamos esses resultados com a avaliação do mRNA total. Para isso, foram utilizadas as células LN-18^{CRISPR} e linhagens celulares de GBM selvagens, que possuem diferentes níveis de RSK1 (LN-18, A172 e U118-MG), tratadas com o inibidor de mTORC1, Torin1. Para realização do perfil polissomal, foi optado pelo uso de um protocolo otimizado, em que os polissomos são isolados através de um menor número de frações, o que reduz perdas durante o processo de extração do RNA (Liang et al. 2017). Isso foi particularmente importante para o nosso estudo, porque a extração de RNA nesses experimentos foi feita através de um kit normalmente utilizado para pequenos volumes de amostra, enquanto o volume das frações combinado com etanol e reagente Tri era bem maior. Além disso, o uso do protocolo otimizado permitiu que as frações fossem separadas igualmente em três grupos distintos, nos quais foram analisados os níveis dos mRNAs de interesse.

Para extrair o RNA das frações do perfil polissomal e realizar a RT-qPCR, estabelecemos uma metodologia própria, ao combinar as frações em três grupos. Inicialmente, a expressão dos 5'TOP mRNAs foi analisada levando-se em consideração o *pool* de mRNAs referente a uma determinada célula (LN-18, A172 e U118-MG) e condição (controle ou tratamento com Torin1). Embora esta análise tenha gerado resultados satisfatórios para o experimento feito com as três linhagens celulares de GBM, a comparação entre mRNAs derivados de frações contendo diferentes quantidades de sacarose (5%, 34% e 55%) pode representar uma limitação, relacionada ao fato de que o processo de extração e/ou a retrotranscrição não tenham sido quantitativos. Nesse caso, as análises por RT-qPCR não refletiriam os reais níveis de mRNAs nas frações. Como segunda opção para normalização dos resultados, decidimos utilizar um RNA exógeno. Assim, o mRNA controle de luciferase foi adicionado às frações do perfil polissomal imediatamente antes da extração de RNA, como descrito em outros trabalhos (Thoreen et al. 2012; Baird et al. 2014). A adição do RNA de luciferase permite controlar as perdas de material e outros artefatos durante o processo de extração (Magalhães et al. 2019), porque a mesma quantidade é adicionada às amostras e por ser amplificado com a mesma eficiência dos genes de interesse (Johnston et al. 2012). A adição de um mRNA exógeno é relatada em diversos estudos como uma ferramenta para normalização dos resultados de expressão gênica (Magalhães et al. 2019; Johnston et al. 2012). Inclusive,

essa abordagem pode ser utilizada para avaliar a estabilidade de genes de referência (Johnston et al. 2012).

A análise da expressão de dois 5'TOP mRNAs, *PABPC4* e *RPS11*, nas células LN-18^{CRISPR} foi feita com o mRNA controle de luciferase, que parece ser a metodologia mais adequada para nossos experimentos. A partir disso, foi observada diferença na expressão de *PABPC4* e *RPS11* nas células RSK1^{KO} quando comparadas às outras células. No grupo Poli, houve maior diferença entre células RSK1^{KO} controle e tratadas com Torin1 quando comparadas a essas mesmas condições nas demais células. Esses resultados confirmam que a ausência de RSK1 impede que a tradução dos 5'TOP mRNAs seja mantida quando mTORC1 está inativado (Figura 41).

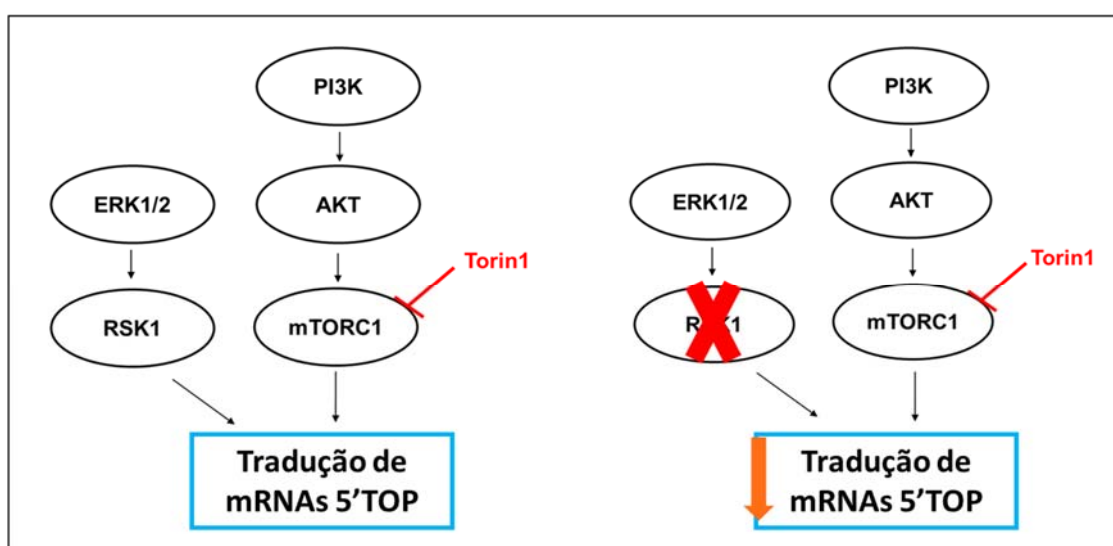


Figura 41 - Regulação da tradução dos mRNAs com sequência 5'TOP pela proteína RSK1.

Além disso, os resultados anteriores da translaticônica mostraram que não ocorreu redução na tradução de 5'TOP mRNAs nas células DKO (Figura 17), mesmo com a ausência de todas as isoformas de RSK, o que também foi observado na análise da expressão de *PABPC4* e *RPS11* nestas células. Seria esperado que o comportamento das células DKO fosse similar ao das células RSK1^{KO}, considerando a regulação da tradução dos 5'TOP mRNAs por essa isoforma, mas é possível que ocorra algum mecanismo de compensação nas células DKO. De fato, resultados diferentes entre as células RSK1^{KO} e DKO também foram observados ao se avaliar a fosforilação de eIF4B e de rpS6 nas células LN-229^{CRISPR}, como discutido anteriormente. Isso reforça a hipótese de que algum mecanismo compensatório, ainda desconhecido, ocorra na célula após a perda de todas as isoformas de RSK.

Os resultados obtidos com as linhagens celulares LN-18, A172 e U118-MG também indicaram um papel da isoforma RSK1 na regulação da tradução do 5'TOP mRNAs, através da análise do mRNA associado a polissomos. Entretanto, tanto neste experimento quanto no experimento com as células LN-18^{CRISPR}, não observamos nenhuma diferença nos níveis de mRNA total de *PABPC4* e de *RPS11* em células com diferentes níveis de RSK1, ressaltando as limitações de avaliar apenas o mRNA total como uma medida de expressão gênica.

