

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo das proteínas hnRNP K, SET e MARK3 como potenciais marcadores de prognóstico em câncer epidermóide de cabeça e pescoço (HNSCC)

Flávia Amoroso Matos e Silva

Ribeirão Preto

2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo das proteínas hnRNP K, SET e MARK3 como potenciais marcadores de prognóstico em câncer epidermóide de cabeça e pescoço (HNSCC)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia.

Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientada: Flávia Amoroso Matos e Silva

Orientadora: Profa. Dra. Andréia Machado Leopoldino

Ribeirão Preto

2009

RESUMO

SILVA, F. A. M. **Estudo das proteínas hnRNP K, SET e MARK3 como potenciais marcadores de prognóstico em câncer epidermóide de cabeça e pescoço (HNSCC)**. 2009. 82f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

As neoplasias de cabeça e pescoço constituem um importante problema de saúde pública devido à alta incidência e alguns tipos estão associados a fatores comportamentais como consumo de álcool e tabaco. Apesar desses dados, a doença, especialmente em sua fase inicial, pode ser curada e alguns tipos podem ser prevenidos. Portanto, existe a necessidade de identificar e validar novos biomarcadores em câncer de cabeça e pescoço com aplicação em prognóstico e seleção de terapias mais adequadas. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi validar o perfil de três proteínas, SET, hnRNP K e MARK3 em tumores de cabeça e pescoço, e verificar a potencial aplicação como marcadores de diagnóstico e prognóstico em HNSCC, bem como propor um papel para estas proteínas na tumorigênese. Foram analisadas 22 amostras de tumores de cabeça e pescoço por *western blotting* (WB) e 96 amostras (91 tumores, 4 biópsias e 1 controle) dispostas em duplicata em lâmina de *tissue microarray*, obtidas no Brasil e cedidas pelo Grupo GENCAPO, por imunohistoquímica (IHC). Os dados obtidos foram correlacionados com todos os parâmetros clínicos e patológicos e com prognóstico do paciente com HNSCC por um período de 48 meses. Os resultados obtidos por WB e IHC mostraram acúmulo e fragmentação da SET e acúmulo nuclear e citoplasmático da hnRNP K nos tumores comparado a respectiva margem cirúrgica e tecido normal. A hnRNPK mostrou valor prognóstico sendo associada a sobrevida global do paciente. A proteína c-Myc e a sua forma fosforilada foram analisadas nas amostras de tumores e suas respectivas margens cirúrgicas devido a sua relação com SET, PP2A e hnRNP K. Os resultados mostraram acúmulo da c-Myc fosforilada e total nas amostras tumorais, o que coincidiu com aumento de SET e hnRNP K. Com relação à proteína MARK3, observou-se sua redução no tumor e menor sobrevida livre de doença. Foi realizado ensaio de RNA de interferência (RNAi) contra hnRNP K e SET em linhagem de carcinoma oral (HN13). A redução da proteína SET por RNAi levou a redução significativa da hnRNP K, enquanto a hnRNP K gerou menor efeito na proteína SET, sugerindo um efeito regulatório na expressão ou manutenção da hnRNP K pela SET na célula tumoral. A interferência contra a hnRNP K também reduziu a proliferação celular tumoral. Em conclusão, o aumento da proteína SET está associado à desmoplasia em HNSCC e pode ser um potencial marcador específico para essa condição. hnRNP K e MARK3 podem servir como potenciais marcadores em HNSCC e ajudar a identificar um subgrupo de pacientes com pobre prognóstico. A hnRNPK exerce efeito positivo na proliferação da célula tumoral. SET e hnRNP K podem atuar como fatores oncogênicos favorecendo o aumento de c-Myc.

Palavras chave: carcinoma oral, I2PP2A, proteína K, CTAK1, c-Myc, prognóstico.

ABSTRACT

SILVA, F. A. M. **Study of protein hnRNP K, SET and MARK3 as potential markers of prognosis in squamous cell cancer of head and neck (HNSCC).** 2009. 82f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

The head and neck cancers constitute a major public health problem due to the high incidence and some types are associated with behavioral factors such as consumption of alcohol and tobacco. Despite these data, the disease, especially in its early stage can be cured and some types can be prevented. Therefore, there is a need to identify and validate new biomarkers in head and neck cancer, with applications in prognosis and selection of therapies most appropriate. Accordingly, the objectives of this study were validation of the profile of three proteins, SET, hnRNP K and MARK3 in tumors of head and neck, and verify the potential application as markers for diagnosis and prognosis in HNSCC, and suggest a role for these proteins in tumorigenesis. We analyzed 22 samples of head and neck tumors by western blotting (WB) and 96 samples (91 tumors, 4 biopsies and 1 control) arranged in duplicate in the tissue microarray slide, obtained in Brazil and assigned by the GENCAPO Group, by immunohistochemistry (IHC). The data were correlated with all clinical and pathological parameters and prognosis of patients with HNSCC for a period of 48 months. The results obtained by WB and IHC showed the SET accumulation and fragmentation and hnRNP K nuclear and cytoplasmic accumulation in tumor compared to the surgical margin and normal tissue. The hnRNPK prognostic value has been associated with overall survival of patients. The c-Myc protein and its phosphorylated form were analyzed in tumor and surgical margins samples due to its relationship with SET, PP2A and hnRNP K. The results showed accumulated total and phosphorylated c-Myc in tumor samples, which was coincided with increase in SET and hnRNP K. Regarding the protein MARK3 was observed its reduction in tumor and lower disease-free survival. RNA interference (RNAi) against hnRNP K and SET were performed in oral squamous cell carcinoma line (HN13). SET protein reduction by RNAi led to significant reduction of hnRNP K, and hnRNP K showed a minor effect on SET protein, suggesting a regulatory effect on expression or maintenance of hnRNP K by SET in tumor cells. Interference against hnRNP K also reduced tumor cell proliferation. In conclusion, increased SET protein is associated with desmoplasia in HNSCC and may be a potential specific marker for this condition. hnRNP K and MARK3 can serve as potential markers in HNSCC and help identify a subgroup of patients with poor prognosis. The hnRNPK must act a positive effect on cell proliferation of the tumor. SET and hnRNP K may act as oncogenic factors contributing for c-Myc activity.

Keywords: HNSCC, I2PP2A,K protein, CTAK1, c-Myc, prognosis.

1. Introdução

1.1 – Câncer epidermóide de cabeça e pescoço (HNSCC)

No Brasil, o câncer é a segunda doença com maior taxa de mortalidade, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares. As estimativas para o ano de 2008 foram de 466.760 casos novos, sendo 231.860 em homens e 234.870 em mulheres [Ministério da Saúde, 2008]. Apesar desses dados, a doença, especialmente em sua fase inicial, pode ser curada e alguns tipos podem ser prevenidos. O câncer de cabeça e pescoço é considerado um dos principais tumores no mundo e no Brasil, em função de sua mortalidade, prevalência, incidência e sobrevida.

Segundo estatísticas, cerca de 5% a 10% das neoplasias estão localizadas na cabeça e no pescoço, atingindo nariz, boca, faringe, laringe, pele, glândulas salivares e tireóides. As mais frequentes são as de pele, causadas pela exposição excessiva à radiação solar, e as de boca e laringe, provocadas principalmente pelo consumo do tabaco e do álcool. Em relação a essas últimas, a incidência maior é observada entre os homens, que estão mais expostos a esses agentes. A população feminina, embora, nos últimos anos, tenha aderido ao tabagismo e ao uso de bebidas, é menos atingida [Ministério da Saúde, 2008].

No Brasil, segundo as estimativas do Ministério da Saúde/INCA, o número de novos casos de câncer de cavidade oral estimados para o ano de 2008 e 2009 foi de 14.160, sendo 10.380 em homens e 3.780 em mulheres, sendo a oitava localização mais acometida dentre todos os tipos de câncer. Estes dados evidenciam a alta incidência de câncer na população e fortalece a necessidade de pesquisas direcionadas para o melhor entendimento da tumorigênese, bem como do estabelecimento de diagnósticos para escolha de tratamentos, prognóstico, e acompanhamento dos pacientes.

1.2 – Etiologia e Prognóstico em HNSCC

Devido à função e a localização, a boca está continuamente em contato com diversos agentes químicos, físicos e biológicos, os quais atuando isolada ou conjuntamente, aumentam o risco de câncer. Os principais fatores etiológicos do câncer de cabeça e pescoço são, sem dúvida, o fumo e o álcool, sendo a exposição tópica (por exemplo, efeito direto na membrana celular, permeabilidade celular alterada, variação em enzimas que metabolizam o álcool) e/ou os efeitos sistêmicos (por exemplo, deficiência nutricional, deficiência imunológica, distúrbio da função hepática), e os carcinógenos presentes no tabaco (por exemplo, compostos de nitrogênio) são fatores responsáveis pelo surgimento do câncer (OGDEN e WIGHT, 1998; HAORAH, ZHOU *et al.*, 2001). A avaliação isolada da participação do tabaco e do álcool na tumorigênese de cabeça e pescoço é difícil de ser feita, considerando que o fumante tende a consumir álcool e vice-versa (OGDEN e WIGHT, 1998). Entretanto, não há dúvidas de que, dos dois, o tabaco é o mais importante.

Em relação aos fatores prognósticos as margens cirúrgicas, localização e o hábito de fumar são indicadores prognósticos independentes. Segundo Lam *et al.* (2006) a localização anatômica da lesão deve ser considerada como uma indicadora de prognóstico, já que os tumores apresentam comportamentos diferentes dependendo da localização anatômica. A língua e assoalho bucal conduzem a um pior prognóstico, em função da maioria dos casos que acomete tais localizações se apresentarem com grandes dimensões (LAM, LOGAN *et al.*, 2006). Para estes autores, o estadiamento clínico TNM (tumor/linfonodo/metástase) é um sistema internacional importante para o registro de câncer, avaliação prognóstica, formulação de plano de tratamento e comparação dos resultados do tratamento,

sendo considerado como uns dos melhores indicadores de prognóstico do carcinoma epidermóide oral.

