

O papel da subunidade proteica EMC3 na tumorigênese induzida por RAS em *Drosophila melanogaster* e em linhagem celular humana

RESUMO

O EMC (Endoplasmatic Reticulum Membrane Complex) é um conjunto proteico altamente conservado em eucariotos e importante para modificações pós-traducionais (MPT). Proteínas RAS são essenciais para deflagração de sinais proliferativos em cânceres, sendo os proto-oncogenes RAS os mais frequentemente mutados nessa patologia. MPTs de RAS ocorrem no retículo endoplasmático. Relata-se interação entre RAS, EMC3, EGFR e RAB5A. Portanto, EMC3, do complexo EMC, poderia atuar como co-chaperona das oncoproteínas RAS e/ou assessora para metil e/ou lipídio transferases, funções essas primordiais na ativação da via de proliferação RAS-RAF-MEK-ERK. O presente projeto objetivou, assim, avaliar a participação de EMC3 na supressão do fenótipo tumorigênico desencadeado por RASV12 em *Drosophila melanogaster* e em linhagens celulares humanas. Como metodologia, foi realizada, em *Drosophila melanogaster*, análise fenotípica da prole dos cruzamentos entre controle e superexpresso em RAS em comparação aos silenciados para EMC3 (sistema GAL4>UAS) - expressão gênica validada em RT-qPCR. O desenvolvimento ocorreu a 18° e, após estágio L3, a 25° até a eclosão. Adicionalmente, células humanas da linhagem HEK293T foram transduzidas com vetor lentiviral shRNA-EMC3 e transfectadas com plasmídeo GFP-HRasV12; investigação por Western Blot da ativação da via de RAS com e sem silenciamento de EMC3; Ensaio Clonogênico e Microscopia de Epifluorescência. Como resultado, nos cruzamentos encontramos supressão total do fenótipo tumorigênico em 78% dos animais obtidos. Nas células humanas, o silenciamento de EMC3 causou acúmulo da GFP-H-RasV12 no citoplasma, prevenindo sua localização tipicamente associada à membrana plasmática, além de alterar a fosforilação de ERK e o crescimento clonogênico. Conclui-se, dessa forma, que os resultados reforçam a hipótese de que EMCs atuam como co-chaperona das oncoproteínas RAS e/ou como assessoras para metil e/ou lipídio transferases.

Palavras-chave: câncer, sinalização intracelular, modificações proteicas pós-traducionais, retículo endoplasmático.

1. INTRODUÇÃO

1.1. EMC3: uma subunidade do complexo de proteínas transmembrana do retículo endoplasmático.

O retículo endoplasmático (RE) é responsável pela síntese da maioria dos lipídios (Fagone and Jackowski, 2009), do transporte vesicular intracelular de proteínas (Bonifacino, 2014), da via secretora (Barlowe and Miller, 2013) e do processamento de diversas proteínas através dos mecanismos de modificações pós-traducionais de proteínas (MPTs) (Ellgaard and Helenius, 2003). Ainda que a maioria desses processos celulares seja bem conhecida, há muitas proteínas identificadas ou preditas em importantes vias celulares que permanecem não caracterizadas (Costanzo et al., 2010). Dentre elas, encontra-se o complexo proteico transmembrana EMC (*Endoplasmatic Reticulum Membrane Complex*). Trata-se de um conjunto de seis proteínas altamente conservadas em eucariontes, identificado pela primeira vez em *Saccharomyces cerevisiae* por meio da avaliação da resposta de proteínas mal-enoveladas UPR (*Unfolded Protein Response*), cujas funções são ainda pouco compreendidas (Jonikas et al., 2009).

Um posterior estudo de análises proteômicas para a via de ubiquitinação e degradação de proteínas via ERAD (*Endoplasmatic Reticulum-associated Degradation*) revelou que as EMCs possuem dez isoformas em mamíferos (mEMCs) e nove em *Drosophila melanogaster* (ortólogas das seis isoformas de levedura) que interagem entre si para a formação do complexo (Christianson et al., 2012). Os estudos mais recentes têm destacado a importância do complexo EMC para modificações pós-traducionais (MPTs), especialmente para proteínas transmembrana (Chitwood et al., 2018; Guna et al., 2018; Shurtleff et al., 2018). Recentemente, foi demonstrado que as EMCs reconhecem domínios transmembrana (DTMs) e funcionam como insertases de proteínas (Guna et al., 2018). A função insertase é, ainda, de fundamental importância para a correta orientação (ou topologia) de proteínas com múltiplos DTMs que passam por MPTs no RE, bem como daquelas que são transportadas e inseridas na membrana plasmática (MP) (Chitwood et al., 2018). Sendo assim, esses trabalhos demonstram a relevância do estudo das EMCs, identificando e elucidando algumas das vias de biogênese de proteínas de membranas nas quais essas proteínas atuam.