A partir de resultados anteriores, que foram validados por este estudo, foi proposto um modelo para explicar a participação de RSK1 na tradução dos 5'TOP mRNAs. Essa isoforma atuaria promovendo a inibição de um inibidor da tradução dos 5'TOP mRNAs. Nas células DKO, esse inibidor seria perdido e, em consequência, a tradução desses mRNAs ocorreria de maneira independente de RSK1. A proteína LARP1 é uma possível candidata para atuar como um inibidor regulado por RSK, pois possui vários sítios suscetíveis à fosforilação e em vários deles é encontrada uma sequência consenso que poderia ser um substrato das RSKs.

Além disso, seu papel na regulação negativa da tradução de 5'TOP mRNAs já foi descrito (Fonseca et al. 2018).

A regulação da tradução de 5'TOP mRNAs por RSK1, validada neste estudo, pode representar um mecanismo de resistência aos inibidores de mTORC1, o que possui grande relevância clínica. Como a via PI3K/Akt/mTOR encontra-se frequentemente alterada em diversos tipos de tumor, o desenvolvimento de inibidores para diferentes componentes desta via é promissor. A proteína mTOR é o principal alvo dos inibidores desenvolvidos (Formisano et al. 2020). A rapamicina foi o primeiro inibidor de mTOR descrito, porém atua apenas sobre mTORC1. Sua aplicação clínica apresentou algumas limitações devido a propriedades do composto, como a reduzida solubilidade em água, o que afeta a biodisponibilidade da droga. Com o objetivo de contornar essas limitações, análogos de rapamicina (chamados *rapalogs*) foram desenvolvidos. Entre eles, o Temsirolimus foi o primeiro aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para tratamento do câncer (Kwitkowski et al. 2010; Zheng e Jiang 2015). No entanto, mecanismos de resistência limitaram o uso dos *rapalogs*, incluindo mutação em FKBP12 ou em mTOR; aumento da atividade de mTORC2 devido à inibição de mTORC1, com consequente ativação de Akt; aumento da sinalização de ERK; redução da expressão de 4E-BP1 ou aumento da expressão de eIF4E; modulação de reguladores da apoptose, como aumento de Bcl-2, entre outros. Em geral, eles são eficazes no tratamento de apenas alguns tipos de câncer, como o carcinoma de células renais e o linfoma de células do manto (Carew et al. 2011). Como existem diversos processos celulares relacionados à sobrevivência celular que dependem da ativação de PI3K/AKT/mTOR, mecanismos de resistência são rapidamente desenvolvidos

pelas células (Formisano et al. 2020). Além disso, a ativação de mTORC1/S6K resulta em *feedbacks* negativos que atenuam a ativação de componentes de vias de sinalização relacionadas a receptores tirosina quinase. Assim, com a inativação de mTORC1, esses componentes deixam de ser inibidos, o que acaba compensando os efeitos antiproliferativos dos inibidores de mTORC1 e gerando resistência. Por isso, a identificação de mecanismos de resistência possui grande relevância para a terapia.

Os inibidores do sítio ativo de mTOR ainda não são empregados na prática clínica, mas apresentaram maior eficácia do que os *rapalogs* em diferentes modelos e já foram incluídos em ensaios clínicos. Mecanismos de resistência também foram descritos pra essa classe de inibidores, como a supressão de mecanismos de *feedback* negativo que regulam a ativação de PI3K/Akt (Formisano et al. 2020). Foi demonstrado que a inibição concomitante de mTORC1 e mTORC2 induz a ativação de PI3K dependente do receptor do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) (Yoon 2017) e também a ativação da via MEK/ERK por mecanismos independentes de PI3K (Soares et al. 2013), ao contrário do observado anteriormente após o uso de rapamicina (Carracedo et al. 2008; Hong et al. 2012). Outros mecanismos de resistência relacionados ao uso dos inibidores do sítio ativo de mTOR são a ocorrência de mutações no domínio quinase de mTOR, que aumentam sua ativação (Rodrik-Outmezguine et al. 2016) e aumento da razão eIF4E/4E-BPs, o que leva à tradução de mRNAs sensíveis a eIF4E (Yanagiya et al. 2012). Entretanto, os mecanismos de *feedback* e compensação relacionados à resistência podem se desenvolver em contextos específicos e, consequentemente, os efeitos observados variam e não podem ser extrapolados de uma linhagem celular para outra (Rodrik-Outmezguine et al. 2011).

A redundância entre diferentes vias de sinalização também contribui para a resistência a drogas. As vias PI3K/Akt/mTORC1 e Ras/ERK/RSK possuem alvos em comum e, portanto, mecanismos de resistência podem ser minimizados pelo uso concomitante de inibidores de ambas as vias. Estudos pré-clínicos utilizando inibidores para as duas vias apresentaram bons resultados ao reduzir o crescimento das células tumorais (Talbert et al. 2017; Wu et al. 2017; Goulielmaki et al. 2019). A terapia combinada se mostrou mais eficiente do que o uso de apenas um inibidor também em um modelo animal de GBM (Mcneill et al. 2017). Entretanto, em grande parte dos ensaios clínicos muitos efeitos colaterais foram observados, limitando a aplicação terapêutica (Cao et al. 2019). Por exemplo, inibidores de MEK estão associados a numerosas reações adversas (Welsh e Corrie 2015), o que pode ser explicado pelo papel importante de seu substrato, ERK, na ativação de diversas proteínas relacionadas a importantes processos celulares. Dessa forma, em contextos onde se torna necessário inibir alvos

downstream a ERK (como RSK), é interessante o desenvolvimento de inibidores específicos para estes alvos, o que deve originar menos efeitos colaterais. Levando esse ponto em consideração e nossos resultados que sugerem um papel importante para RSK1 em GBMs, uma alternativa interessante é o desenvolvimento de inibidores específicos para esta isoforma. É preciso lembrar, entretanto, que mecanismos não esperados ou desconhecidos podem surgir, como foi observado após o tratamento das células DKO com Torin1, reforçando a importância dos mecanismos de resistência.

Nossos resultados apontam para um possível mecanismo de resistência aos inibidores de mTORC1 em GBMs, através da regulação da tradução de 5'TOP mRNAs pela isoforma RSK1, quando mTORC1 está inativado. Considerando que os inibidores de sítio ativo de mTOR vêm sendo testados com a intenção de serem aplicados na clínica e que RSK1 pode ter alta expressão ou não em GBMs, esse achado poderia ser útil na identificação de pacientes que se beneficiarão da terapia com inibidores de mTOR, otimizando seu uso e melhorando os resultados clínicos.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi possível estabelecer algumas funções da isoforma RSK1 em GBMs. Para experimentos que tiveram o objetivo de avaliar componentes de vias de sinalização, foram geradas células LN-229 nocaute para as isoformas RSK1 e RSK2, tornando disponível outro modelo para o estudo da função das RSKs em GBMs. Nesses experimentos, foi demonstrado que a fosforilação de eIF4B e de rpS6 possui diferentes mecanismos de regulação. A fosforilação de eIF4B no sítio Ser422 é mais dependente da via Ras/ERK/RSK, enquanto a fosforilação de rpS6 nos sítios Ser235/236 é mais dependente de PI3K/Akt/mTORC1, em células de GBM. Além disso, a isoforma RSK1 é mais importante do que RSK2 em manter a fosforilação de eIF4B. Também validamos em nossos experimentos achados prévios acerca da regulação da tradução de mRNAs 5'TOP por RSK1 quando mTORC1 está inibido. Assim, este estudo identificou mecanismos moleculares relevantes ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que busquem contornar a ocorrência de mecanismos de resistência.