Entretanto, para Haddadin et al. (2000) a classificação clínica TNM define o tumor primário em apenas duas dimensões, sendo sugerida que uma terceira dimensão, espessura tumoral ou a profundidade de invasão seja considerada como fator de risco para metástases cervicais (HADDADIN, SOUTAR *et al.*, 2000). Como em outros tipos de neoplasias, o diagnóstico precoce representa um dos fatores prognósticos de maior importância, sendo o estágio avançado da doença no momento do diagnóstico um dos fatores mais determinantes de um prognóstico ruim. Portanto, a detecção precoce, junto ao tratamento adequado, são fatores essenciais na prevenção de mortes prematuras pela doença, além de reduzir o sofrimento do paciente causado pelo câncer de cavidade oral (OLIVER, HELFRICK *et al.*, 1996).

1.3 – Marcadores Moleculares em HNSCC

Os avanços na compreensão da biologia das neoplasias de cabeça e pescoço têm aberto novas direções na ciência. As pesquisas estão sendo direcionadas para o desenvolvimento de terapias com alvos moleculares específicos ou marcadores moleculares que são úteis na predição dos tratamentos ou na seleção de pacientes para terapias moleculares específicas (ANG, BERKEY *et al.*, 2002). As características dos tumores envolvem parâmetros clínicos e histopatológicos, comumente utilizados para identificar grupos de pacientes de alto risco que possuem curso clínico mais agressivo da doença. A caracterização de carcinomas de cavidade oral a partir de marcadores moleculares específicos ajuda a entender as variações individuais na progressão da doença, e permite obter informações mais

concretas sobre o prognóstico da doença e orientação nas condutas terapêuticas (SCHLIEPHAKE, 2003).

Cada etapa da progressão da doença é seguida por alterações cromossômicas resultantes tanto da perda como do ganho de material genético e, conseqüentemente perda ou ganho de função celular. Os resultados fenotípicos dessas alterações estão descritos em diferentes níveis do desenvolvimento do câncer: crescimento e supressão do tumor, angiogênese e invasão, potencial metastático e resposta imune. A maioria das alterações genéticas que ocorrem durante este processo ainda não é conhecida ou não está totalmente compreendida (AWADA e LALAMI, 2005).

Vários marcadores moleculares em HNSCC tais como EGFR, ciclina D1, proteína p53, VEGF, e metaloproteínases, têm auxiliado no prognóstico destes tumores. Genes supressores de tumor têm sido intensamente investigados em câncer de cabeça e pescoço e diversas alterações foram descritas (GLEICH e SALAMONE, 2002). Um exemplo é o gene supressor tumoral *P53*, que codifica uma fosfoproteína nuclear de 53 kDa, envolvida em muitas funções celulares, incluindo manutenção da estabilidade genômica, progressão do ciclo celular, diferenciação celular, reparo a danos no DNA, resposta a estresse e apoptose. A proteína eleva-se na célula em resposta a danos no DNA, induzindo a parada do ciclo celular na transição G1/S. Se o dano não for reparado, a proteína p53 induz apoptose. Alterações no gene *P53* foram descritas como sendo um evento inicial na tumorigênese (PARTRIDGE, COSTEA *et al.*, 2007). No câncer de cabeça e pescoço, foram relatadas mutações no *P53* em 33 a 59% dos casos, perdas alélicas em 38% e expressão aumentada da proteína em 37 a 76% (GLEICH e SALAMONE, 2002). A expressão elevada da proteína p53 nos tumores primários é considerada

um sinal preditivo de sobrevida reduzida em função de sua associação com a recorrência de tumores primários e secundários (CHIN, BOYLE *et al.*, 2004).

Os oncogenes codificam proteínas que estimulam a célula a progredir da fase G1 para S ou inibem a apoptose atuando positivamente na carcinogênese e na progressão da doença. Estes incluem receptores de fatores de crescimento, proteínas reguladoras de vias de transdução de sinal, fatores de transcrição, quinases dependentes de ciclinas, ciclinas e fatores de inibição da apoptose. Yarden *et al.* (2001) relataram que o gene *EGFR* (*Epidermal Growth Factor Receptor*) possui expressão elevada em câncer de cabeça e pescoço e relaciona-se com pior prognóstico na doença (YARDEN, 2001).

1.4 – Principais vias de sinalização celular envolvidas em HNSCC

A desregulação de cascatas de sinalização envolvendo vias como *EGFR*, *Ras*, *NFκB*, *Stat*, *Wnt/β-catenin*, *TGF-β*, e *PI3K/Akt/mTOR* contribuem fortemente para o desenvolvimento de HNSCC (Figura 1) (MOLINOLO, AMORNPHIMOLTHAM *et al.*, 2009). Uma das principais vias de sinalização intracelular, responsáveis por promover a sobrevivência celular e proliferação, é iniciada pela enzima PI3K (fosfatidil-inositol-3-quinase), que é ativada por receptores tirosina-quinase ou por receptores acoplados à proteína G. PI3K fosforila o fosfolípido de membrana PIP2 (fosfatidilinositol 4,5-bifosfato) para formar PIP3 (fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato), este por sua vez leva a ativação da proteína Akt que atua na fosforilação de várias proteínas alvo (DUBSKA, ANDERA *et al.*, 2005).

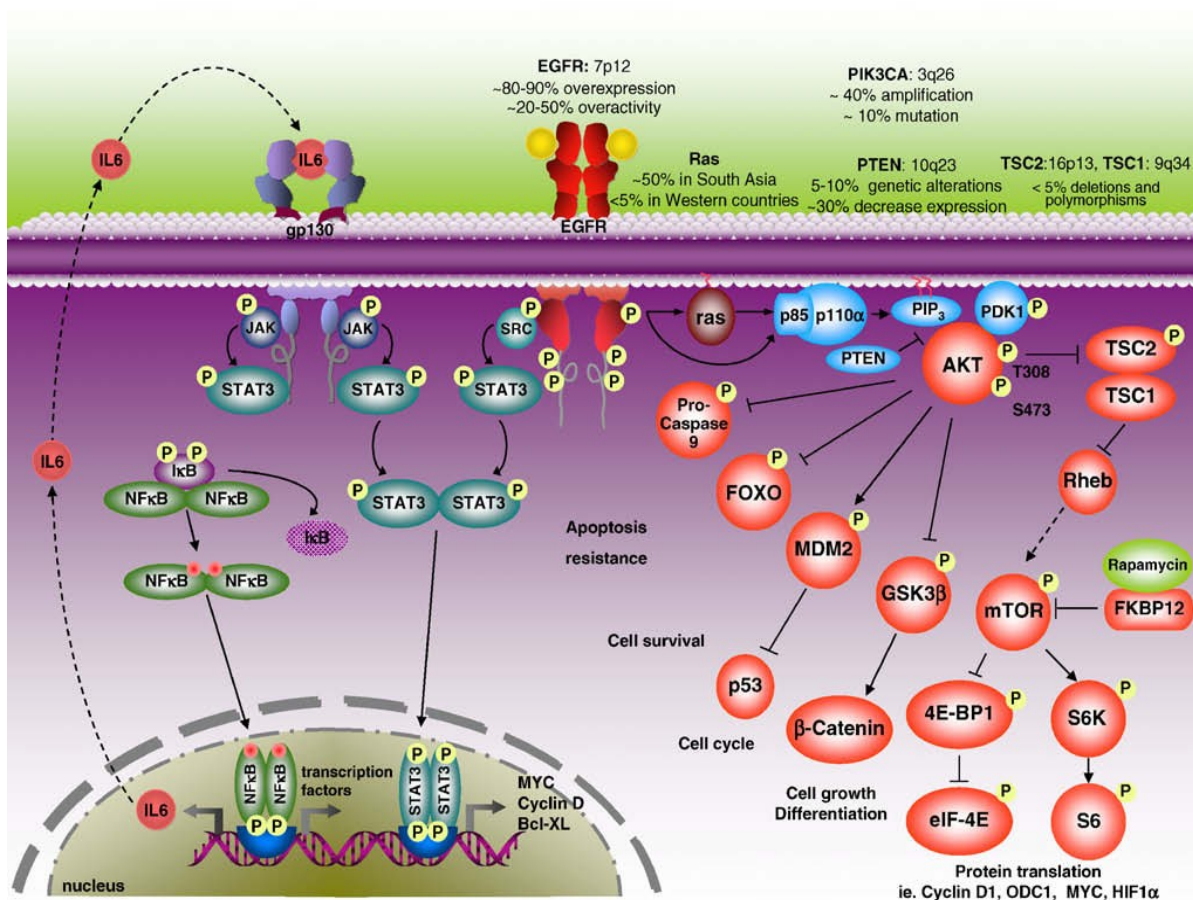


Figura 1: Vias de sinalização celular potencialmente alteradas em HNSCC (MOLINOLO, AMORNPHEMOLTHAM *et al.*, 2009)

A ativação da Akt pode contribuir para invasão tumoral e metástase por estimular metaloproteinases (THANT, NAWA *et al.*, 2000). Em diversas atividades neoplásicas sugere-se que a ativação da Akt isoladamente pode ser suficiente para induzir o desenvolvimento neoplásico por mediar fatores de crescimento e estimular fatores anti-apoptóticos (TESTA e BELLACOSA, 2001).