Muitas dessas vias originam proteínas de membrana que agem como receptoras e/ou transdutoras de sinais importantes para a proliferação, crescimento e sobrevivência celular. Nesse contexto, destaca-se a subunidade EMC3. Análises de bioinformática indicam que o gene HspEMC3 é um homólogo distante de Get1 (Anghel, 2017), uma subunidade da insertase da via de TRC (Complexo de reconhecimento de domínio transmembrana único) (Wang et al, 2014). Sabe-se que a proteína EMC3 interage com algumas

proteínas chaperonas, tais como Pma1, Fks1, Spf1 e com Ilm1, uma proteína pouco caracterizada residente no RE (Lockshon et al., 2007). Ademais, a deleção do gene EMC3 em células epiteliais de pulmões de embrião levam à deficiência na produção de surfactante, fato relacionado com letalidade neonatal (Tang et al., 2017).

1.2. A regulação pós-traducional de RAS e sua relação com o complexo EMC.

As vias proliferativas de sinalização celular são predominantemente ativadas por receptores de membrana transdutores de sinal que possuem um ou mais DTMs que devem ser adequadamente enovelados para sua correta topologia nas membranas de organelas como o RE, assim como na MP (Chitwood et al., 2018). Interessantemente, os genes mais recrutados para a deflagração de sinais proliferativos em diferentes tipos de câncer codificam proteínas que não possuem DTMs: os três oncogenes RAS (Prior et al., 2012), os quais apresentam as mutações *drivers* mais frequentes e mais difíceis de tratar do que qualquer outro oncogene (Hobbs et al., 2016). A proteína RAS, portanto, é ancorada à face interna da MP atuando como GTPase ativada a partir da autofosforilação de receptores tirosina-quinase (RTKs; e.g. EGFR) ativados por mitógenos (Malumbres and Barbacid, 2003). Em sua forma ativa, RAS promove a fosforilação da proteína serina treonina quinase RAF, desencadeando uma cascata quinase que ativa subsequentemente MEK1/MEK2 e ERK1/ERK2, quinases reguladas por sinal extracelular (Downward, 2003). Quando fosforiladas, ERK1 e ERK2 atuam como catalizadores na fosforilação de substratos tanto no citoplasma quanto no núcleo, onde interagem com moléculas regulatórias e fatores de transcrição que, por fim, induzem proliferação celular (Roskoski, 2012).

A viabilidade funcional da via proliferativa RTK-RAS-RAF-MEK-ERK depende da ancoragem de RAS na MP e, devido à ausência de DTMs, as proteínas RAS requerem outras MPTs para serem endereçadas à MP, tais como a metilação e a lipidação (Ahearn et al., 2018). Curiosamente, tanto o enovelamento, quanto a metilação e lipidação de RAS ocorrem no retículo endoplasmático, organela em que o complexo EMC é residente. Além disso, já foram relatadas as interações proteína-proteína entre EGFR e RAB5A (*Ras-related Protein*), uma GTPase associada com o recrutamento de EGFR para a MP (Li et al., 2013) e também entre EGFR e EMC3 (Tong et al., 2014), embora os processos desta interação ainda não tenham sido explorados. Há, portanto, um potencial papel funcional das EMCs, especialmente a subunidade EMC3, como co-chaperona das oncoproteínas RAS e/ou como proteínas assessoras para lipídio transferases, de modo que essas prováveis funções são essenciais para a inserção de RAS na MP e para a ativação da via RAS-RAF-MEK-ERK de proliferação celular.

2. OBJETIVO

O objetivo desse projeto foi avaliar a atuação da EMC3 na supressão do fenótipo tumorigênico desenvolvido a partir de RAS^{V12} em *Drosophila melanogaster* e em linhagens celulares humanas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.2. Cruzamentos das linhagens transgênicas de *D. melanogaster*

Os cruzamentos foram realizados entre machos jovens (1-2 dias pós-eclosão da pupa) e moscas virgens (algumas horas pós-eclosão da pupa) identificadas pela presença de mecônio (primeiras fezes) no abdômen. Os cruzamentos foram feitos na proporção 3:1 de machos para fêmeas, a fim de permitir o comportamento de corte e seleção sexual. A indução da tumorigênese no olho de *D. melanogaster* foi realizada pelo sistema binário de expressão UAS-GAL4. Realizou-se o cruzamento *GMR-GAL4 X UAS-RAS^{V12}, UAS-GFP*. A prole teve seu fenótipo (esperado como olho tumorigênico) analisado. Em comparação com esse primeiro fenótipo observado, houve a análise do fenótipo da prole do cruzamento *GMR-GAL4 X UAS-RAS^{V12}; UAS- RNAi-EMC3*. O desenvolvimento ocorreu a 18° e, após estágio L3, a 25° até a eclosão.

3.3. RT-qPCR

A extração de RNA total das diferentes amostras foi feita seguindo as recomendações do fabricante do reagente Trizol (Invitrogen). Após a extração do RNA total, as amostras foram tratadas com 2 µl de DNase I Amplification Grade (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. A integridade das amostras de RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose. A concentração e a pureza do RNA foram avaliadas por espectrofotometria de absorção, utilizando o espectrofotômetro Thermo NanoDrop 2000 (Uniscience). O RNA total extraído foi submetido à transcrição reversa dos mRNAs utilizando o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) segundo orientações do fabricante. As reações de PCR em Tempo Real (qPCR) foram realizadas no equipamento Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, utilizando o GoTaq® qPCR Master Mix Kit (Promega). As reações foram amplificadas por: 10s a 95°C, seguido de 40 a 50 ciclos de 95°C por 10s e 72°C por 30s. A análise da expressão gênica foi avaliada pelo software homônimo do equipamento de qPCR utilizando a expressão do gene constitutivo TBP (TATA Box Binding Protein) como controle endógeno no método de quantificação relativa 2- $\Delta\Delta C_t$ seguindo os principais critérios para realização de qPCR.