7 REFERÊNCIAS

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

Alain T, Sonenberg N, Topisirovic I. mTOR inhibitor efficacy is determined by the eIF4E/4E-BP ratio. *Oncotarget.* 2012;3:1491-2.

Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, et al. *Essential cell biology.* 2nd ed. Nova York: Garland Science; 2004.

Alessi DR, Caudwell FB, Andjelkovic M, Hemmings BA, Cohen P. Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase. *FEBS Letter.* 1996;399:333-8.

Al-Khallaf H. Isocitrate dehydrogenases in physiology and cancer: biochemical and molecular insight. *Cell Biosci.* 2017;7:37.

Altelaar AFM, Munoz J, Heck AJR. Next-generation proteomics: towards an integrative view of proteome dynamics. *Nat Rev Genet.* 2013;14:35-48.

Alvarenga AW, Machado LE, Rodrigues BR, Lupinacci FC, Sanemastu P, Matta E, et al. Evaluation of Akt and RICTOR expression levels in astrocytomas of all grades. *J Histochem Cytochem.* 2017;65:93-103.

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

Arcella A, Limanaqi F, Ferese R, Biagioni F, Oliva, MA, Storto M, et al. Dissecting molecular features of gliomas: genetic loci and validated biomarkers. *Int J Mol Sci.* 2020;21:685.

Aronchik I, Appleton BA, Basham SE, Crawford K, Del Rosario M, Doyle LV, et al. Novel potent and selective inhibitors of p90 ribosomal S6 kinase reveal the heterogeneity of RSK function in MAPK-driven cancers. *Mol Cancer Res.* 2014;12:803-12.

Arribas-Layton M, Wu D, Lykke-Andersen J, Song H. Structural and functional control of the eukaryotic mRNA decapping machinery. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1829:580-9.

Ashour AA, Abdel-Aziz AA, Mansour AM, Alpay SN, Huo L, Ozpolat B. Targeting elongation factor-2 kinase (eEF-2K) induces apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Apoptosis.* 2014;19:241-58.

Aslam B, Basit M, Nisar MA, Khurshid M, Rasool MH. Proteomics: technologies and their applications. *J Chromatogr Sci.* 2017;55:182-96.

Awah CU, Chen L, Bansal M, Mahajan A, Winter J, Lad M, et al. Ribosomal protein S11 influences glioma response to TOP2 poisons. *Oncogene.* 2020;39:5068-81.

Bady P, Delorenzi M, Hegi ME. Sensitivity analysis of the MGMT-STP27 model and impact of genetic and epigenetic context to predict the MGMT methylation status in gliomas and other tumors. *J Mol Diagn.* 2016;18:350-61.

Baird TD, Palam LR, Fusakio ME, Willy JA, Davis CM, McClintick JN, et al. Selective mRNA translation during eIF2 phosphorylation induces expression of IBTK α . *Mol Biol Cell.* 2014;25:1686-97.

Balakumaran BS, Porrello A, Hsu DS, Glover W, Foye A, Leung JY, et al. MYC activity mitigates response to rapamycin in prostate cancer through eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1-mediated inhibition of autophagy. *Cancer Res.* 2009;69:7803-10.

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 USA.* 2005;102:667-72.

Bain J, Plater L, Elliott M, Shpiro N, Hastie CJ, McLauchlan H, et al. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J*. 2007;408:297-315.

Bell JB, Eckerdt F, Dhruv HD, Finlay D, Peng S, Kim S et al. Differential response of glioma stem cells to arsenic trioxide therapy is regulated by MNK1 and mRNA translation. *Mol Cancer Res*. 2018;16:32-46.

Berezowska S, Diermeier-Daucher S, Brockhoff G, Busch R, Duyster J, Grosu AL, et al. Effect of additional inhibition of human epidermal growth factor receptor 2 with the bispecific tyrosine kinase inhibitor AEE788 on the resistance to specific EGFR inhibition in glioma cells. *Int J Mol Med*. 2010;26:713-21.

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

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

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

Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*. 2008;455:1061-8.

Cao Z, Liao Q, Su M, Huang K, Jin J, Cao D. AKT and ERK dual inhibitors: the way forward? *Cancer Lett*. 2019;459:30-40.

Carew JS, Kelly KR, Nawrocki ST. Mechanisms of mTOR inhibitor resistance in cancer therapy. *Target Oncol*. 2011;6:17-27.

Carracedo A, Ma L, Teruya-Feldstein J, Rojo F, Salmena L, Alimonti A, 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.

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

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

Chardin P, Camonis JH, Gale NW, Van Aelst L, Schlessinger J, Wigler MH, et al. Human Sos1: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to GRB2. *Science*. 1993;260:1338-43.

Chassé H, Boulben S, Costache V, Cormier P, Morales J. Analysis of translation using polysome profiling. *Nucleic Acids Res*. 2017;45:e15.

Chauvin C, Koka V, Nouschi A, Mieulet V, Hoareau-Aveilla C, Dreazen A, et al. Ribosomal protein S6 kinase activity controls the ribosome biogenesis transcriptional program. *Oncogene*. 2014;33:474-83.

Cheng H Bin, Yue W, Xie C, Zhang RY, Hu SS, Wang Z. IDH1 mutation is associated with improved overall survival in patients with glioblastoma: a meta-analysis. *Tumor Biol*. 2013;34:3555-9.

Chong-Kopera H, Inoki K, Li Y, Zhu T, Garcia-Gonzalo FR, Rosa JL, et al. TSC1 stabilizes TSC2 by inhibiting the interaction between TSC2 and the HERC1 ubiquitin ligase. *J Biol Chem*. 2006;281:8313-6.

Cichowski K, Santiago S, Jardim M, Johnson BW, Jacks T. Dynamic regulation of the Ras pathway via proteolysis of the NF1 tumor suppressor. *Genes Dev*. 2003;17:449-54.

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

Cohen AL, Holmen SL, Colman H. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2013;13:345.

Costa BM, Caeiro C, Guimarães I, Martinho O, Jaraquemada T, Augusto I, et al. Prognostic value of MGMT promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide-based chemoradiation: a Portuguese multicentre study. *Oncol Rep.* 2010;23:1655-62.

D'Alessio A, Proietti G, Sica G, Scicchitano BM. Pathological and molecular features of glioblastoma and its peritumoral tissue. *Cancers (Basel).* 2019;11:469-77.