Visto que a detecção de alterações moleculares pode auxiliar no prognóstico e no tratamento do câncer, a busca por biomarcadores com aplicações clínicas cresceu consideravelmente nos últimos anos. Além disto, os avanços na epigenômica, proteômica, genômica, bioinformática e a interação destes conhecimentos têm levado ao melhor entendimento de vias de sinalização que regulam funções celulares, comunicação inter e intracelular e interação tumor-

hospedeiro (MATTA e RALHAN, 2009). Portanto, a era da genômica, do transcriptoma e da proteômica tem melhorado significativamente a compreensão da fisiologia dos tumores o que tem impulsionado a rápida identificação de novos marcadores e alvos moleculares para diagnóstico, prevenção e tratamento do câncer de cabeça e pescoço (LE e GIACCIA, 2003).

Embora existam trabalhos na literatura sobre marcadores moleculares, há ainda interesse em identificar novos marcadores de prognóstico em HNSCC. Trabalhos anteriores do grupo identificaram vários genes e proteínas com expressão alterada usando RNA *microarray* e técnicas de proteômica (PATEL, HOOD *et al.*, 2008). Tomando como base a importância da via de sinalização (PI3K/Akt) em HNSCC e a relevância das proteínas em diferentes funções biológicas já descritas, neste trabalho foram selecionadas 3 proteínas como candidatas a novos marcadores de prognóstico bem como potenciais novos alvos terapêuticos: SET, hnRNP K e MARK3.

1.5 – Proteína SET/I2PP2A

O gene humano *SET* localizado em 9q34, foi originalmente identificado a partir de estudos em Leucemia Indiferenciada Aguda por von Lindern *et al.* (1992) descreveram uma nova fusão gênica *SET-CAN* produzida a partir de um evento de translocação somática (VON LINDERN, BREEMS *et al.*, 1992). A proteína SET (TAF-I beta ou I2PP2A) mostrou ser um potente e altamente seletivo inibidor da fosfatase PP2A (LI, MAKKINJE *et al.*, 1996), cujo papel inibitório foi atribuído a região N-terminal (Saito, Miyaji-Yamaguchi *et al.*, 1999).

PP2A (serina-treonina fosfatase 2A) é uma fosfatase que controla a fosforilação de várias outras proteínas envolvidas na sinalização celular e tem

grande importância na regulação do crescimento celular (VIRSHUP, 2000; JANSSENS e GORIS, 2001). Janssens *et al.* (2001) relataram que a PP2A é responsável por cerca de 30 a 50% da atividade de desfosforilação serina-treonina dependendo do tipo de célula. Assim, PP2A está envolvida na regulação da proliferação celular, crescimento, diferenciação e apoptose (JANSSENS e GORIS, 2001). Uma função caracterizada desta proteína é a regulação da sinalização de via *Ras-Raf-mitogen-activated protein (MAP) kinase* e, portanto, pode desfosforilar e inativar MEK (MAP/ERK kinase) e ERK (extracellular signal-regulated kinase) *in vitro* (HACCARD, JESSUS *et al.*, 1990). Tratamento de células com inibidor seletivo de PP2A, ácido okadaico, causou ativação de MEK e ERK (SONODA, KASAHARA *et al.*, 1997). Evidenciou-se que PP2A tem participação na via Akt por inativar sua função oncogênica (EICHHORN, CREYGHTON *et al.*, 2009).

A fosfatase PP2A está também envolvida na estabilidade do fator de transcrição c-Myc (ARNOLD e SEARS, 2006; MUKHOPADHYAY, SADDOUGHI *et al.*, 2009). Em resposta a estímulos de crescimento, a proteína c-Myc é fosforilada em Ser⁶², um evento que estabiliza e aumenta sua atividade transcricional e é necessário para sinalizar a fosforilação em Thr⁵⁸. O reconhecimento da Thr⁵⁸ fosforilada permite que a isomerase PIN1 modifique c-Myc para posterior ação de PP2A que desfosforila a Ser⁶². Esta desfosforilação é importante para que ocorra a degradação de c-Myc pela via ubiquitina-proteossoma (SEARS, NUCKOLLS *et al.*, 2000; YEH, CUNNINGHAM *et al.*, 2004), demonstrando assim que o nível de c-Myc na célula é controlado via PP2A (figura 2).

A proteína produzida pelo oncogene *c-MYC* está envolvida no crescimento celular, proliferação e morte celular. A superexpressão de *c-MYC* é descrita como um evento comum em tumores (SPENCER e GROUDINE, 1991; NESBIT, TERSAK

et al., 1999; GRANDORI, COWLEY *et al.*, 2000). O acúmulo da proteína c-Myc na célula ocorre devido ativação de Ras (SEARS, LEONE *et al.*, 1999) por meio de duas vias: Raf-MEK-ERK e PI3K-Akt, sendo que a última inibe GSK-3 β (*glycogen synthase kinase- 3 β*). ERK e GSK-3 β fosforilam os resíduos Ser⁶² e Thr⁵⁸ de c-Myc, respectivamente, sendo este o sinal para posterior ação de PP2A na degradação de c-Myc (SEARS, NUCKOLLS *et al.*, 2000).

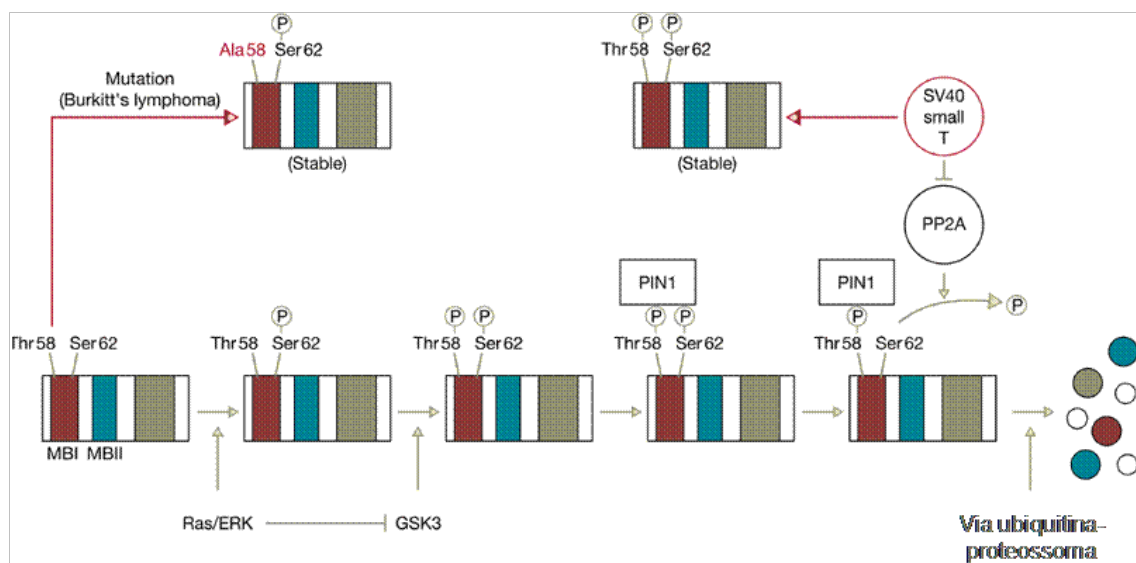


Figura 2: Mecanismo de regulação da estabilidade da proteína c-Myc (DOMINGUEZ-SOLA e DALLA-FAVERA, 2004).

A proteína SET possui também papel na inibição de desfosforilação mediada por PP2A de histona H3 em *Drosophila* (NOWAK, PAI *et al.*, 2003); interação com p21 (Cip1), envolvida no ciclo celular (ESTEVE, CANELA *et al.*, 2003); participante de uma via apoptótica neuronal, relacionada com a doença de Alzheimer e induzida por Jcasp e hiperfosforilação da proteína tau (GONG, LIDSKY *et al.*, 2000); inibição do complexo de acetiltransferase (SEO, MCNAMARA *et al.*, 2001); inibidor da desmetilação de DNA metilado ectopicamente, o que define um novo mecanismo de controle de metilação e

expressão (CERVONI, DETICH *et al.*, 2002); estimula a migração celular de maneira dependente de Rac1 (TEN KLOOSTER, LEEUWEN *et al.*, 2007).

Interessantemente, Chohan *et al.* (2006) mostraram que a hiperfosforilação da proteína tau (proteína associada a microtúbulos) é observada somente quando há mudança subcelular de SET do núcleo para o citoplasma e esta mudança está associada com a clivagem de SET num fragmento de 20 kDa (IQBAL, ALONSO ADEL *et al.*, 2003; CHOCHAN, KHATOON *et al.*, 2006).

Altos níveis de SET foram observados em tumor de Wilms' e células de rim fetal (FORNEROD, BOER *et al.*, 1996; CARLSON, ENG *et al.*, 1998), sugerindo um potencial papel para SET em diferenciação celular. Em linhagens celulares BCR/ABL⁺ e em células progenitoras obtidas de sangue de pacientes com LMC-CB (Leucemia Mielóide Crônica – Crises Blásticas), foi observado que a proteína SET está aumentada devido à atividade de BCR/ABL, o que leva a inativação de PP2A, e coincide com as crises blásticas e a resistência ao imatinib nestes pacientes (NEVIANI, SANTHANAM *et al.*, 2005). Com base nos diversos papéis descritos para a proteína SET, na ausência de informação sobre seu acúmulo na tumorigênese de cabeça e pescoço, neste trabalho foi proposto validar a expressão da proteína SET em amostras de tumores HNSCC para verificar sua potencial aplicação como marcador em HNSCC e seu envolvimento neste tipo de câncer.

1.6 – Proteína hnRNP K

hnRNPs (*heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*) constituem uma grande família de proteínas, com aproximadamente 30 membros (LEOPOLDINO, CARREGARO *et al.*, 2007). Estas proteínas possuem importante papel na biogênese do telômero, reparo de DNA, sinalização celular, e regulação da

expressão em nível transcricional e traducional (CARPENTER, MACKAY *et al.*, 2006; CARPENTER, MCKAY *et al.*, 2006). Tais funções celulares podem estar relacionadas com transformação maligna devido ao mau reparo do DNA, instabilidade cromossômica, apoptose, angiogênese, e invasão celular (CARPENTER, MCKAY *et al.*, 2006; KLIMEK-TOMCZAK, MIKULA *et al.*, 2006).