3.4. Cultivo e linhagens celulares

Os genótipos de silenciamento para a EMC3 foram gerados a partir das linhagens celulares humanas

de melanoma metastático HEK-293T através da transdução de partículas antivirais contendo shRNAs (kit Abcam com 2-3 shRNAs). Subsequentemente, as células foram também transfectadas para coexpressão de MSCV HRASV12 IRES GFP (Addgene). Todas as células foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. A cultura foi monitorada diariamente por microscópio invertido e o meio de cultura foi trocado a cada 2 dias.

3.5. Western blot

O ensaio detecção de fosforilação foi realizado para ERK1 e ERK2 utilizando o kit Phospho-ERK1/ERK2 (Thr185, Tyr187) Polyclonal Antibody (Cell Signalling), segundo orientações do fabricante, e as proteínas avaliadas por Western blot. Quinhentas mil células foram cultivadas em meio completo (suplementado com 10% de SFB) ou em meio privado de SFB por 48 horas e reestimuladas por SFB, por 0, 5 e 10 minutos.

3.6. Ensaio Clonogênico

As células obtidas no descrito anteriormente foram cultivadas em placas de 35 cm² em baixa densidade (cerca de 500 células por placa), de maneira a posicionar as células para que essas fiquem isoladas. Cada placa contava com um meio Ham-F10 suplementado com 10% SFB. A capacidade clonogênica foi calculada a partir da quantificação das unidades formadoras de colônias. Após o período de crescimento, as células foram fixadas com solução de etanol 70% por 20 minutos, coradas com 1 ml da solução de cristal violeta 0,5% durante 30 minutos, e então lavadas 10 vezes com PBS. Procedeu-se a eluição do corante utilizando uma solução SDS 10% por 30 minutos.

4. ASPECTOS ÉTICOS E LEGAIS

Não há nenhuma edição ética acerca do uso de *Drosophila melanogaster*. Analogamente, não há edição ética sobre o uso de células humanas da linhagem HEK293T. O uso de vetores virais em células da linhagem HEK-293T não apresenta requisitos para necessidade de cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado, de acordo com a Lei Federal nº 13.123/2015.

5. RESULTADOS

5.1. Geração de cruzamento via UAS-GAL4

Foram gerados adultos a partir dos cruzamentos: GMR-GAL4 X UAS-RASV12; GMR-GAL4 X

UAS-RASV12; UAS- RNAi-EMC3; GMR-GAL4 X UAS- RNAi-EMC3; e GMR-GAL4 X Canton S. Houve supressão total do fenótipo tumorigênico em 78% dos adultos de genótipo *GMR-GAL4 X UAS-RAS^{V12}; UAS- RNAi-EMC3*.

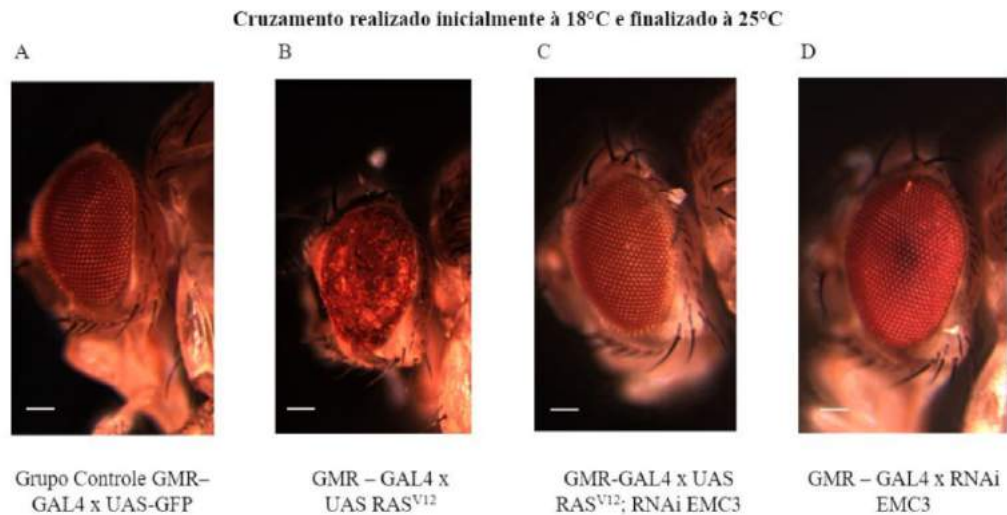


Figura 1: Adultos de genótipo GMR-GAL4 X UAS-RASV12; UAS- RNAi-EMC3 apresentaram supressão do fenótipo tumorigênico, em sua maioria. O desenvolvimento ocorreu a 18° e, após estágio L3, a 25° até a eclosão. Traço indica a medida de 100 µm.

