

Minicurso 02

Cultura de Células e Análise da Expressão de Proteína de Reparo

Laboratório: Laboratório de Organização Funcional do Núcleo – LORF (Bloco B36/ Sala 01)

Docente responsável: Prof^aDr^aMaria Aparecida Fernandez

Ministrantes: Anelise Cardoso Ramos, Fabiana dos Santos Rando, Francisco Ferreira Duarte Junior, José Renato Pattaro Júnior, Lorena Gomes Polizelli, Quirino Alves de Lima Neto, Sabrina Marques Godinho Kelmer.

INTRODUÇÃO

Cultura de Células

O cultivo de células se iniciou no princípio do século XX com Harrison, em 1907, e Carrel, em 1912. Essa técnica foi desenvolvida como um método para estudar o comportamento de células animais fora do organismo, em um meio ambiente controlado. Essa técnica ainda é uma importante ferramenta de pesquisa nos laboratórios do mundo inteiro.

Em 1951, George Gey cultivou células de tecido tumoral humano estabelecendo a linhagem HeLa, utilizada até hoje em todo o mundo. O fato de que tumores humanos poderiam dar origem a células contínuas em linhagem aumentou o interesse pelo cultivo de tecidos.

Muitas outras linhagens foram estabelecidas pelos pesquisadores. Atualmente, a cultura de células não se limita ao estudo do comportamento de determinado tecido ou célula *in vitro*. Seu uso se estende pela medicina, pois células em cultivo têm importante papel no tratamento de doenças degenerativas. Para a terapia celular, as pesquisas com células-tronco são um marco nessa área que, de ferramenta para outros estudos, tornou-se a protagonista do desenvolvimento tecnológico mundial.

Tipos de culturas

Células em cultivo são um modelo de função fisiológica muito contraditório, devido à perda de características que ocorre durante o seu desenvolvimento em cultura. A proliferação *in vitro* difere daquela *in vivo*. Apesar disso, ainda existem muitas vantagens no uso de cultura de células como modelo experimental. O controle do ambiente, a homogeneidade da amostra, quando comparada ao uso de animais em experimentos, e a economia são as principais vantagens dessa técnica. Atualmente, com a implementação das Comissões de Ética de Uso de Animais em Pesquisa (CEUA), a cultura de células é o principal modelo alternativo para a substituição dos animais em

experimentos de pesquisa. Células primárias, células estabelecidas e células transformadas.

Uma cultura primária é estabelecida a partir do crescimento de células oriundas de um fragmento de tecido obtido por desagregação mecânica ou enzimática. As células que conseguem sobreviver ao processo de desagregação e aderirem à garrafa formarão a primeira monocamada de células daquele tecido. Essas células possuem as características do tecido de origem, podem crescer em cultura por um determinado período de tempo e são denominadas **células primárias**. Essa forma de cultivo é a mais utilizada para estudar o comportamento de determinada célula *in vitro* devido à presença de suas características genótípicas e fenotípicas. As células primárias que conseguem manter suas características originais possuem um tempo de vida curto.

Á medida que a cultura é repicada, as células com uma maior capacidade de proliferação irão predominar na garrafa de cultivo em detrimento das células que não se adaptaram bem ao cultivo ou que, devido a traumas do processo de desagregação, não possuem uma taxa normal de proliferação. Essas células ainda não perderam as características do tecido de origem, mas possuem alta proliferação. Esse tipo de célula é chamado linhagem celular contínua ou **linhagem celular estabelecida**, e é muito utilizado em pesquisa, pois pode ser mantido em cultura por um grande período de tempo (quando comparado às células primárias) e ainda guarda grande parte das características do tecido original. Muitas linhagens celulares contínuas podem ser propagadas sem perder suas características por até oitenta passagens, além de serem euploides, ou seja, possuem um número de cromossomos múltiplo do número original da espécie. Essas células são muito utilizadas em pesquisa e na produção de vacinas.

No momento em que as características genéticas das células são modificadas, elas deixam de ser semelhantes morfológica e geneticamente ao tecido original e são então chamadas **células transformadas**. Tais células podem ser transformadas em cultura utilizando-se substâncias químicas, vírus ou agentes físicos como a luz ultravioleta. A transformação celular é uma alteração genética que permite mutações em genes responsáveis pelo controle do ciclo celular (proto-oncogenes e genes supressores de tumor). As células transformadas também podem ser obtidas diretamente de tecidos já mutados, como é o caso de tecidos tumorais. O exemplo mais famoso desse tipo de célula são as células HeLa oriundas de um tumor de cérvix uterina humana. As células HeLa são células genética e morfológicamente diferentes do tecido original, e não possuem dependência de ancoragem nem inibição por contato, além de serem capazes de proliferar infinitamente quando em cultura. Essas células são muito utilizadas em estudos de citotoxicidade, controle de qualidade, entre outros.