Damgaard CK, Lykke-Andersen J. Translational coregulation of 5'TOP mRNAs by TIA-1 and TIAR. *Genes Dev.* 2011;25:2057-68.

Dang L, Yen K, Attar EC. IDH mutations in cancer and progress toward development of targeted therapeutics. *Ann Oncol.* 2016;27:599-608.

Davies AH, Reipas K, Hu K, Berns R, Firmino N, Stratford AL, et al. Inhibition of RSK with the novel small-molecule inhibitor LJI308 overcomes chemoresistance by eliminating cancer stem cells. *Oncotarget.* 2015;6:20570-7.

Davis ME. Glioblastoma: overview of disease and treatment. *Clin J Oncol Nurs.* 2016;20(5 suppl):S2-8.

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.

Dever TE, Dinman JD, Green R. Translation elongation and recoding in eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018;10:a032649.

Dibble CC, Elis W, Menon S, Qin W, Klekota J, Asara JM, et al. TBC1D7 is a third subunit of the TSC1-TSC2 complex upstream of mTORC1. *Mol Cell.* 2012;47:535-46.

Doehn U, Hauge C, Frank SR, Jensen CJ, Duda K, Nielsen J V, 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.

Dorrello NV, Peschiaroli A, Guardavaccaro D, Colburn NH, Sherman NE, Pagano M. S6K1- and betaTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth. *Science*. 2006;314:467-71.

Eder K, Kalman B. Molecular heterogeneity of glioblastoma and its clinical relevance. *Pathol Oncol Res*. 2014;20:777-87.

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

Ellor SV, Pagano-Young TA, Avgeropoulos NG. Glioblastoma: background, standard treatment paradigms, and supportive care considerations. *J Law Med Ethics*. 2014;42:171-82.

Erinjeri NJ, Nicolson NG, Deyholos C, Korah R, Carling T. Whole-exome sequencing identifies two discrete druggable signaling pathways in follicular thyroid cancer. *J Am Coll Surg*. 2018;266:950-9.

Feldheim J, Kessler AF, Schmitt D, Salvador E, Monoranu CM, Feldheim JJ. Ribosomal protein S27/Metallopanstimulin-1 (RPS27) in glioma-a new disease biomarker? *Cancers (Basel)*. 2020;12:1085.

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, Graber TE, Svitkin Y, Tahmasebi S, 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

Formisano L, Napolitano F, Rosa R, D'Amato V, Servetto A, Marciano R, et al. Mechanisms of resistance to mTOR inhibitors. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2020;147:102886.

Fujita N, Sato S, Tsuruo T. Phosphorylation of p27Kip1 at threonine 198 by p90 ribosomal protein S6 kinases promotes its binding to 14-3-3 and cytoplasmic localization. *J Biol Chem*. 2003;278:49254-60.

Gagné ML, Boulay K, Topisirovic I, Huot MÉ, Mallette FA. Oncogenic activities of IDH1/2 mutations: from epigenetics to cellular signaling. *Trends Cell Biol*. 2017;27:738-52.

Galan JA, Geraghty KM, Lavoie G, Kanshin E, Tcherkezian J, Calabrese V, et al. Phosphoproteomic analysis identifies the tumor suppressor PDCD4 as a RSK substrate negatively regulated by 14-3-3. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111:E2918-27.

Gandin V, Sikström K, Alain T, Morita M, McLaughlan S, Larsson O, et al. Polysome fractionation and analysis of mammalian translatomes on a genome-wide scale. *J Vis Exp*. 2014; 87):51455.

Goitre L, Trapani E, Trabalzini L, Retta SF. The Ras superfamily of small GTPases: the unlocked secrets. *Methods Mol Biol*. 2014;1120:1-18.

Goss DJ, Kleiman FE. Poly(A) binding proteins: are they all created equal? *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2013;4:167-79.

Goulielmaki E, Bermudez-Brito M, Andreou M, Tzenaki N, Tzardi M, de Bree E, et al. Pharmacological inactivation of the PI3K p110 δ prevents breast tumour progression by targeting cancer cells and macrophages. *Cell Death Dis*. 2018;9:678.

Groenendijk FH, Taal W, Dubbink HJ, Haarloo CR, Kouwenhoven MC, van den Bent MJ, et al. MGMT promoter hypermethylation is a frequent, early, and consistent event in astrocytoma progression, and not correlated with TP53 mutation. *J Neurooncol*. 2011;101:405-17.

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

Guertin DA, Stevens DM, Saitoh M, Kinkel S, Crosby K, Sheen J-H, et al. mTOR complex 2 is required for the development of prostate cancer induced by Pten loss in mice. *Cancer Cell*. 2009;15:148-59.

Hajj GNM, da Silva FF, de Bellis B, Lupinacci FCS, Bellato HM, Cruz JR, et al. Aberrant expression of RSK1 characterizes high-grade gliomas with immune infiltration. *Mol Oncol*. 2020;14:159-79.

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.

Hartmann C, Meyer J, Balss J, Capper D, Mueller W, Christians A, et al. Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: A study of 1,010 diffuse gliomas. *Acta Neuropathol*. 2009;118:469-74.

Hassan B, Akcakanat A, Sangai T, Evans KW, Adkins F, Eterovic AK, et al. Catalytic mTOR inhibitors can overcome intrinsic and acquired resistance to allosteric mTOR inhibitors. *Oncotarget*. 2014;5:8544-57.

Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, De Tribolet N, Weller M, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352:997-1003.

Heitman J, Movva NR, Hall MN. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science*. 1991;253:905-9.

Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4:988-1004.

Hershey JWB, Sonenberg N, Mathews MB. Principles of translational control: an overview. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4:a011528.

Higa S, Yoshihama M, Tanaka T, Kenmochi N. Gene organization and sequence of the region containing the ribosomal protein genes RPL13A and RPS11 in the human genome and conserved features in the mouse genome. *Gene*. 1999;24:371-7.

Hong DS, Bowles DW, Falchook GS, Messersmith WA, George GC, O'Bryant CL, et al. A multicenter phase I trial of PX-866, an oral irreversible phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res*. 2012;18:4173-82.

Hopkins BD, Fine B, Steinbach N, Dendy M, Rapp Z, Shaw J, et al. A secreted PTEN phosphatase that enters cells to alter signaling and survival. *Science*. 2013;341:399-402.

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

Houles T, Roux PP. Defining the role of the RSK isoforms in cancer. *Semin Cancer Biol*. 2018;48:53-61.

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

Huang J, Yu J, Tu L, Huang N, Li H, Luo Y. Isocitrate dehydrogenase mutations in glioma: from basic discovery to therapeutics development. *Front Oncol*. 2019;9:506.

Ingolia NT. Ribosome footprint profiling of translation throughout the genome. *Cell*. 2016;165:22-33.

Inoki K, Li Y, Xu T, Guan K-L. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev*. 2003;17:1829-34.