Vinte e dois genes de hnRNPs já foram mapeados em diferentes cromossomos humanos, e vários possuem transcritos alternativos (LEOPOLDINO, CARREGARO *et al.*, 2007). Uma das hns mais estudadas é a hnRNP K cujo gene está no cromossomo 9, e foi detectada no núcleo, citoplasma e mitocôndria (HABELHAH, SHAH, HUANG, OSTARECK-LEDERER *et al.*, 2001; OSTROWSKI e BOMSZTYK, 2003). A hnRNP K atua na transdução de sinal, *splicing*, regulação de tradução e degradação de RNA (BOMSZTYK, VAN SEUNINGEN *et al.*, 1997; BOMSZTYK, DENISENKO *et al.*, 2004).

Existem vários exemplos na literatura que evidenciam a importância da hnRNP K, tais como: reconhecimento de elementos localizados na região promotora de genes, como *c-MYC*, *c-SCR*, *BRCA1*, e timidina quinase (MICHELOTTI, MICHELOTTI *et al.*, 1996; RITCHIE, PASHA *et al.*, 2003; LYNCH, CHEN *et al.*, 2005); no citoplasma, a hnRNP K está envolvida no silenciamento da translocação do RNAm *erythroid 15-lipoxygenase* (OSTARECK, OSTARECK-LEDERER *et al.*, 1997); expressão exógena da proteína hnRNP K aumentou o nível da proteína UCP2, que não foi acompanhado pelo aumento do mRNA UCP2 (OSTROWSKI, KLIMEK-TOMCZAK *et al.*, 2004); *splicing* de Bcl-x como regulador negativo da produção da isoforma pro-apoptótica Bcl-x_s (REVIL, PELLETIER *et al.*, 2009).

Nas tabelas 1 e 2 estão resumidos os múltiplos processos celulares que a hnRNP K participa. Esta diversidade de interações da hnRNP K sugere que ela

esteja envolvida em vários processos celulares que compõem a expressão gênica, transcrição, tradução e transdução de sinal (BOMSZTYK, DENISENKO *et al.*, 2004)

Tabela 1: hnRNP K interage com vários fatores moleculares nos processos de expressão gênica e transdução de sinal.

Processos	Fatores Moleculares	
Transdução de sinal	Timidina quinase: Scr, Lyn, Fyn, Lck, Itk Serina-treonina quinase: PKC, ERK1/2, JNK Fator de permuta de nucleotídeos: Vav	(WENG, THOMAS <i>et al.</i> , 1994; OSTROWSKI, SCHULLERY <i>et al.</i> , 2000; OSTARECK-LEDERER, OSTARECK <i>et al.</i> , 2002) (SCHULLERY, OSTROWSKI <i>et al.</i> , 1999; HABELHAH, SHAH, HUANG, BURLINGAME <i>et al.</i> , 2001; HABELHAH, SHAH, HUANG, OSTARECK-LEDERER <i>et al.</i> , 2001) (VAN SEUNINGEN, OSTROWSKI <i>et al.</i> , 1995)
Expressão Gênica: Remodelagem de cromatina	Eed DNA-metiltransferase SAF-B	(DENISENKO e BOMSZTYK, 1997) (SHNYREVA, SCHULLERY <i>et al.</i> , 2000) (SAMUEL, SPENCER <i>et al.</i> , 1998)
Expressão gênica: Transcrição	Fatores gerais: TBP, HMGB1 Repressores: Zik1, Kid1, MZF1	(MICHELOTTI, MICHELOTTI <i>et al.</i> , 1996) (DENISENKO, O'NEILL <i>et al.</i> , 1996)
Expressão gênica: <i>Splicing</i>	hnRNP: E2, I, K, L, U Fatores de <i>splicing</i> : 9G8, SRp20 Helicase: DDX1 Fatores gerais: YB-1, Sam68	(KIM, HAHM <i>et al.</i> , 2000; OSTARECK, OSTARECK-LEDERER <i>et al.</i> , 2001) (SHNYREVA, SCHULLERY <i>et al.</i> , 2000)
Expressão gênica: Tradução	Elongação: EF-1 α	(BOMSZTYK, VAN SEUNINGEN <i>et al.</i> , 1997; OSTROWSKI, KLIMEK-TOMCZAK <i>et al.</i> , 2004)

Tabela 2: Exemplos do envolvimento da hnRNP K em múltiplos processos de expressão gênica.

Processos	Gene	
Transcrição: Ativação	c-Myc c-Src	(OSTROWSKI, KAWATA <i>et al.</i> , 2003) (RITCHIE, PASHA <i>et al.</i> , 2003)
Transcrição: Repressão	Timidina quinase Subunidade $\beta 4$ do receptor de acetilcolina	(HSIEH, MATSUMOTO <i>et al.</i> , 1998) (DU, THANOS <i>et al.</i> , 1993)

Splicing	β -tropomiosina, Bcl-X _s	(EXPERT-BEZANCON, LE CAER <i>et al.</i> , 2002; REVIL, PELLETIER <i>et al.</i> , 2009)
Estabilidade do RNA	Renina	(SKALWEIT, DOLLER <i>et al.</i> , 2003)
Tradução: Ativação	c-Myc	(EVANS, MITCHELL <i>et al.</i> , 2003)
Tradução: Silenciamento	15-lipoxigenase (LOX) Papilomavírus tipo 16 (HPV-16) UCP2	(OSTARECK, OSTARECK-LEDERER <i>et al.</i> , 1997; COLLIER, GOOBAR-LARSSON <i>et al.</i> , 1998; OSTROWSKI, KLIMEK-TOMCZAK <i>et al.</i> , 2004)

Em diversas funções celulares, a proteína hnRNP K, pode estar envolvida na tumorigênese. hnRNP K foi identificada como um novo componente na resposta ao dano no DNA (DDR) em mamíferos, portanto crucial para resposta a agentes genotóxico (MOUMEN, MASTERSON *et al.*, 2005). Após irradiação por ionização ou irradiação UV a fim de induzir ATM (“*ataxia telangiectasia mutated*”), verificou-se que a hnRNP K coopera com p53 para elucidar a ativação de genes alvos de p53 e assim desencadear eventos de *checkpoint* no ciclo celular.

hnRNP K é alvo de degradação proteossomal dependente de MDM2, uma proteína conectada com DDR por meio do controle da atividade e níveis de p53, em células não danificadas, cuja degradação cessa após a ocorrência de dano ao DNA (IWAKUMA e LOZANO, 2003). Acredita-se que hnRNP K facilita a montagem e/ou estabilidade do complexo promotor de p53 (MOUMEN, MASTERSON *et al.*, 2005) e que ajuda p53 a buscar por sítios alvos no genoma, um evento chave na ativação gênica (PRIVES e HALL, 1999).

1.7 – Proteína hnRNP K e câncer

Em carcinoma nasofaríngeo (NPC), a localização citoplasmática aberrante de hnRNP K foi associada com menor sobrevida global e sobrevida livre de metástase

(CHEN, HSUEH *et al.*, 2008). De acordo com Inoue *et al.* (2007) seu acúmulo no citoplasma está envolvido na migração celular/metástase (INOUE, SAWATA *et al.*, 2007) e aumenta a resistência das células NPC à apoptose induzida por hipóxia (CHEN, LIU *et al.*, 2009) .

Habelhah *et al.* (2001) mostraram que o acúmulo no citoplasma é dependente de fosforilação via MAPK/ERK (*Mitogen-activated protein kinase/extracellular-signal-regulated kinase*), que deve alterar a conformação do domínio KNS (“*K nuclear shuttling*”). Por outro lado, a supressão da capacidade de hnRNP K acumular-se no citoplasma correlaciona com a perda de sua função na regulação da tradução de proteínas que possuem o elemento DICE (*differentiation-control element*) na região 3’ UTR do mRNA (HABELHAH, SHAH, HUANG, OSTARECK-LEDERER *et al.*, 2001).

A fosforilação de hnRNP K regula positivamente a tradução de mRNAs que contém a região IRES (“*internal ribosome entry segment*”) como, por exemplo, *c-MYC*. Evans *et al.* (2003) mostraram que mutação em IRES de *c-MYC*, um evento que ocorre freqüentemente em pacientes com mieloma múltiplo, leva a uma forte ligação de hnRNP K neste região aumentando assim a transcrição do gene *c-MYC* (EVANS, MITCHELL *et al.*, 2003).

A proteína hnRNP K tem se mostrado capaz de ligar ao promotor do gene *eIF4E*, resultando na ativação da transcrição deste gene. Esta superexpressão ocorre quando ambos *c-Myc* e hnRNP K estão aumentados, sugerindo que a proteína hnRNP K pode cooperar com outras proteínas na indução de genes envolvidos no crescimento de células malignas (LYNCH, CHEN *et al.*, 2005).

A expressão alterada de hnRNP K tem sido descrita em vários tipos de tumores e associada também com resistência à agente de indução a DSB (“*DNA*

double-strand breaks) (HSIEH, MATSUMOTO *et al.*, 1998; PINO, PIO *et al.*, 2003; URBANI, POLAND *et al.*, 2005; PATEL, HOOD *et al.*, 2008; BARBORO, REPACI *et al.*, 2009; BENELLI, MONTEGHIRFO *et al.*, 2009).

Níveis alterados de expressão da hnRNP K foram descritos em tumor colorretal (CARPENTER, MCKAY *et al.*, 2006), de pulmão (PINO, PIO *et al.*, 2003), de fígado (OSTROWSKI e BOMSZTYK, 2003), de próstata (BARBORO, REPACI *et al.*, 2009), carcinoma de células escamosas (ROYCHOUDHURY e CHAUDHURI, 2007), de mama, (MICHELOTTI, MICHELOTTI *et al.*, 1996) e em malignidades do trato gastrointestinal (LEE, LIAO *et al.*, 2007).