5.2. RT-qPCR em *D. melanogaster*

Os genótipos dos animais adultos avaliados foram gerados a partir dos cruzamentos: GMR-GAL4 X UAS-RASV12; GMR-GAL4 X UAS- RNAi-EMC3; GMR-GAL4 X UAS-RASV12; UAS- RNAi-EMC3, GMR-GAL4 X Canton S (controle negativo de ativação do sistema binário de expressão GAL4-UAS) e GMR-GAL4 X UAS-GFP (controle positivo). Posteriormente, foi feita a extração do RNA total, seguindo a metodologia descrita. A análise da expressão gênica foi avaliada pelo software homônimo do equipamento de PCR para determinar os níveis de expressão de cada gene estudado.

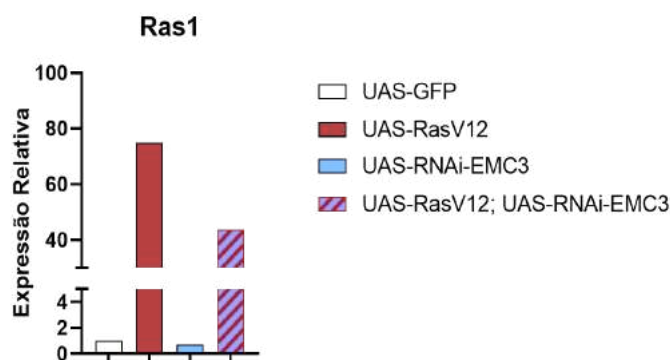


Figura 2: Expressão relativa do gene Ras1 (endógeno) e RasV12 (transgene). O gráfico apresenta a quantificação relativa de mRNA de Ras em relação ao gene de referência RPL32A. Os resultados são representativos de 2 experimentos distintos realizados em triplicata .

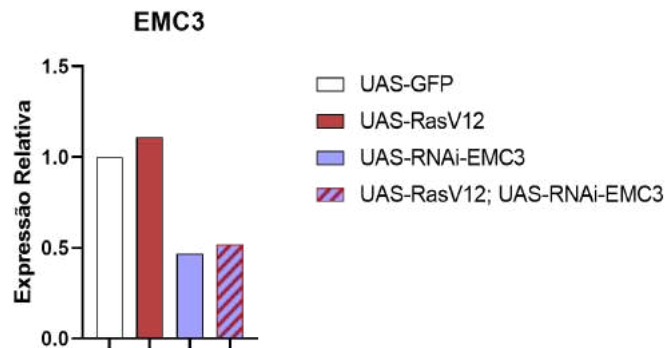


Figura 3: Expressão relativa do gene EMC3. O gráfico apresenta a quantificação relativa de mRNA de EMC3 em relação ao gene de referência RPL32A. Os resultados são representativos de 2 experimentos distintos realizados em duplicata.

5.3. Microscopia de Epifluorescência

Como descrito anteriormente, foi realizada a transdução de vetores para silenciamento estável da EMC3 (shEMC3 #sh318 e shEMC3 #sh828) e, como controle, um shRNA irrelevante (shCTRL). Após cultivo sob condições restritivas para estabilização do silenciamento, as células foram transfectadas com plasmídeo para superexpressão de GFP-H-RasV12 ou da proteína inócua GFP. Com isso, foram geradas imagens utilizando o microscópio de epifluorescência do Departamento de Biologia Celular e Molecular – FMRP-USP.



Figura 4: Células transfectadas para expressão de GFP-H-RASV12 e de um sh controle (shCTRL) inespecífico. A: micrografia em campo claro. B: fluorescência da GFP-H-RASV12. C: sobreposição de A e B.

Células com shRNA para EMC3 (sh318) e para superexpressão de GFP-H-RAS^{V12}



Figura 5: Células transfectadas para expressão de GFP-H-RASV12 e silenciamento de EMC3 (sh318). A: micrografia em campo claro. B: marcação com GFP. C: sobreposição de A e B.

Células com shRNA para EMC3 (sh828) e para superexpressão de GFP-H-RAS^{V12}

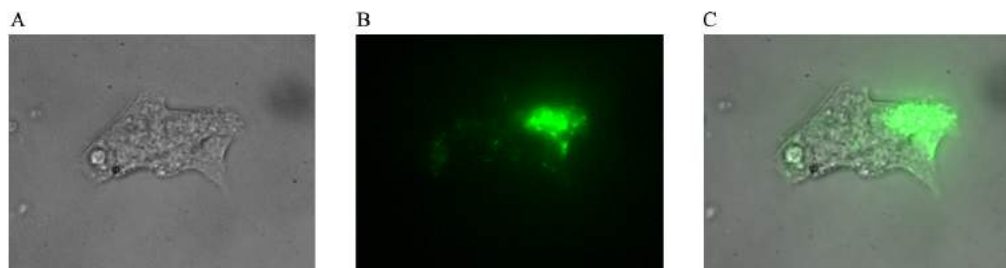


Figura 6: Células transfectadas para expressão de GFP-H-RASV12 e silenciamento de EMC3 (sh828). A: micrografia em campo claro. B: marcação com GFP. C: sobreposição de A e B.