Células aderentes e células não aderentes

As células cultivadas podem apresentar dois aspectos distintos, isto é, podem ser aderentes ou não aderentes, o que significa dizer que algumas células poderão se ligar ao fundo da garrafa de cultura enquanto outras ficarão em suspensão no meio. As células aderentes são oriundas de tecidos duros e, por isso, são dependentes de ancoragem, ou seja, necessitam de adesão a uma superfície de contato para que possam iniciar a sua proliferação. As células não aderentes podem ser cultivadas em suspensão no meio e são derivadas de tecidos que não necessitam de ancoragem para proliferar e sobreviver. Essa capacidade está restrita às células hematopoiéticas, às linhagens transformadas ou às células de tecido tumoral.

Manutenção das culturas

O processo de renovação de células de uma garrafa para outra é chamado passagem. O número de passagens se refere ao número de vezes que essa cultura foi subcultivada. Muitas linhagens contínuas são capazes de manter as características iniciais do tecido original com algumas passagens, enquanto as células transformadas não mantêm as características originais e são capazes de permanecer em cultura por um grande número de passagens (chegando até virtualmente ao infinito número de passagens).

As células em cultura geralmente são congeladas em nitrogênio líquido em uma temperatura de -196°C . Nessa temperatura, todas as reações bioquímicas nas células ficam paralisadas impedindo qualquer alteração na cultura criopreservada. Crioprotetores são substâncias que, sob diferentes mecanismos moleculares, tornam a membrana das células protegidas dos cristais. Os crioprotetores mais utilizados são o glicerol e o dimetilsulfóxido (DMSO).

O descongelamento geralmente ocorre de forma rápida. Simplesmente retira-se a ampola do tanque de nitrogênio líquido e coloca-se ela em água a 37°C imediatamente. Os procedimentos de congelamento e descongelamento são os mesmos para as células aderentes e para as não aderentes.

Meios de cultura são soluções utilizadas em cultivos celulares. Os meios nutritivos (meios de cultura ou de cultivo) utilizados para a cultura de células, tecidos e órgãos fornecem as substâncias essenciais para o crescimento e controlam o crescimento *in vitro*. As mesmas vias metabólicas e bioquímicas básicas no organismo são consideradas nas células cultivadas. Complementando as substâncias biossintetizadas pelas células, vários compostos orgânicos são adicionados ao meio para suprir as necessidades metabólicas, energéticas e estruturais específicas das células. Sendo assim, os meios de cultura devem apresentar em sua formulação sais minerais, hidratos de carbono, aminoácidos, vitaminas, proteínas, peptídeos, lipídeos e ácidos graxos. Costuma-se adicionar também soros, tampões, antibióticos e indicadores de pH. Os meios de cultivo foram estabelecidos a partir de 1950, com várias formulações de meios que proporcionassem o crescimento celular *in vitro*.