Considerando todas as características descritas anteriormente e seu diversos papéis em sinalização, transcrição e tradução, hnRNP K pode representar um potencial marcador de prognóstico e um forte candidato para alvo terapêutico em câncer. Neste estudo foi proposto validar a alteração da proteína hnRNP K em HNSCC e verificar seu potencial envolvimento com esta doença.

1.8 - MARK3

O gene *MARK3* (MAP/microtubule affinity regulating Kinase 3), conhecido como *CTAK1*, *PAR1A* e *KP78*, expressa uma proteína da família das serina/treonina quinases de localização citoplasmática que está envolvida na regulação de afinidade de microtúbulos (TASSAN e LE GOFF, 2004). Membros da família PAR-1/MARK apresentam um papel importante na polaridade (GUO e KEMPHUES, 1995; BOHM, BRINKMANN *et al.*, 1997; SHULMAN, BENTON *et al.*, 2000; CHEN, WANG *et al.*, 2006), controle do ciclo celular (PENG, GRAVES *et al.*, 1998; MULLER, ORY *et al.*, 2001; MULLER, RITT *et al.*, 2003) e controle da dinâmica dos microtúbulos (Nishimura *et al.*, 2004).

As proteínas desta família são reguladas por proteínas com domínios 14-3-3, tais como a quinase supressora de tumor LKB1 (STK11, serina treonina quinase 11) e a atípica proteína quinase C (PKC) (GORANSSON, DEAK *et al.*, 2006). LKB1 inibe a atividade de mTOR, um mediador da via PI3K/Akt (SHAW, BARDEESY *et al.*, 2004), sendo considerado um supressor tumoral, pois perdas hereditárias e somáticas das funções deste gene estão associadas com aumento de risco no desenvolvimento de câncer (TIAINEN, YLIKORKALA *et al.*, 1999; KARUMAN, GOZANI *et al.*, 2001). Análises das funções de LKB1 tem focado na regulação da sinalização de AMPK e mTOR. (CORRADETTI, INOKI *et al.*, 2004; SHAW, BARDEESY *et al.*, 2004), e sugerem que LKB1 é necessário para sobrevivência de células malignas no contexto de ativação via Akt (ZHONG, LIU *et al.*, 2008).

A interação entre a MARK3 e a 14-3-3 é dependente de fosforilação da 14-3-3, e mantêm a MARK3 no citoplasma e na membrana plasmática. A substituição dos aminoácidos dos 15 sítios de fosforilação da MARK3 por alanina aboliu a ligação MARK3-14-3-3 e fez com que a proteína ficasse totalmente localizada na membrana plasmática. A localização na membrana também foi dependente do domínio C-terminal, denominado domínio-1 quinase-associado (KA-1).

A ligação da MARK3 com a PKC e a LKB1 (proteínas 14-3-3) mostra que esta proteína deve apresentar também um papel importante na tumorigênese (GORANSSON, DEAK *et al.*, 2006). Na figura 3, pode-se observar a proteína 14-3-3 participando de vias de sinalização Akt. Por meio de PI3K (phosphoinositide 3-quinase), um receptor da superfície celular, Akt inibe a apoptose por fosforilação da proteína Bad. Bad fosforilada liga-se a 14-3-3, causando a dissociação do complexo Bad/Bcl-x_L e a sobrevivência celular (BERG, HOLZMANN *et al.*, 2003; KUO, HSU *et al.*, 2008).

Como não existem trabalhos mostrando a alteração desta quinase em câncer de cabeça e pescoço, ela foi selecionada com expressão alterada usando microarranjos de RNA (dados não publicados). Neste estudo, foi proposto validar a expressão da proteína MARK3 e sua potencial aplicação como marcador de prognóstico em HNSCC.

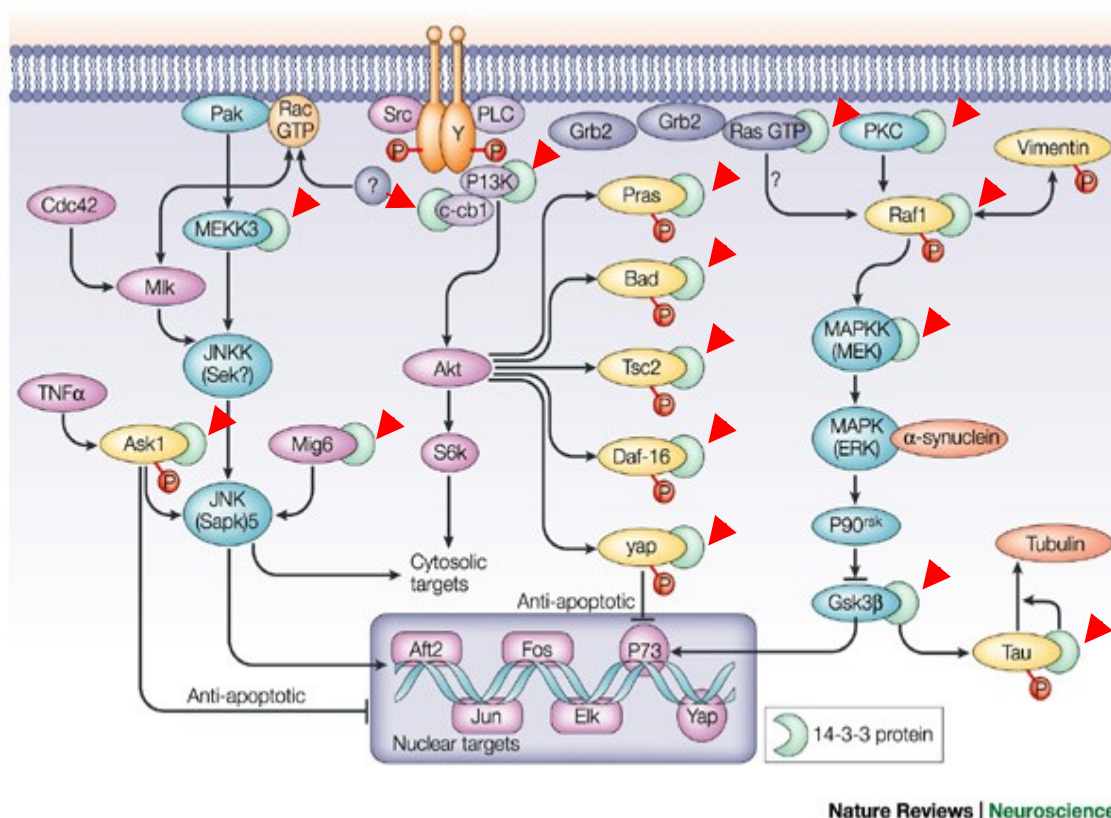


Figura 3 – Vias de sinalização envolvidas com a proteína AKT. As setas vermelhas indicam os pontos principais nos quais as proteínas 14-3-3 podem estar envolvidas na sinalização via Akt. (BERG, HOLZMANN *et al.*, 2003)

2. Conclusões

1. O aumento da proteína SET está associada à desmoplasia em HNSCC.
2. A hnRNP K possui valor prognóstico, seu aumento está relacionado com menor probabilidade de sobrevida global e com elevado índice de recidiva entre os pacientes.
3. A proteína MARK3 está reduzida na tumorigênese de HNSCC e pode ser útil como marcador de prognóstico uma vez que possui associação com menor sobrevida livre de doença.
4. A proteína hnRNP K exerce papel na proliferação celular tumoral e, associada a proteína SET podem atuar como fatores oncogênicos favorecendo o aumento de c-Myc.

3. Referências Bibliográficas

ANDREE, H. A., C. P. REUTELINGSPERGER, *et al.* Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. **J Biol Chem**, v.265, n.9, Mar 25, p.4923-8. 1990.

ANG, K. K., B. A. BERKEY, *et al.* Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. **Cancer Res**, v.62, n.24, Dec 15, p.7350-6. 2002.

ARNOLD, H. K. e R. C. SEARS. Protein phosphatase 2A regulatory subunit B56alpha associates with c-myc and negatively regulates c-myc accumulation. **Mol Cell Biol**, v.26, n.7, Apr, p.2832-44. 2006.

AVNI, D., H. YANG, *et al.* Active localization of the retinoblastoma protein in chromatin and its response to S phase DNA damage. **Mol Cell**, v.12, n.3, Sep, p.735-46. 2003.

AWADA, A. e Y. LALAMI. Molecular markers, molecular-targeted therapies and taxanes: how to integrate the progress into clinical research and practice for the management of head and neck cancers. **Curr Opin Oncol**, v.17, n.3, May, p.209-11. 2005.

BARBORO, P., E. REPACI, *et al.* Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K: altered pattern of expression associated with diagnosis and prognosis of prostate cancer. **Br J Cancer**, v.100, n.10, May 19, p.1608-16. 2009.

BENELLI, R., S. MONTEGHIRFO, *et al.* Novel antivascular efficacy of metronomic docetaxel therapy in prostate cancer: hnRNP K as a player. **Int J Cancer**, v.124, n.12, Jun 15, p.2989-96. 2009.

BERG, D., C. HOLZMANN, *et al.* 14-3-3 proteins in the nervous system. **Nat Rev Neurosci**, v.4, n.9, Sep, p.752-62. 2003.

BOHM, H., V. BRINKMANN, *et al.* Mammalian homologues of *C. elegans* PAR-1 are asymmetrically localized in epithelial cells and may influence their polarity. **Curr Biol**, v.7, n.8, Aug 1, p.603-6. 1997.

BOMSZTYK, K., O. DENISENKO, *et al.* hnRNP K: one protein multiple processes. **Bioessays**, v.26, n.6, Jun, p.629-38. 2004.