Células com shRNA Controle



Figura 7: Células transfectadas para expressão de um sh controle (shCTRL) inespecífico. A: micrografia em campo claro. B: fluorescência da GFP-H-RASV12. C: sobreposição de A e B.

5.4. Western Blot

Uma vez validada a expressão gênica e proteica dos genótipos avaliados, buscamos responder se o silenciamento de EMC3 é capaz de interferir na ativação de Erk, isto é, níveis de Erk fosforilada, P-ERK,

induzida tanto pela GFP-HRasV12, quanto pela Ras endógena, via estímulo por mitógenos do soro fetal bovino. A detecção dos níveis da proteína P-ERK após privação de soro fetal bovino (fonte de mitógenos e fatores de crescimento e de sobrevivência celular) é uma abordagem clássica para avaliar se a via MAPK é ativada, de modo que, após um período em meio de cultura privada de soro fetal bovino (SFB), a via é induzida por reintrodução de SFB a 10% no meio de cultura por intervalos temporais crescentes (time coursing) (Abkhezr et al., 2010). Dessa forma, avaliamos a relação da expressão proteica de P-ERK/ERK total em todos os genótipos não transfectados (shCTRL, sh318, sh828) e transfectados com GFP-HRasV12.

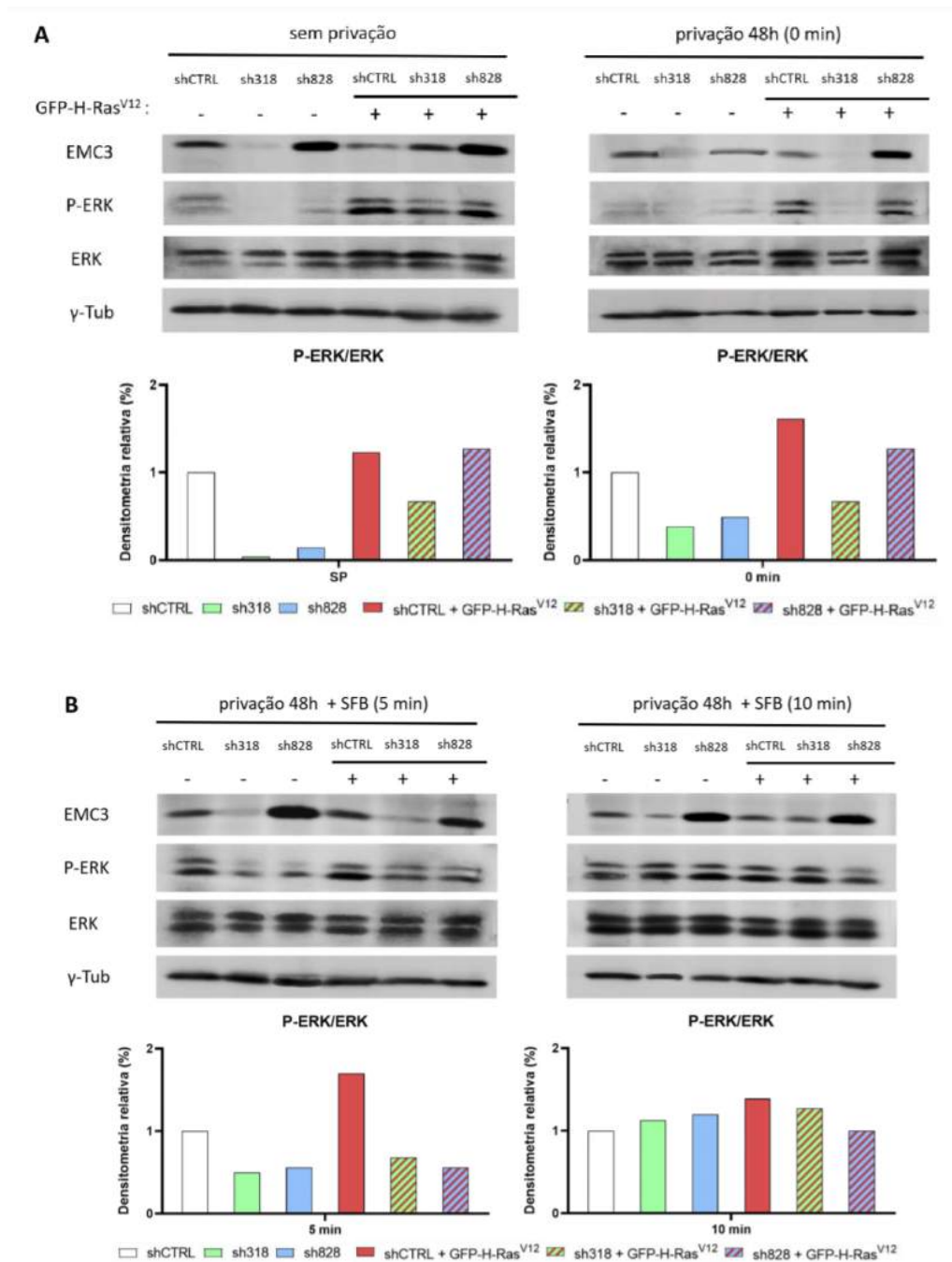


Figura 8: O silenciamento de EMC3 interfere na ativação de ERK induzida por GFP-HRasV12. A-B: Detecção das proteínas EMC3, GFP-H-RasV12, ERK total (nativa), P-ERK (fosforilada) e γ -tubulina como loading control. O sinal (+) e (-) indicam, respectivamente, células transfectadas e não transfectadas para expressão de GFP-HRasV12. A densitometria óptica relativa (razão P-ERK/ERK) normalizada para o grupo shCTRL e os tratamentos são divididos em SP e 0 min (A) e 5 min e 10 min (B) para melhor visualização. SFB: soro fetal bovino. SP: sem privação.