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.

Ishii N, Maier D, Merlo A, Sawamura Y, Diserens AC, et al. Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines. *Brain Pathol.* 1999;9:469-79.

Jackson RJ, Hellen CUT, Pestova TV. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11:113-27.

Jebali A, Dumaz N. The role of RICTOR downstream of receptor tyrosine kinase in cancers. *Mol Cancer.* 2018;17:39.

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

Jiang Y, Uhrbom L. On the origin of glioma. *Ups J Med Sci.* 2012;117:113-21.

Johnston S, Gallaher Z, Czaja K. Exogenous reference gene normalization for real-time reverse transcription-polymerase chain reaction analysis under dynamic endogenous transcription. *Neural Regen Res.* 2012;7:1064-72.

Julien LA, Carriere A, Moreau J, Roux PP. mTORC1-activated S6K1 phosphorylates rictor on threonine 1135 and regulates mTORC2 signaling. *Mol Cell Biol.* 2010;30:908-21.

Kang S, Elf S, Lythgoe K, Hitosugi T, Taunton J, Zhou W, 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.

Kang SA, Pacold ME, Cervantes CL, Lim D, Lou HJ, Ottina K, et al. mTORC1 phosphorylation sites encode their sensitivity to starvation and rapamycin. *Science.* 2013;341:1236566.

Karakas D, Ozpolat B. Eukaryotic elongation factor-2 kinase (eEF2K) signaling in tumor and microenvironment as a novel molecular target. *J Mol Med (Berl).* 2020;98:775-87.

Karlsson E, Waltersson MA, Bostner J, Pérez-Tenorio G, Olsson B, Hallbeck AL, et al. High-resolution genomic analysis of the 11q13 amplicon in breast cancers identifies synergy with

8p12 amplification, involving the mTOR targets S6K2 and 4EBP1. *Genes Chromosomes Cancer*. 2011;50:775-87.

Katz M, Amit I, Yarden Y. Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1773:1161-76.

Kenney JW, Genheden M, Moon KM, Wang X, Foster LJ, Proud CG. Eukaryotic elongation factor 2 kinase regulates the synthesis of microtubule-related proteins in neurons. *J Neurochem*. 2016;136:276-84.

King HA, Gerber AP. Translatome profiling: Methods for genome-scale analysis of mRNA translation. *Brief Funct Genomics*. 2016;15:22-31.

Knobbe CB, Reifemberger J, Reifemberger G. Mutation analysis of the Ras pathway genes NRAS, HRAS, KRAS and BRAF in glioblastomas. *Acta Neuropathol*. 2004;108:467-70.

Komar AA, Hatzoglou M. Cellular IRES-mediated translation: the war of ITAFs in pathophysiological states. *Cell Cycle*. 2011;10; 229-40.

Kosti I, Jain N, Aran D, Butte AJ, Sirota M. Cross-tissue analysis of gene and protein expression in normal and cancer tissues. *Sci Rep*. 2016;6:24799.

Kwiatkowski DJ, Manning BD. Tuberous sclerosis: A GAP at the crossroads of multiple signaling pathways. *Hum Mol Genet*. 2005;14 Spec No.2:R251-8.

Kwitkowski VE, Prowell TM, Ibrahim A, Farrell AT, Justice R, Mitchell SS. FDA approval summary: temsirolimus as treatment for advanced renal cell carcinoma. *Oncologist*. 2010;15:428-35.

Łabno A, Tomecki R, Dziembowski A. Cytoplasmic RNA decay pathways - enzymes and mechanisms. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2016;1863:3125-47.

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

Lahr RM, Mack SM, Héroux A, Blagden SP, Bousquet-Antonelli C, Deragon J-M, 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.

Laplanche M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci*. 2009;122:3589-94.

Lara R, Mauri FA, Taylor H, Derua R, Shia A, Gray C, 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.

Larsson O, Li S, Issaenko OA, Avdulov S, Peterson M, Smith K, 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.

Law BK. Rapamycin: an anti-cancer immunosuppressant? *Crit Rev Oncol Hematol*. 2005;56:47-60.

Lee K, Nam KT, Cho SH, Gudapati P, Hwang Y, Park DS, et al. Vital roles of mTOR complex 2 in Notch-driven thymocyte differentiation and leukemia. *J Exp Med*. 2012;209:713-28.

Lee JH, Lee JE, Kahng JY, Kim SH, Park JS, Yoon SJ, et al. Human glioblastoma arises from subventricular zone cells with low-level driver mutations. *Nature*. 2018;560:243-47.

Leprivier G, Remke M, Rotblat B, Dubuc A, Mateo AR, Kool M, et al. The eEF2 kinase confers resistance to nutrient deprivation by blocking translation elongation. *Cell*. 2013;153:1064-79.

Leroux AE, Schulze JO, Biondi RM. AGC kinases, mechanisms of regulation and innovative drug development. *Semin Cancer Biol.* 2018;48:1-17.

Li J, Lu Y, Akbani R, Ju Z, Roebuck PL, Liu W, et al. TCGA: a resource for cancer functional proteomics data. *Nat Methods.* 2013;10:1046-7.

Li J, Kim SG, Blenis J. Rapamycin: one drug, many effects. *Cell Metab.* 2014;19:373-9.

Liang S, Bellato HM, Lorent J, Lupinacci FCS, Oertlin C, van Hoef V, et al. Polysome-profiling in small tissue samples. *Nucleic Acids Res.* 2017;46:1-13.

Listgarten J, Weinstein M, Kleinstiver BP, Sousa AA, Joung JK, Crawford J, et al. Prediction of off-target activities for the end-to-end design of CRISPR guide RNAs. *Nat Biomed Eng.* 2018;2:38-47.

Liu H, Feng X, Ennis KN, Behrmann CA, Sarma P, Jiang TT, et al. Pharmacologic targeting of S6K1 in PTEN-deficient neoplasia. *Cell Rep.* 2017;18:2088-95.

Liu Q, Chang JW, Wang J, Kang SA, Thoreen CC, Markhard A, et al. Discovery of 1-(4-(4-propionylpiperazin-1-yl)-3-(trifluoromethyl) phenyl)-9-(quinolin-3-yl) benzo[h][1,6]naphthyridin-2(1H)-one as a highly potent, selective mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor for the treatment of cancer. *J Med Chem.* 2010;53:7146-55.

Liu R, Proud CG. Eukaryotic elongation factor 2 kinase as a drug target in cancer, and in cardiovascular and neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sin.* 2016;37:285-94.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, 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, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016;131:803-20.

Lü X, de la Peña L, Barker C, Camphausen K, Tofilon PJ. Radiation-induced changes in gene expression involve recruitment of existing messenger RNAs to and away from polysomes. *Cancer Res.* 2006;66:1052-61.

Lupinacci FCS, Kuasne H, Roffé M, Vassalakis JA, da Silva FF, Santos TG, et al. Polysome profiling of a human glioblastoma reveals intratumoral heterogeneity. *Int J Mol Sci.* 2019;20:2177.