BOMSZTYK, K., I. VAN SEUNINGEN, *et al.* Diverse molecular interactions of the hnRNP K protein. **FEBS Lett**, v.403, n.2, Feb 17, p.113-5. 1997.

BRAGOSZEWSKI, P., A. HABIOR, *et al.* Expression of genes encoding mitochondrial proteins can distinguish nonalcoholic steatosis from steatohepatitis. **Acta Biochim Pol**, v.54, n.2, p.341-8. 2007.

CARDINALI, M., H. PIETRASZKIEWICZ, *et al.* Tyrosine phosphorylation as a marker for aberrantly regulated growth-promoting pathways in cell lines derived from head and neck malignancies. **Int J Cancer**, v.61, n.1, Mar 29, p.98-103. 1995.

CARLSON, S. G., E. ENG, *et al.* Expression of SET, an inhibitor of protein phosphatase 2A, in renal development and Wilms' tumor. **J Am Soc Nephrol**, v.9, n.10, Oct, p.1873-80. 1998.

CARPENTER, B., C. MACKAY, *et al.* The roles of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in tumour development and progression. **Biochim Biophys Acta**, v.1765, n.2, Apr, p.85-100. 2006.

CARPENTER, B., M. MCKAY, *et al.* Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is over expressed, aberrantly localised and is associated with poor prognosis in colorectal cancer. **Br J Cancer**, v.95, n.7, Oct 9, p.921-7. 2006.

CERVONI, N., N. DETICH, *et al.* The oncoprotein Set/TAF-1beta, an inhibitor of histone acetyltransferase, inhibits active demethylation of DNA, integrating DNA methylation and transcriptional silencing. **J Biol Chem**, v.277, n.28, Jul 12, p.25026-31. 2002.

CHEN, L. C., C. HSUEH, *et al.* Heterogeneous ribonucleoprotein k and thymidine phosphorylase are independent prognostic and therapeutic markers for nasopharyngeal carcinoma. **Clin Cancer Res**, v.14, n.12, Jun 15, p.3807-13. 2008.

CHEN, L. C., H. P. LIU, *et al.* Thymidine phosphorylase mRNA stability and protein levels are increased through ERK-mediated cytoplasmic accumulation of hnRNP K in nasopharyngeal carcinoma cells. **Oncogene**, v.28, n.17, Apr 30, p.1904-15. 2009.

CHEN, Y. M., Q. J. WANG, *et al.* Microtubule affinity-regulating kinase 2 functions downstream of the PAR-3/PAR-6/atypical PKC complex in regulating hippocampal neuronal polarity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.103, n.22, May 30, p.8534-9. 2006.

CHIANG, C. W., C. KANIES, *et al.* Protein phosphatase 2A dephosphorylation of phosphoserine 112 plays the gatekeeper role for BAD-mediated apoptosis. **Mol Cell Biol**, v.23, n.18, Sep, p.6350-62. 2003.

CHIN, D., G. M. BOYLE, *et al.* Molecular introduction to head and neck cancer (HNSCC) carcinogenesis. **Br J Plast Surg**, v.57, n.7, Oct, p.595-602. 2004.

CHOHAN, M. O., S. KHATOON, *et al.* Involvement of I2PP2A in the abnormal hyperphosphorylation of tau and its reversal by Memantine. **FEBS Lett**, v.580, n.16, Jul 10, p.3973-9. 2006.

CIBAS, E. S. Applications of flow cytometric DNA analysis to diagnostic cytology. **Diagn Cytopathol**, v.13, n.2, Aug, p.166-71. 1995.

COLLIER, A. C. e C. A. PRITSOS. The mitochondrial uncoupler dicumarol disrupts the MTT assay. **Biochem Pharmacol**, v.66, n.2, Jul 15, p.281-7. 2003.

COLLIER, B., L. GOOBAR-LARSSON, *et al.* Translational inhibition in vitro of human papillomavirus type 16 L2 mRNA mediated through interaction with heterogeneous ribonucleoprotein K and poly(rC)-binding proteins 1 and 2. **J Biol Chem**, v.273, n.35, Aug 28, p.22648-56. 1998.

CORRADETTI, M. N., K. INOKI, *et al.* Regulation of the TSC pathway by LKB1: evidence of a molecular link between tuberous sclerosis complex and Peutz-Jeghers syndrome. **Genes Dev**, v.18, n.13, Jul 1, p.1533-8. 2004.

DE MARQUI, A. B., A. VIDOTTO, *et al.* Solubilization of proteins from human lymph node tissue and two-dimensional gel storage. **J Biochem Mol Biol**, v.39, n.2, Mar 31, p.216-22. 2006.

DENISENKO, O. N. e K. BOMSZTYK. The product of the murine homolog of the *Drosophila* extra sex combs gene displays transcriptional repressor activity. **Mol Cell Biol**, v.17, n.8, Aug, p.4707-17. 1997.

DENISENKO, O. N., B. O'NEILL, *et al.* Zik1, a transcriptional repressor that interacts with the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particle K protein. **J Biol Chem**, v.271, n.44, Nov 1, p.27701-6. 1996.

DOMINGUEZ-SOLA, D. e R. DALLA-FAVERA. PINning down the c-Myc oncoprotein. **Nat Cell Biol**, v.6, n.4, Apr, p.288-9. 2004.

DU, W., D. THANOS, *et al.* Mechanisms of transcriptional synergism between distinct virus-inducible enhancer elements. **Cell**, v.74, n.5, Sep 10, p.887-98. 1993.

DUBSKA, L., L. ANDERA, *et al.* HER2 signaling downregulation by trastuzumab and suppression of the PI3K/Akt pathway: an unexpected effect on TRAIL-induced apoptosis. **FEBS Lett**, v.579, n.19, Aug 1, p.4149-58. 2005.

EICHHORN, P. J., M. P. CREYGHTON, *et al.* Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer. **Biochim Biophys Acta**, v.1795, n.1, Jan, p.1-15. 2009.

ELLIS, C. M., M. J. DYSON, *et al.* HER2 amplification status in breast cancer: a comparison between immunohistochemical staining and fluorescence in situ hybridisation using manual and automated quantitative image analysis scoring techniques. **J Clin Pathol**, v.58, n.7, Jul, p.710-4. 2005.

ELLIS, I. O., J. BARTLETT, *et al.* Best Practice No 176: Updated recommendations for HER2 testing in the UK. **J Clin Pathol**, v.57, n.3, Mar, p.233-7. 2004.

ESTEVE, V., N. CANELA, *et al.* The structural plasticity of the C terminus of p21Cip1 is a determinant for target protein recognition. **ChemBiochem**, v.4, n.9, Sep 5, p.863-9. 2003.

EVANS, J. R., S. A. MITCHELL, *et al.* Members of the poly (rC) binding protein family stimulate the activity of the c-myc internal ribosome entry segment in vitro and in vivo. **Oncogene**, v.22, n.39, Sep 11, p.8012-20. 2003.

EXPERT-BEZANCON, A., J. P. LE CAER, *et al.* Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) K is a component of an intronic splicing enhancer complex that activates the splicing of the alternative exon 6A from chicken beta-tropomyosin pre-mRNA. **J Biol Chem**, v.277, n.19, May 10, p.16614-23. 2002.

FELIERS, D., M. J. LEE, *et al.* Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K contributes to angiotensin II stimulation of vascular endothelial growth factor mRNA translation. **Am J Physiol Renal Physiol**, v.293, n.2, Aug, p.F607-15. 2007.

FIRE, A., S. XU, *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v.391, n.6669, Feb 19, p.806-11. 1998.

FORNEROD, M., J. BOER, *et al.* Interaction of cellular proteins with the leukemia specific fusion proteins DEK-CAN and SET-CAN and their normal counterpart, the nucleoporin CAN. **Oncogene**, v.13, n.8, Oct 17, p.1801-8. 1996.

FUKUKAWA, C., H. SHIMA, *et al.* The oncoprotein I-2PP2A/SET negatively regulates the MEK/ERK pathway and cell proliferation. **Int J Oncol**, v.26, n.3, Mar, p.751-6. 2005.

GLEICH, L. L. e F. N. SALAMONE. Molecular genetics of head and neck cancer. **Cancer Control**, v.9, n.5, Sep-Oct, p.369-78. 2002.

GOMEZ, N. e P. COHEN. Dissection of the protein kinase cascade by which nerve growth factor activates MAP kinases. **Nature**, v.353, n.6340, Sep 12, p.170-3. 1991.

GONG, C. X., T. LIDSKY, *et al.* Phosphorylation of microtubule-associated protein tau is regulated by protein phosphatase 2A in mammalian brain. Implications for neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. **J Biol Chem**, v.275, n.8, Feb 25, p.5535-44. 2000.

GORANSSON, O., M. DEAK, *et al.* Regulation of the polarity kinases PAR-1/MARK by 14-3-3 interaction and phosphorylation. **J Cell Sci**, v.119, n.Pt 19, Oct 1, p.4059-70. 2006.

GRANDORI, C., S. M. COWLEY, *et al.* The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v.16, p.653-99. 2000.

GREEN, L. K. e J. GRIFFIN. Increased natural killer cells in fluids. A new, sensitive means of detecting carcinoma. **Acta Cytol**, v.40, n.6, Nov-Dec, p.1240-5. 1996.

GUO, S. e K. J. KEMPHUES. par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. **Cell**, v.81, n.4, May 19, p.611-20. 1995.

HABELHAH, H., K. SHAH, *et al.* Identification of new JNK substrate using ATP pocket mutant JNK and a corresponding ATP analogue. **J Biol Chem**, v.276, n.21, May 25, p.18090-5. 2001.

_____. ERK phosphorylation drives cytoplasmic accumulation of hnRNP-K and inhibition of mRNA translation. **Nat Cell Biol**, v.3, n.3, Mar, p.325-30. 2001.