5.5. Ensaio Clonogênico

Os mesmos grupos de células utilizados no Western Blot foram analisados no ensaio clonogênico. As células foram cultivadas em placas de 35 mm de diâmetro em baixa densidade inicial (cerca de 500 células por placa), de maneira a distribuir as células para que essas fiquem isoladas. A capacidade clonogênica foi calculada a partir da quantificação das unidades formadoras de colônias após 8 dias, como demonstrado abaixo (Figuras 13 e 14).

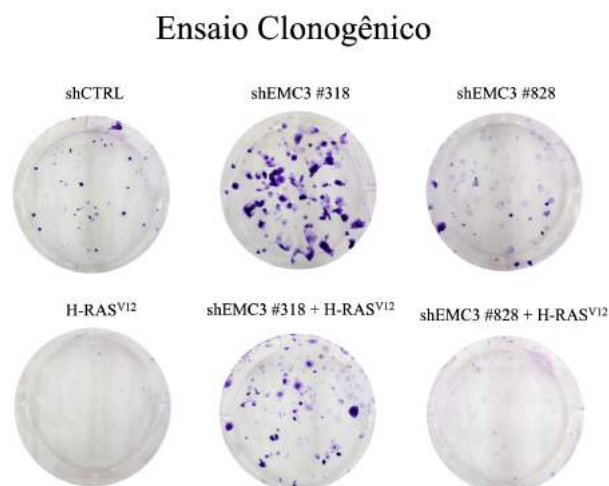


Figura 9: Aspecto das colônias formadas pelos genótipos estudados. As colônias foram coradas com solução de cristal violeta 0,5%.

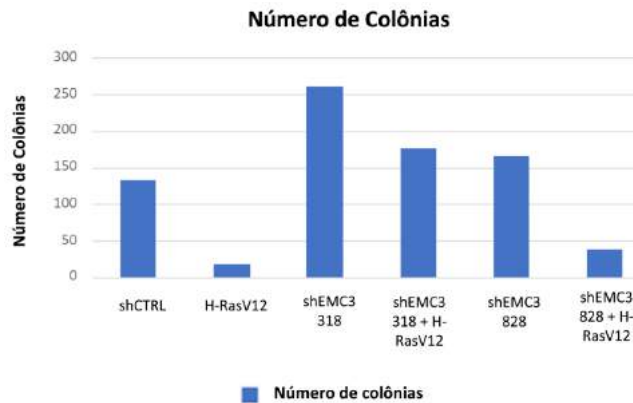


Figura 10: Número de colônias formadas pelos genótipos estudados. O maior número de colônias foi encontrado no grupo que recebeu somente o silenciador #318. Poucas colônias foram identificadas quando houve transfecção apenas de GFP-H-RAS V12, muito possivelmente em decorrência da desaderência de tais células. A mesma desaderência pode ter ocorrido no grupo em que se realizou transfecção e transdução do silenciador #828, principalmente, levando em conta o nível de silenciamento menos efetivo de EMC3 nesse caso.

6. DISCUSSÃO

As moscas adultas de genótipo GMR-GAL4 X UAS-RASV12; UAS- RNAi-EMC3 apresentam fenótipo normal do olho em sua maioria. Durante a transição entre L2 e L3, ocorre o evento de onda mitótica no disco imaginal da larva. Assim, há alta proliferação celular no disco imaginal, o que envolve a ativação de vias endógenas de crescimento, como a via de Ras. Uma temperatura mais alta (25°C) permite uma expressão ainda maior de Ras, via GAL4, agora envolvendo uma Ras mutada (a RasV12). Além disso, uma maior temperatura permitiria o silenciamento efetivo de EMC3, também via aumento de expressão de GAL4 em um momento crítico do desenvolvimento do disco imaginal do olho.

O ensaio de RT-qPCR valida a superexpressão de RAS e silenciamento de EMC3. Confirmamos a superexpressão de RasV12 nos animais em que a proteína foi ativada pelo sistema UAS-GAL4. Ademais, pudemos comprovar o silenciamento da proteína EMC3 nos grupos que receberam o silenciador, comparando os níveis de expressão dessa proteína nos grupos com RNAiEMC3 em relação aos níveis no grupo controle.