Ma XM, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10:307-18.

Machado LE, Alvarenga AW, da Silva FF, Roffé M, Begnami MD, Torres LFB, et al. Overexpression of mTOR and p(240-244)S6 in IDH1 wild-type human glioblastomas is predictive of low survival. *J Histochem Cytochem.* 2018;66:403-14.

Magalhães AP, França A, Pereira MO, Cerca N. RNA-based qPCR as a tool to quantify and to characterize dual-species biofilms. *Sci Rep.* 2019;9:13639.

Magnuson B, Ekim B, Fingar DC. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *Biochem J.* 2012;441:1-21.

Malka-Mahieu H, Newman M, Désaubry L, Robert C, Vagner S. Molecular pathways: the eIF4F translation initiation complex-new opportunities for cancer treatment. *Clin Cancer Res.* 2017;23:21-5.

Manning BD, Toker A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell.* 2017;169:381-405.

Mansouri A, Hachem LD, Mansouri S, Nassiri F, Laperriere NJ, Xia D, et al. MGMT promoter methylation status testing to guide therapy for glioblastoma: refining the approach based on emerging evidence and current challenges. *Neuro Oncol.* 2019;21:167-78.

McDonald KL, Tabone T, Nowak AK, Erber WN. Somatic mutations in glioblastoma are associated with methylguanine-DNA methyltransferase methylation. *Oncol Lett.* 2015;9:2063-7.

McGillicuddy LT, Fromm JA, Hollstein PE, Kubek S, Beroukhi R, De Raedt T, et al. Proteasomal and genetic inactivation of the NF1 tumor suppressor in gliomagenesis. *Cancer Cell.* 2009;16:44-54.

McNeill RS, Stroobant EE, Smithberger E, Canoutas DA, Butler MK, Shelton AK, et al. PIK3CA missense mutations promote glioblastoma pathogenesis, but do not enhance targeted PI3K inhibition. *PLoS One.* 2018;13:e0200014.

Mebratu Y, Tesfagzi Y. How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: is subcellular localization the answer? *Cell Cycle.* 2009;8:1168-75.

Mecca C, Giambanco I, Donato R, Arcuri C. Targeting mTOR in glioblastoma: rationale and preclinical/clinical evidence. *Dis Markers.* 2018:9230479.

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

Merrick WC. Cap-dependent and cap-independent translation in eukaryotic systems. *Gene.* 2004;332:1-11.

Meyuhas O, Kahan T. The race to decipher the top secrets of TOP mRNAs. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech.* 2015;1849:801-11.

Miloslavski R, Cohen E, Avraham A, Iluz Y, Hayouka Z, Kasir J, et al. Oxygen sufficiency controls TOP mRNA translation via the TSC-Rheb-mTOR pathway in a 4E-BP-independent manner. *J Mol Cell Biol.* 2014;6:255-66.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva. Estimativa | 2020 - Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2020.

Morrison DK. MAP kinase pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4:a011254.

Mueller S, Phillips J, Onar-Thomas A, Romero E, Zheng S, Wiencke JK, et al. PTEN promoter methylation and activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway in pediatric gliomas and influence on clinical outcome. *Neuro Oncol.* 2012;14:1146-52.

Murphy LO, Smith S, Chen RH, Fingar DC, Blenis J. Molecular, interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nat Cell Biol.* 2002;4:556-64.

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

Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, Phillips HS, Pujara K, Berman BP, 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, Murie C, Furic L, Topisirovic I, Larsson O. Generally applicable transcriptome-wide analysis of translation using anota2seq. *Nucleic Acids Res.* 2019;47:e70.

Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res.* 2004;64:6892-9.

Ohgaki H, Kleihues P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol.* 2005;109:93-108.

Ohgaki H. Epidemiology of brain tumors. *Methods Mol Biol.* 2009;472:323-42.

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

Olar A, Aldape KD. Using the molecular classification of glioblastoma to inform personalized treatment. *J Pathol.* 2014;232:165-77.

O'Reilly KE, Rojo F, She QB, Solit D, Mills GB, Smith D, et al. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res.* 2006;66:1500-8.

Ostrom QT, Gittleman H, Stetson L, Virk SM, Barnholtz-Sloan JS. Epidemiology of gliomas. *Cancer Treat Res.* 2015;163:1-14.

Panda AC, Martindale JL, Gorospe M. Polysome fractionation to analyze mRNA distribution profiles. *Bio Protoc.* 2017;7:e2126.

Parent R, Kolippakkam D, Booth G, Beretta L. Mammalian target of rapamycin activation impairs hepatocytic differentiation and targets genes moderating lipid homeostasis and hepatocellular growth. *Cancer Res.* 2007;67:4337-45.

Parker NR, Khong P, Parkinson JF, Howell VM, Wheeler HR. Molecular heterogeneity in glioblastoma: potential clinical implications. *Front Oncol.* 2015;5:55.

Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC-H, Leary RJ, Angenendt P, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science.* 2008;321:1807-12.

Patil CG, Yi A, Elramsisy A, Hu J, Mukherjee D, Irvin DK, Yu JS, et al. Prognosis of patients with multifocal glioblastoma: a case-control study. *J Neurosurg.* 2012;117:705-11.

Patursky-Polischuk I, Stolovich-Rain M, Hausner-Hanochi M, Kasir J, Cybulski N, Avruch J, et al. The TSC-mTOR pathway mediates translational activation of TOP mRNAs by insulin largely in a raptor- or rictor-independent manner. *Mol Cell Biol.* 2009;29:640-9.

Pende M, Um SH, Mieulet V, Sticker M, Goss VL, Mestan J, et al. S6K1(-/-)/S6K2(-/-) mice exhibit perinatal lethality and rapamycin-sensitive 5'-terminal oligopyrimidine mRNA translation and reveal a mitogen-activated protein kinase-dependent S6 kinase pathway. *Mol Cell Biol.* 2004;24(8):3112-24.

Perl K, Ushakov K, Pozniak Y, Yizhar-Barnea O, Bhonker Y, Shivatzki S, et al. Reduced changes in protein compared to mRNA levels across non-proliferating tissues. *BMC Genomics.* 2017;18:1-14.

Philippe L, van den Elzen AMG, Watson MJ, Thoreen CC. Global analysis of LARP1 translation targets reveals tunable and dynamic features of 5' TOP motifs. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2020;117:5319-28.

Piccirillo CA, Bjur E, Topisirovic I, Sonenberg N, Larsson O. Translational control of immune responses: from transcripts to translomes. *Nat Immunol*. 2014;15:503-11.

Plotnikov A, Zehorai E, Procaccia S, Seger R. The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813:1619-33.

Poria DK, Ray PS. Polysome analysis. *Bio-Protocol*. 2017;7:e2192.

Porta C, Paglino C, Mosca A. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer. *Front Oncol*. 2014;4:64.