HACCARD, O., C. JESSUS, *et al.* In vivo activation of a microtubule-associated protein kinase during meiotic maturation of the *Xenopus* oocyte. **Eur J Biochem**, v.192, n.3, Sep 24, p.633-42. 1990.

HADDADIN, K. J., D. S. SOUTAR, *et al.* Natural history and patterns of recurrence of tongue tumours. **Br J Plast Surg**, v.53, n.4, Jun, p.279-85. 2000.

HAORAH, J., L. ZHOU, *et al.* Determination of total N-nitroso compounds and their precursors in frankfurters, fresh meat, dried salted fish, sauces, tobacco, and tobacco smoke particulates. **J Agric Food Chem**, v.49, n.12, Dec, p.6068-78. 2001.

HOMBURG, C. H., M. DE HAAS, *et al.* Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro. **Blood**, v.85, n.2, Jan 15, p.532-40. 1995.

HSIEH, T. Y., M. MATSUMOTO, *et al.* Hepatitis C virus core protein interacts with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K. **J Biol Chem**, v.273, n.28, Jul 10, p.17651-9. 1998.

HSU, S. M., L. RAINE, *et al.* Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **J Histochem Cytochem**, v.29, n.4, Apr, p.577-80. 1981.

INOUE, A., S. Y. SAWATA, *et al.* Loss-of-function screening by randomized intracellular antibodies: identification of hnRNP-K as a potential target for metastasis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.104, n.21, May 22, p.8983-8. 2007.

IQBAL, K., C. ALONSO ADEL, *et al.* Alzheimer neurofibrillary degeneration: therapeutic targets and high-throughput assays. **J Mol Neurosci**, v.20, n.3, p.425-9. 2003.

IWAKUMA, T. e G. LOZANO. MDM2, an introduction. **Mol Cancer Res**, v.1, n.14, Dec, p.993-1000. 2003.

JANSSENS, V. e J. GORIS. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. **Biochem J**, v.353, n.Pt 3, Feb 1, p.417-39. 2001.

JANSSENS, V., J. GORIS, *et al.* PP2A: the expected tumor suppressor. **Curr Opin Genet Dev**, v.15, n.1, Feb, p.34-41. 2005.

KARUMAN, P., O. GOZANI, *et al.* The Peutz-Jegher gene product LKB1 is a mediator of p53-dependent cell death. **Mol Cell**, v.7, n.6, Jun, p.1307-19. 2001.

KIM, J. H., B. HAHM, *et al.* Protein-protein interaction among hnRNPs shuttling between nucleus and cytoplasm. **J Mol Biol**, v.298, n.3, May 5, p.395-405. 2000.

KLIMEK-TOMCZAK, K., M. MIKULA, *et al.* Editing of hnRNP K protein mRNA in colorectal adenocarcinoma and surrounding mucosa. **Br J Cancer**, v.94, n.4, Feb 27, p.586-92. 2006.

KONONEN, J., L. BUBENDORF, *et al.* Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. **Nat Med**, v.4, n.7, Jul, p.844-7. 1998.

KOOPMAN, G., C. P. REUTELINGSPERGER, *et al.* Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. **Blood**, v.84, n.5, Sep 1, p.1415-20. 1994.

KUO, C. T., M. J. HSU, *et al.* Denbinobin induces apoptosis in human lung adenocarcinoma cells via Akt inactivation, Bad activation, and mitochondrial dysfunction. **Toxicol Lett**, v.177, n.1, Feb 28, p.48-58. 2008.

LAM, L., R. M. LOGAN, *et al.* Epidemiological analysis of tongue cancer in South Australia for the 24-year period, 1977-2001. **Aust Dent J**, v.51, n.1, Mar, p.16-22. 2006.

LE, Q. T. e A. J. GIACCIA. Therapeutic exploitation of the physiological and molecular genetic alterations in head and neck cancer. **Clin Cancer Res**, v.9, n.12, Oct 1, p.4287-95. 2003.

LEE, P. T., P. C. LIAO, *et al.* Epidermal growth factor increases the interaction between nucleolin and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K/poly(C) binding protein 1 complex to regulate the gastrin mRNA turnover. **Mol Biol Cell**, v.18, n.12, Dec, p.5004-13. 2007.

LEOPOLDINO, A. M., F. CARREGARO, *et al.* Sequence and transcriptional study of HNRPK pseudogenes, and expression and molecular modeling analysis of hnRNP K isoforms. **Genome**, v.50, n.5, May, p.451-62. 2007.

LI, M., A. MAKKINJE, *et al.* The myeloid leukemia-associated protein SET is a potent inhibitor of protein phosphatase 2A. **J Biol Chem**, v.271, n.19, May 10, p.11059-62. 1996.

LI, S. D., S. CHONO, *et al.* Efficient oncogene silencing and metastasis inhibition via systemic delivery of siRNA. **Mol Ther**, v.16, n.5, May, p.942-6. 2008.

LYNCH, M., L. CHEN, *et al.* hnRNP K binds a core polypyrimidine element in the eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) promoter, and its regulation of eIF4E contributes to neoplastic transformation. **Mol Cell Biol**, v.25, n.15, Aug, p.6436-53. 2005.

MARTIN, S. J., C. P. REUTELINGSPERGER, *et al.* Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. **J Exp Med**, v.182, n.5, Nov 1, p.1545-56. 1995.

MATTA, A. e R. RALHAN. Overview of current and future biologically based targeted therapies in head and neck squamous cell carcinoma. **Head Neck Oncol**, v.1, n.1, p.6. 2009.

MICHELOTTI, E. F., G. A. MICHELOTTI, *et al.* Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is a transcription factor. **Mol Cell Biol**, v.16, n.5, May, p.2350-60. 1996.

MOLINOLO, A. A., P. AMORNPHIMOLTHAM, *et al.* Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis. **Oral Oncol**, v.45, n.4-5, Apr-May, p.324-34. 2009.

MOLLOY, P. J., V. P. BERARDI, *et al.* Detection of multiple reactive protein species by immunoblotting after recombinant outer surface protein A lyme disease vaccination. **Clin Infect Dis**, v.31, n.1, Jul, p.42-7. 2000.

MOUMEN, A., P. MASTERSON, *et al.* hnRNP K: an HDM2 target and transcriptional coactivator of p53 in response to DNA damage. **Cell**, v.123, n.6, Dec 16, p.1065-78. 2005.

MUKHOPADHYAY, A., S. A. SADDOUGHI, *et al.* Direct interaction between the inhibitor 2 and ceramide via sphingolipid-protein binding is involved in the regulation of protein phosphatase 2A activity and signaling. **FASEB J**, v.23, n.3, Mar, p.751-63. 2009.

MULLER, J., S. ORY, *et al.* C-TAK1 regulates Ras signaling by phosphorylating the MAPK scaffold, KSR1. **Mol Cell**, v.8, n.5, Nov, p.983-93. 2001.

MULLER, J., D. A. RITT, *et al.* Functional analysis of C-TAK1 substrate binding and identification of PKP2 as a new C-TAK1 substrate. **EMBO J**, v.22, n.17, Sep 1, p.4431-42. 2003.

NESBIT, C. E., J. M. TERSAK, *et al.* MYC oncogenes and human neoplastic disease. **Oncogene**, v.18, n.19, May 13, p.3004-16. 1999.

NEVIANI, P., R. SANTHANAM, *et al.* The tumor suppressor PP2A is functionally inactivated in blast crisis CML through the inhibitory activity of the BCR/ABL-regulated SET protein. **Cancer Cell**, v.8, n.5, Nov, p.355-68. 2005.

NOTARI, M., P. NEVIANI, *et al.* A MAPK/HNRPK pathway controls BCR/ABL oncogenic potential by regulating MYC mRNA translation. **Blood**, v.107, n.6, Mar 15, p.2507-16. 2006.

NOWAK, S. J., C. Y. PAI, *et al.* Protein phosphatase 2A activity affects histone H3 phosphorylation and transcription in *Drosophila melanogaster*. **Mol Cell Biol**, v.23, n.17, Sep, p.6129-38. 2003.

O'LEARY, T. J. Flow cytometry in diagnostic cytology. **Diagn Cytopathol**, v.18, n.1, Jan, p.41-6. 1998.

OGDEN, G. R. e A. J. WIGHT. Aetiology of oral cancer: alcohol. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v.36, n.4, Aug, p.247-51. 1998.

OLIVER, A. J., J. F. HELFRICK, *et al.* Primary oral squamous cell carcinoma: a review of 92 cases. **J Oral Maxillofac Surg**, v.54, n.8, Aug, p.949-54; discussion 955. 1996.

ORFAO, A., J. CIUDAD, *et al.* Flow cytometry in the diagnosis of cancer. **Scand J Clin Lab Invest Suppl**, v.221, p.145-52. 1995.

OSTARECK-LEDERER, A., D. H. OSTARECK, *et al.* c-Src-mediated phosphorylation of hnRNP K drives translational activation of specifically silenced mRNAs. **Mol Cell Biol**, v.22, n.13, Jul, p.4535-43. 2002.

OSTARECK, D. H., A. OSTARECK-LEDERER, *et al.* Lipoygenase mRNA silencing in erythroid differentiation: The 3'UTR regulatory complex controls 60S ribosomal subunit joining. **Cell**, v.104, n.2, Jan 26, p.281-90. 2001.

_____. mRNA silencing in erythroid differentiation: hnRNP K and hnRNP E1 regulate 15-lipoxygenase translation from the 3' end. **Cell**, v.89, n.4, May 16, p.597-606. 1997.

OSTROWSKI, J. e K. BOMSZTYK. Nuclear shift of hnRNP K protein in neoplasms and other states of enhanced cell proliferation. **Br J Cancer**, v.89, n.8, Oct 20, p.1493-501. 2003.

OSTROWSKI, J., Y. KAWATA, *et al.* Transient recruitment of the hnRNP K protein to inducibly transcribed gene loci. **Nucleic Acids Res**, v.31, n.14, Jul 15, p.3954-62. 2003.