No ensaio de Western Blot, os resultados indicam, como esperado, que o silenciamento de EMC3 (sh318 e sh828) em condições normais (sem privação) é capaz de inibir a ativação da via MAPK induzida pela Ras endógena. Em condições de privação, a ativação da via pela Ras endógena é inicialmente basal (T0), tanto nas células shCTRL como nas silenciadas. No entanto, a fosforilação de P-ERK começa a ser

detectada após 5 minutos de reindução da via, sendo restabelecida aos 10 minutos, o que mostra que, sob reindução da via MAPK por SFB após privação, o silenciamento de EMC3 é capaz de inibir a ativação de ERK pelo menos até 5 minutos. Ao avaliar o efeito aditivo da Ras exógena oncogênica (GFP-H-RasV12) com a Ras endógena, também como esperado, a Ras oncogênica ativa a via MAPK independente da privação de mitógenos, e a mesma resposta inibitória da ativação da via MAPK se mantém com o silenciamento efetivo do sh318. Adicionalmente, é inevitável notar que as células sh828 passaram a apresentar níveis aumentados de EMC3, o que, curiosamente, também resultou em um comprometimento parcial da ativação de P-ERK, similar ao silenciamento das células sh318, embora menos consistente.

Com base nas imagens geradas pela Microscopia de Epifluorescência, pode-se observar que a marcação de GFP-H-RASV12 nas células superexpressando essa molécula e um sh controle (shCTRL) inespecífico delimita os limites das células, concentrando-se nas imediações da membrana celular. O mesmo não ocorre nas células coexpressando GFP-H-RASV12 juntamente com um shRNA-EMC3, nas quais a fluorescência da GFP-H-RASV12 é mais fortemente percebida concentrada em regiões do citoplasma. As células com um shRNA controle apresentaram ausência de marcadores GFP no citoplasma e ausência de mudança fenotípica após a transfecção com shCTRL. Os resultados apresentados aqui evidenciam que, com o silenciamento de EMC3, a localização da proteína H-RasV12 no interior da célula é alterada: ela não mais se mantém principalmente associada à membrana plasmática (onde participa da ativação da via de sinalização celular Ras-Raf-MEK-ERK) e, sim, concentrada no citoplasma da célula.

Por fim, analisamos o Ensaio Clonogênico. Como ponto de partida, observamos o crescimento das células transfectadas com vetor carregando o transgene GFP-H-RASV12, relacionando-o com o número de colônias observado no grupo controle (transfectadas com shCTRL). Ao observar o gráfico e a imagem, as células-controle demonstraram crescimento considerável, apresentando um número de colônias próximo do visto no grupo com células transduzidas com o silenciador shEMC3 #828. Em contraponto, percebe-se a quase ausência de colônias formadas quando a via de RAS mutada é ativada na célula. Esse fato, à primeira vista contraditório, poderia ser explicado pelas características da transformação maligna: uma vez transformadas, as células tendem a desaderir, permanecendo e proliferando independente de ancoragem em suspensão no meio de cultura. Embasa essa análise o recém-publicado artigo de Marquez, 2020, segundo o qual o complexo EMC (e, mais especificamente, a subunidade EMC1) estaria relacionado à sinalização da via WNT: de acordo com os autores, as EMCs seriam essenciais para o correto enovelamento dos receptores transmembrana da família Frizzled (principalmente FZD2 e FZD7), os quais se ligam à WNT, iniciando a ativação da via. Assim, pode-se inferir que, ao silenciarmos um componente do complexo EMC, a via WNT, essencial para a adesão da célula e para a manutenção de sua polaridade normal, é alterada, levando à desaderência das células e ao crescimento independente de ancoragem. Ao

produzir-se, então, o lisado da monocamada localizada ao fundo da placa de cultura, poucas células são encontradas e, por conseguinte, tem-se um efeito dilucional da amostra. Se observarmos comparativamente a proliferação das células transduzidas com o silenciador shEMC3 #828 e o crescimento daquelas com tal silenciador somado ao transgene GFP-H-RAS V12, é possível ver, em menor grau, o mesmo efeito de desaderência: as células apenas com o silenciador apresentam um maior número de colônias do que as unidades com o silenciador e o transgene mutado. Tal fato pode ser explicado pelo menor grau de silenciamento da proteína EMC3 gerado pelo sh#828, como já discutido. Por fim, ao visualizar o crescimento das células transduzidas com o silenciador shEMC3 #318, observa-se que há uma redução do número de colônias em relação a essas mesmas células quando transfectadas com GFP-H-RAS V12, possivelmente pois a via de Ras ainda gera a desaderência de algumas células e/ou porque a taxa proliferativa das células sh318 na presença de RasV12 diminui. Não obstante, são geradas mais colônias e ocupada mais área em relação ao grupo controle. Isso, juntamente com a comprovação do eficaz silenciamento da proteína EMC3 produzido por esse silenciador e os dados acima relatados, reforça a hipótese discutida de que, ao silenciar a subunidade EMC3, a ativação da via de RAS- MAPK é comprometida.

7. CONCLUSÃO

Os resultados aqui apresentados reforçam a hipótese de que EMC3 atua como co-chaperona das oncoproteínas Ras e/ou como assessora para metil e/ou lipídio transferases.