Pringle ES, McCormick C, Cheng Z. Polysome profiling analysis of mRNA and associated proteins engaged in translation. *Curr Protoc Mol Biol*. 2019;125:1-13.

Qin X, Jiang B, Zhang Y. 4E-BP1, a multifactor regulated multifunctional protein. *Cell Cycle*. 2016;15:781-6.

Radke J, Koch A, Pritsch F, Schumann E, Misch M, Hempt C, et al. Predictive MGMT status in a homogeneous cohort of IDH wildtype glioblastoma patients. *Acta Neuropathol Commun*. 2019;7:7.

Ramanathan A, Robb GB, Chan S-H. mRNA capping: biological functions and applications. *Nucleic Acids Res*. 2016;44:7511-26.

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.

Richter JD, Collier J. Pausing on polyribosomes: make way for elongation in translational control. *Cell*. 2015; 163; 292-300.

Richter JD, Sonenberg N. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature*. 2005;433:477-80.

Rock K, McArdle O, Forde P, Dunne M, Fitzpatrick D, O'Neill B, et al. A clinical review of treatment outcomes in glioblastoma multiforme--the validation in a non-trial population of the results of a randomised Phase III clinical trial: has a more radical approach improved survival? *Br J Radiol*. 2012;85:729-33.

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

Rodrik-Outmezguine VS, Okaniwa M, Yao Z, Novotny CJ, McWhirter C, Banaji A, et al. Overcoming mTOR resistance mutations with a new-generation mTOR inhibitor. *Nature*. 2016;534:272-6.

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.

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

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

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

Roux PP, Topisirovic I. Regulation of mRNA translation by signaling pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(11):a012252.

Roux PP, Topisirovic I. Signaling pathways involved in the regulation of mRNA translation. *Mol Cell Biol.* 2018;38(12):e00070-18.

Roy S, Lahiri D, Maji T, Biswas J. Recurrent glioblastoma: where we stand. *South Asian J Cancer.* 2015;4:163.

Ruggero D. Translational control in cancer etiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(2):a012336.

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

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

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

Schuster SL, Hsieh AC. The untranslated Regions of mRNAs in cancer. *Trends Cancer.* 2019;5:245-62.

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

Sen ND, Zhou F, Harris MS, Ingolia NT, Hinnebusch AG. eIF4B stimulates translation of long mRNAs with structured 5' UTRs and low closed-loop potential but weak dependence on eIF4G. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113:10464-72.

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

Shahbazian D, Parsyan A, Petroulakis E, Hershey J, Sonenberg N. eIF4B controls survival and proliferation and is regulated by proto-oncogenic signaling pathways. *Cell Cycle*. 2010;9:4106-9.

Shirakawa Y, Hide T, Yamaoka M, Ito Y, Ito N, Ohta K, et al. Ribosomal protein S6 promotes stem-like characters in glioma cells. *Cancer Sci*. 2020;111:2041-51.

Shirokikh NE, Preiss T. Translation initiation by cap-dependent ribosome recruitment: recent insights and open questions. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2018;9:1-45.

Siddiqui N, Sonenberg N. Signalling to eIF4E in cancer. *Biochem Soc Trans*. 2015;43:763-72.

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

Simanshu DK, Nissley D V, McCormick F. RAS proteins and their regulators in human disease. *Cell*. 2017;170:17-33.

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

Soares HP, Ni Y, Kisfalvi K, Sinnett-Smith J, Rozengurt E. Different patterns of Akt and ERK feedback activation in response to rapamycin, active-site mTOR inhibitors and metformin in pancreatic cancer cells. *PLoS One*. 2013;8:e57289.

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

Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Kempf RC, Long J, Laidler P, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging*. 2011;3:192-222.

Stolovich M, Tang H, Hornstein E, Levy G, Cohen R, Bae SS, et al. Transduction of growth or mitogenic signals into translational activation of TOP mRNAs is fully reliant on the phosphatidylinositol 3-kinase-mediated pathway but requires neither S6K1 nor rpS6 phosphorylation. *Mol Cell Biol*. 2002;22:8101-13.

Sulzmaier FJ, Young-Robbins S, Jiang P, Geerts D, Precht AM, Matter MLML, et al. RSK2 activity mediates glioblastoma invasiveness and is a potential target for new therapeutics. *Oncotarget*. 2016;7:9869-84.

Sun SY. mTOR kinase inhibitors as potential cancer therapeutic drugs. *Cancer Lett*. 2013;340:1-8.

Takashima N, Ishiguro H, Kuwabara Y, Kimura M, Haruki N, Ando T, et al. Expression and prognostic roles of PABPC1 in esophageal cancer: correlation with tumor progression and postoperative survival. *Oncol Rep*. 2006;15:667-71.

Talbert EE, Yang J, Mace TA, Farren MR, Farris AB, Young GS et al. Dual inhibition of MEK and PI3K/Akt rescues cancer cachexia through both tumor-extrinsic and-intrinsic activities. *Mol Cancer Ther*. 2017;16:344-56.

Tcherkezian J, Cargnello M, Romeo Y, Huttlin EL, Lavoie G, Gygi SP, et al. Proteomic analysis of cap-dependent translation identifies LARP1 as a key regulator of 5'TOP mRNA translation. *Genes Dev*. 2014;28:357-71.

Tebaldi T, Re A, Viero G, Pegoretti I, Passerini A, Blanzieri E, et al. Widespread uncoupling between transcriptome and translome variations after a stimulus in mammalian cells. *BMC Genomics*. 2012;13:220.

Tee AR, Fingar DC, Manning BD, Kwiatkowski DJ, Cantley LC, Blenis J. Tuberous sclerosis complex-1 and -2 gene products function together to inhibit mammalian target of rapamycin (mTOR)-mediated downstream signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:13571-6.

Tee AR, Anjum R, Blenis J. Inactivation of the tuberous sclerosis complex-1 and -2 gene products occurs by phosphoinositide 3-kinase/Akt-dependent and -independent phosphorylation of tuberin. *J Biol Chem*. 2003;278:37288-96.

Tekedereli I, Alpay SN, Tavares CD, Cobanoglu ZE, Kaoud TS, Sahin I, et al. Targeted silencing of elongation factor 2 kinase suppresses growth and sensitizes tumors to doxorubicin in an orthotopic model of breast cancer. *PLoS One*. 2012;7:e41171.

Terada N, Patel HR, Takase K, Kohno K, Nairn AC, Gelfand EW. Rapamycin selectively inhibits translation of mRNAs encoding elongation factors and ribosomal proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:11477-81.

Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, Ostrom QT, Lightner DD, Barnholtz-Sloan JS, et al. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014;10:1985-96.

Thoreen CC, Kang SA, Chang JW, Liu Q, Zhang J, Gao Y, 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, Sabatini DM. Rapamycin inhibits mTORC1, but not completely. *Autophagy*. 2009;5:725-6.