OSTROWSKI, J., K. KLIMEK-TOMCZAK, *et al.* Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K enhances insulin-induced expression of mitochondrial UCP2 protein. **J Biol Chem**, v.279, n.52, Dec 24, p.54599-609. 2004.

OSTROWSKI, J., D. S. SCHULLERY, *et al.* Role of tyrosine phosphorylation in the regulation of the interaction of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K protein with its protein and RNA partners. **J Biol Chem**, v.275, n.5, Feb 4, p.3619-28. 2000.

PARTRIDGE, M., D. E. COSTEA, *et al.* The changing face of p53 in head and neck cancer. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v.36, n.12, Dec, p.1123-38. 2007.

PATEL, V., B. L. HOOD, *et al.* Proteomic analysis of laser-captured paraffin-embedded tissues: a molecular portrait of head and neck cancer progression. **Clin Cancer Res**, v.14, n.4, Feb 15, p.1002-14. 2008.

PENG, C. Y., P. R. GRAVES, *et al.* C-TAK1 protein kinase phosphorylates human Cdc25C on serine 216 and promotes 14-3-3 protein binding. **Cell Growth Differ**, v.9, n.3, Mar, p.197-208. 1998.

PINO, I., R. PIO, *et al.* Altered patterns of expression of members of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) family in lung cancer. **Lung Cancer**, v.41, n.2, Aug, p.131-43. 2003.

PRIVES, C. e P. A. HALL. The p53 pathway. **J Pathol**, v.187, n.1, Jan, p.112-26. 1999.

RABILLOUD, T., C. ADESSI, *et al.* Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, v.18, n.3-4, Mar-Apr, p.307-16. 1997.

RAYNAL, P. e H. B. POLLARD. Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. **Biochim Biophys Acta**, v.1197, n.1, Apr 5, p.63-93. 1994.

REVIL, T., J. PELLETIER, *et al.* Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K represses the production of the pro-apoptotic Bcl-xS splice isoform. **J Biol Chem**, Jun 11. 2009.

RITCHIE, S. A., M. K. PASHA, *et al.* Identification of the SRC pyrimidine-binding protein (SPy) as hnRNP K: implications in the regulation of SRC1A transcription. **Nucleic Acids Res**, v.31, n.5, Mar 1, p.1502-13. 2003.

ROYCHOUDHURY, P. e K. CHAUDHURI. Evidence for heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K overexpression in oral squamous cell carcinoma. **Br J Cancer**, v.97, n.4, Aug 20, p.574-5; author reply 576. 2007.

SAMUEL, S. K., V. A. SPENCER, *et al.* In situ cross-linking by cisplatin of nuclear matrix-bound transcription factors to nuclear DNA of human breast cancer cells. **Cancer Res**, v.58, n.14, Jul 15, p.3004-8. 1998.

SATO, S., N. FUJITA, *et al.* Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.97, n.20, Sep 26, p.10832-7. 2000.

SCHLIEPHAKE, H. Prognostic relevance of molecular markers of oral cancer--a review. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v.32, n.3, Jun, p.233-45. 2003.

SCHULLERY, D. S., J. OSTROWSKI, *et al.* Regulated interaction of protein kinase Cdelta with the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K protein. **J Biol Chem**, v.274, n.21, May 21, p.15101-9. 1999.

SEARS, R., G. LEONE, *et al.* Ras enhances Myc protein stability. **Mol Cell**, v.3, n.2, Feb, p.169-79. 1999.

SEARS, R., F. NUCKOLLS, *et al.* Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. **Genes Dev**, v.14, n.19, Oct 1, p.2501-14. 2000.

SEO, S. B., P. MCNAMARA, *et al.* Regulation of histone acetylation and transcription by INHAT, a human cellular complex containing the set oncoprotein. **Cell**, v.104, n.1, Jan 12, p.119-30. 2001.

SHAW, R. J., N. BARDEESY, *et al.* The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling. **Cancer Cell**, v.6, n.1, Jul, p.91-9. 2004.

SHNYREVA, M., D. S. SCHULLERY, *et al.* Interaction of two multifunctional proteins. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K and Y-box-binding protein. **J Biol Chem**, v.275, n.20, May 19, p.15498-503. 2000.

SHULMAN, J. M., R. BENTON, *et al.* The Drosophila homolog of C. elegans PAR-1 organizes the oocyte cytoskeleton and directs oskar mRNA localization to the posterior pole. **Cell**, v.101, n.4, May 12, p.377-88. 2000.

SKALWEIT, A., A. DOLLER, *et al.* Posttranscriptional control of renin synthesis: identification of proteins interacting with renin mRNA 3'-untranslated region. **Circ Res**, v.92, n.4, Mar 7, p.419-27. 2003.

SONODA, Y., T. KASAHARA, *et al.* Stimulation of interleukin-8 production by okadaic acid and vanadate in a human promyelocyte cell line, an HL-60 subline. Possible role of mitogen-activated protein kinase on the okadaic acid-induced NF-kappaB activation. **J Biol Chem**, v.272, n.24, Jun 13, p.15366-72. 1997.

SONTAG, E. Protein phosphatase 2A: the Trojan Horse of cellular signaling. **Cell Signal**, v.13, n.1, Jan, p.7-16. 2001.

SPENCER, C. A. e M. GROUDINE. Control of c-myc regulation in normal and neoplastic cells. **Adv Cancer Res**, v.56, p.1-48. 1991.

TASSAN, J. P. e X. LE GOFF. An overview of the KIN1/PAR-1/MARK kinase family. **Biol Cell**, v.96, n.3, Apr, p.193-9. 2004.

TEN KLOOSTER, J. P., I. LEEUWEN, *et al.* Rac1-induced cell migration requires membrane recruitment of the nuclear oncogene SET. **EMBO J**, v.26, n.2, Jan 24, p.336-45. 2007.

TESTA, J. R. e A. BELLACOSA. AKT plays a central role in tumorigenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.98, n.20, Sep 25, p.10983-5. 2001.

THANT, A. A., A. NAWA, *et al.* Fibronectin activates matrix metalloproteinase-9 secretion via the MEK1-MAPK and the PI3K-Akt pathways in ovarian cancer cells. **Clin Exp Metastasis**, v.18, n.5, p.423-8. 2000.

TIAINEN, M., K. VAAHTOMERI, *et al.* Growth arrest by the LKB1 tumor suppressor: induction of p21(WAF1/CIP1). **Hum Mol Genet**, v.11, n.13, Jun 15, p.1497-504. 2002.

TIAINEN, M., A. YLIKORKALA, *et al.* Growth suppression by Lkb1 is mediated by a G(1) cell cycle arrest. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.96, n.16, Aug 3, p.9248-51. 1999.

URBANI, A., J. POLAND, *et al.* A proteomic investigation into etoposide chemoresistance of neuroblastoma cell lines. **Proteomics**, v.5, n.3, Feb, p.796-804. 2005.

VAN SEUNINGEN, I., J. OSTROWSKI, *et al.* The K protein domain that recruits the interleukin 1-responsive K protein kinase lies adjacent to a cluster of c-Src and Vav

SH3-binding sites. Implications that K protein acts as a docking platform. **J Biol Chem**, v.270, n.45, Nov 10, p.26976-85. 1995.

VENABLES, J. P., C. S. KOH, *et al.* Multiple and specific mRNA processing targets for the major human hnRNP proteins. **Mol Cell Biol**, v.28, n.19, Oct, p.6033-43. 2008.

VERMES, I., C. HAANEN, *et al.* A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **J Immunol Methods**, v.184, n.1, Jul 17, p.39-51. 1995.

VIRSHUP, D. M. Protein phosphatase 2A: a panoply of enzymes. **Curr Opin Cell Biol**, v.12, n.2, Apr, p.180-5. 2000.

VON LINDERN, M., D. BREEMS, *et al.* Characterization of the translocation breakpoint sequences of two DEK-CAN fusion genes present in t(6;9) acute myeloid leukemia and a SET-CAN fusion gene found in a case of acute undifferentiated leukemia. **Genes Chromosomes Cancer**, v.5, n.3, Oct, p.227-34. 1992.

WARING, M. J. Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. **J Mol Biol**, v.13, n.1, Aug, p.269-82. 1965.

WENG, Z., S. M. THOMAS, *et al.* Identification of Src, Fyn, and Lyn SH3-binding proteins: implications for a function of SH3 domains. **Mol Cell Biol**, v.14, n.7, Jul, p.4509-21. 1994.

WILLINGHAM, A. T., Q. L. DEVERAUX, *et al.* RNAi and HTS: exploring cancer by systematic loss-of-function. **Oncogene**, v.23, n.51, Nov 1, p.8392-400. 2004.

YARDEN, Y. The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. **Eur J Cancer**, v.37 Suppl 4, Sep, p.S3-8. 2001.

YEH, E., M. CUNNINGHAM, *et al.* A signalling pathway controlling c-Myc degradation that impacts oncogenic transformation of human cells. **Nat Cell Biol**, v.6, n.4, Apr, p.308-18. 2004.

YLIKORKALA, A., E. AVIZIENYTE, *et al.* Mutations and impaired function of LKB1 in familial and non-familial Peutz-Jeghers syndrome and a sporadic testicular cancer. **Hum Mol Genet**, v.8, n.1, Jan, p.45-51. 1999.

YOKOYAMA, N., N. C. REICH, *et al.* Involvement of protein phosphatase 2A in the interleukin-3-stimulated Jak2-Stat5 signaling pathway. **J Interferon Cytokine Res**, v.21, n.6, Jun, p.369-78. 2001.

ZHONG, D., X. LIU, *et al.* LKB1 is necessary for Akt-mediated phosphorylation of proapoptotic proteins. **Cancer Res**, v.68, n.18, Sep 15, p.7270-7. 2008.