8. REFERÊNCIAS

- Abkhezr, M., Keramati, A. R., Ostad, S. N., Davoodi, J. and Ghahremani, M. H.** (2010). The time course of Akt and ERK activation on XIAP expression in HEK 293 cell line. *Mol. Biol. Rep.* 37, 2037–2042.
- Ahearn, I., Zhou, M. and Philips, M. R.** (2018). Posttranslational Modifications of RAS Proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 8, 1–18.
- Anghel S. A., McGilvray P. T., Hegde R. S. and Keenan R. J.** (2017). Identification of Oxa1 homologs operating in the eukaryotic endoplasmic reticulum. *Cell Rep* 21, 3708-3716.
- Barlowe, C. K. and Miller, E. A.** (2013). Secretory protein biogenesis and traffic in the early secretory pathway. *Genetics* 193, 383–410.
- Chitwood, P. J., Juskiewicz, S., Guna, A., Shao, S. and Hegde, R. S.** (2018). EMC Is Required to

Initiate Accurate Membrane Protein Topogenesis. *Cell* 1–13.

Christianson, J. C., Olzmann, J. A., Shaler, T. A., Sowa, M. E., Bennett, E. J., Richter, C. M., Tyler, R. E., Greenblatt, E. J., Wade Harper, J. and Kopito, R. R. (2012). Defining human ERAD networks through an integrative mapping strategy. *Nat. Cell Biol.* **14**, 93–105.

Costanzo, M., Baryshnikova, A., Bellay, J., Kim, Y., Spear, E. D., Sevier, C. S., Ding, H., Koh, J. L. Y., Toufighi, K., Mostafavi, S., et al. (2010). The genetic landscape of a cell. *Science (80-)*. **327**, 425–431.

Downward, J. (2003). Targeting RAS signaling pathways in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, **3**, 11-22.

Ellgaard, L. and Helenius, A. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 181–191.

Fagone, P. and Jackowski, S. (2009). Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function. *J. Lipid Res.* **50**, S311–S316.

Guna A, Volkmar N, Christianson JC, Hegde RS (2017). The ER membrane protein complex is a transmembrane domain insertase. *Science*. 2018 Jan 26;359(6374):470-473. doi: 10.1126/science.aao3099. Epub 2017 Dec 14. PMID: 29242231; PMCID: PMC5788257.

Hanaki H, Yamamoto H, Sakane H, Matsumoto S, Ohdan H, Sato A, et al (2012). An anti-Wnt5a antibody suppresses metastasis of gastric cancer cells in vivo by inhibiting receptor-mediated endocytosis. *Mol Cancer Ther.* 2012 Feb;11(2):298-307.

Hobbs, G. A., Der, C. J. and Rossman, K. L. (2016). CELL SCIENCE AT A GLANCE ARTICLE SERIES: CELL BIOLOGY AND DISEASE RAS isoforms and mutations in cancer at a glance. *J. Cell Sci.* **129**, 1287–1292.

Jonikas, M. C., Collins, S. R., Denic, V., Oh, E., Quan, E. M., Schmid, V., Weibezahn, J., Schwappach, B., Walter, P., Weissman, J. S., et al. (2009). Comprehensive characterization of genes required for protein folding in the endoplasmic reticulum. *Science (80-)*. **323**, 1693–1697.

Li, Y., Zhao, Y., Hu, J., Xiao, J., Qu, L., Wang, Z., Ma, D. and Chen, Y. (2013). A novel ER-localized transmembrane protein, EMC6, interacts with RAB5A and regulates cell Autophagy. *Autophagy* **9**, 150–163.

- Lockshon D, Surface LE, Kerr EO, Kaeberlein M, Kennedy BK.** (2007). The sensitivity of yeast mutants to oleic acid implicates the peroxisome and other processes in membrane function. *Genetics* **175**:77–91
- Malumbres, M., Barbacid, M.** (2003). RAS oncogenes: the first 30 years. *Nature Reviews Cancer* **3**, 459–465
- Marquez J, García-Castro MI, Khokha MK** (2020). Disrupted ER membrane protein complex-mediated topogenesis drives congenital neural crest defects. *J Clin Invest.* 2020;130(2):813-826. <https://doi.org/10.1172/JCI129308>.
- Prior, L. and M.** (2012). A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res.* **72**, 2457–2467.
- Richard, M., Boulin, T., Robert, V. J. P., Richmond, J. E. and Bessereau, J.-L.** (2013). Biosynthesis of ionotropic acetylcholine receptors requires the evolutionarily conserved ER membrane complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, E1055–E1063.
- Roskoski R. Jr.** (2012) ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacological Research*, 66, 105-143.
- Shojima K, Sato A, Hanaki H, Tsujimoto I, Nakamura M, Hattori K, et al** (2015). Wnt5a promotes cancer cell invasion and proliferation by receptor-mediated endocytosis-dependent and -independent mechanisms, respectively. *Sci Rep.* 2015 Jan;5:8042
- Tong, J., Taylor, P. and Moran, M. F.** (2014). Proteomic Analysis of the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Interactome and Post-translational Modifications Associated with Receptor Endocytosis in Response to EGF and Stress. *Mol. Cell. Proteomics* **13**, 1644–1658.
- Wang F, Chan C, Weir NR, Denic V.** (2014) The Get1/2 transmembrane complex is an endoplasmic-reticulum membrane protein insertase. *Nature.* **512**:441–444.