Thoreen CC, Chantranupong L, Keys HR, Wang T, Gray NS, Sabatini DM. A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature*. 2012; 485:09-13.

Tian Q, Stepaniants SB, Mao M, Weng L, Feetham MC, Doyle MJ, et al. Integrated genomic and proteomic analyses of gene expression in mammalian cells. *Mol Cell Proteomics*. 2004;3:960-9.

Turcan S, Rohle D, Goenka A, Walsh LA, Fang F, Yilmaz E, et al. IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature*. 2012;483:479-83.

van Gorp AG, van der Vos KE, Brenkman AB, Bremer A, van den Broek N, Zwartkruis F, 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, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, 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.

Vigneswaran K, Neill S, Hadjipanayis CG. Beyond the World Health Organization grading of infiltrating gliomas: advances in the molecular genetics of glioma classification. *Ann Transl Med*. 2015;3:95.

Voorhees RM, Ramakrishnan V. Structural basis of the translational elongation cycle. *Annu Rev Biochem*. 2013;82:203-36.

Wang J, Hu G, Quan X. Analysis of the factors affecting the prognosis of glioma patients. *Open Med (Wars)*. 2019;14:331-5.

Wang Q, Wang Z, Bao Z, Zhang C, Wang Z, Jiang T. PABPC1 relevant bioinformatic profiling and prognostic value in gliomas. *Future Oncol*. 2020;16:4279-88.

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.

Wang X, Regufe da Mota S, Liu R, Moore CE, Xie J, Lanucara F, et al. Eukaryotic elongation factor 2 kinase activity is controlled by multiple inputs from oncogenic signaling. *Mol Cell Biol*. 2014;34:4088-103.

Welsh SJ, Corrie PG. Management of BRAF and MEK inhibitor toxicities in patients with metastatic melanoma. *Ther Adv Med Oncol*. 2015;7:122-36.

Wick W, Weller M, Van Den Bent M, Sanson M, Weiler M, Von Deimling A, et al. MGMT testing: the challenges for biomarker-based glioma treatment. *Nat Rev Neurol*. 2014;10:372-85.

Wilson TA, Karajannis MA, Harter DH. Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. *Surg Neurol Int*. 2014;5:64.

Wissink EM, Vihervaara A, Tippens ND, Lis JT. Nascent RNA analyses: tracking transcription and its regulation. *Nat Rev Genet*. 2019;20:705-23.

Wu X, Kriz AJ, Sharp PA. Target specificity of the CRISPR-Cas9 system. *Quant Biol*. 2014;2:59-70.

Wu YL, Maachani UB, Schweitzer M, Singh R, Wang M, Chang R, et al. Dual inhibition of PI3K/AKT and MEK/ERK pathways induces synergistic antitumor effects in diffuse intrinsic pontine glioma cells. *Transl Oncol*. 2017;10:221-8.

Xiao-Jie L, Hui-Ying X, Zun-Ping K, Jin-Lian C, Li-Juan J. CRISPR-Cas9: a new and promising player in gene therapy. *J Med Genet*. 2015;52:289-96.

Xie J, Wang X, Proud CG. mTOR inhibitors in cancer therapy. *F1000Res*. 2016;5:F1000 Faculty Rev-2078.

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

Yanagiya A, Suyama E, Adachi H, Svitkin YV, Aza-Blanc P, Imataka H et al. Translational homeostasis via the mRNA cap-binding protein, eIF4E. *Mol Cell*. 2012;46:847-58.

Yang HS, Jansen AP, Komar AA, Zheng X, Merrick WC, Costes S, et al. The transformation suppressor Pdc4 is a novel eukaryotic translation initiation factor 4A binding protein that inhibits translation. *Mol Cell Biol*. 2003;23:26-37.

Yang J, Liao D, Wang Z, Liu F, Wu G. Mammalian target of rapamycin signaling pathway contributes to glioma progression and patients' prognosis. *J Surg Res*. 2011;168:97-102.

Yang P, Zhang W, Wang Y, Peng X, Chen B, Qiu X, et al. IDH mutation and MGMT promoter methylation in glioblastoma: results of a prospective registry. *Oncotarget*. 2015;6:40896-906.

Yang J, Kemps-Mols B, Spruyt-Gerritse M, Anholts J, Claas F, Eikmans M. The source of SYBR green master mix determines outcome of nucleic acid amplification reactions. *BMC Res Notes*. 2016;9:292.

Yong WH, Shabihkhani M, Telesca D, Yang S, Tso JL, Menjivar JC, et al. Ribosomal proteins RPS11 and RPS20, two stress-response markers of glioblastoma stem cells, are novel predictors of poor prognosis in glioblastoma patients. *PLoS One*. 2015;10:e0141334.

Yoon MS. mTOR as a key regulator in maintaining skeletal muscle mass. *Front Physiol*. 2017;17:788.

Yu G, Lee Y-C, Cheng C-J, Wu C-F, Song JH, Gallick GE, et al. RSK promotes prostate cancer progression in bone through ING3, CKAP2, and PTK6-mediated cell survival. *Mol Cancer Res*. 2015;13:348-57.

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 J, Stevens MF, Bradshaw TD. Temozolomide: mechanism of action, repair and resistance. *Curr Mol Pharmacol*. 2012;5:102-14.

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.

Zhang Y, Cheng Y, Zhang L, Ren X, Huber-Keener KJ, Lee S et al. Inhibition of eEF-2 kinase sensitizes human glioma cells to TRAIL and down-regulates Bcl-xL expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;414:129-34.

Zhao H, Martin TA, Davies EL, Ruge F, Yu H, Zhang Y, et al. The clinical implications of rsk1-3 in human breast cancer. *Anticancer Res*. 2016; 36:1267-74.

Zhao H, Chen G, Liang H. Dual PI3K/mTOR Inhibitor, XL765, suppresses glioblastoma growth by inducing ER stress-dependent apoptosis. *OncoTargets Ther.* 2019;12:5415-24.

Zhao J, Qin B, Nikolay R, Spahn CMT, Zhang G. Translatomics: the global view of translation. *Int J Mol Sci.* 2019; 20:212.

Zheng Y, Jiang Y. mTOR Inhibitors at a glance. *Mol Cell Pharmacol.* 2015;7:15-20.

Zhu HL, Xie SM, Fang M, Zhang JJ, Weng ZP, Zhong XY. 4E-BP1 regulates the sensitivity of human glioma cells to chemotherapy through PI3K/Akt/mTOR-independent pathway. *Neuropathology.* 2014;34:227-35.

Zhu H, Yang X, Liu J, Zhou L, Zhang C, Xu L, et al. Eukaryotic elongation factor 2 kinase confers tolerance to stress conditions in cancer cells. *Cell Stress Chaperones.* 2015a;20:217-20.

Zhu J, Ding H, Wang X, Lu Q. PABPC1 exerts carcinogenesis in gastric carcinoma by targeting miR-34c. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015b;8:3794-802.