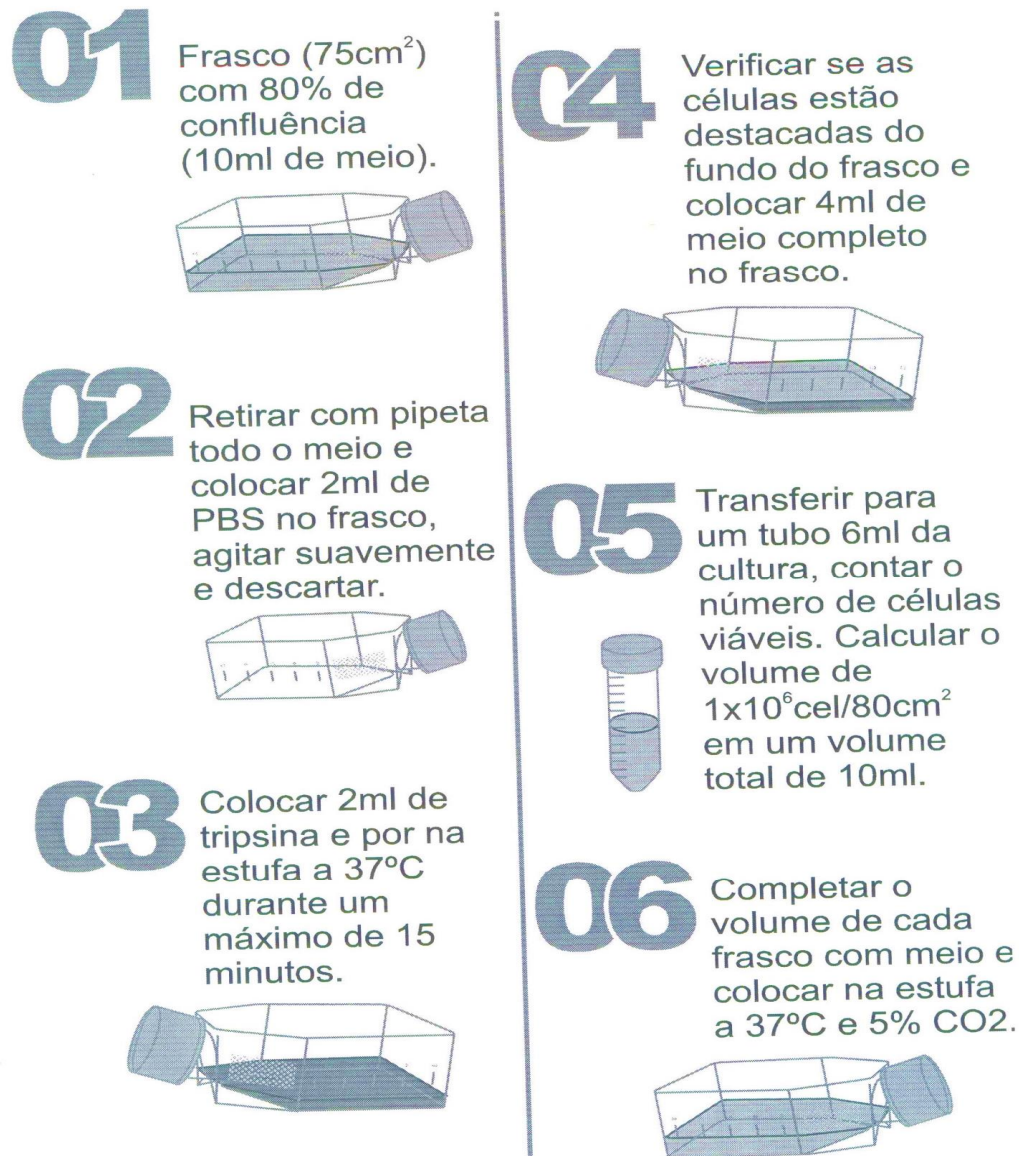


Figura 1. Esquema do procedimento de passagem e cultivo de células.

A Proteína kin17

A proteína kin17 foi descoberta em 1989 em cultura de células da linhagem FR 3T3 de rato, devido à reação cruzada com anticorpos policlonais dirigidos contra a proteína RecA de *Escherichia coli* (Angulo *et al.*, 1989), a qual participa do reparo recombinacional do DNA e na regulação de genes da resposta SOS. Tal resposta acontece na presença de grande quantidade de danos letais no DNA, resultando na ativação de aproximadamente 20 genes envolvidos no reparo e na recombinação do DNA (Anderson e Kowalczykowski, 1998). Tal reação cruzada ocorre devido à presença de uma região conservada de 40 aminoácidos (posições 162-201) que apresenta homologia de 49% com a extremidade C-terminal da RecA, a qual atua na regulação da ligação ao DNA (Angulo *et al.*, 1991). Adicionalmente, a kin17 apresenta um sinal de localização nuclear (NLS, Figura 2) e um motivo dedo de zinco de ligação ao DNA, ambos homólogos àqueles observados na proteína de reparo poli(ADP-ribose)

polimerase (PARP) (Mazinet *et al.* 1994). Recentemente, um motivo KOW foi identificado entre os aminoácidos 330 e 363, sendo confirmado por análise de cristalografia da extremidade C-terminal da kin17 (le Maire *et al.*, 2006). Tais motivos estão relacionados com interações proteína-RNA e proteína-proteína nos processos de metabolismo do RNA (Steiner *et al.*, 2002).

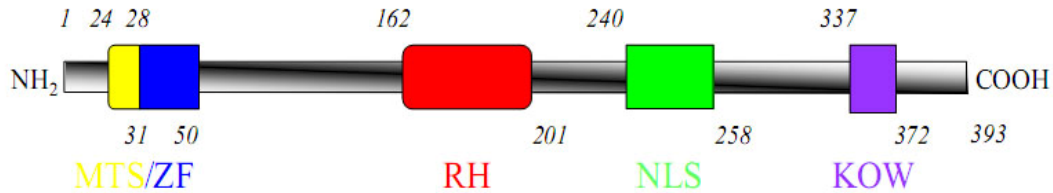


Figura 2 - Domínios funcionais da proteína kin17: MTS (sinal putativo de localização mitocondrial); ZF (dedo de zinco); RH (domínio de homologia a proteína RecA de *E. coli*); NLS (sinal de localização nuclear); KOW (motivo KOW).

O gene KIN17 está situado no cromossomo 2 em murinos e no braço curto do cromossomo 10 em humanos, codificando para uma proteína de aproximadamente 45 kDa e ponto isoelétrico de 9,3 (Angulo *et al.*, 1991; Kannouche *et al.*, 2000). O gene é conservado filogeneticamente em eucariotos, visto que foram identificados ortólogos em organismos diversos como o vegetal *Arabidopsisthaliana*, o inseto díptero *Drosophilamelanogaster*, o nematóide *Brugiamalayi* e a levedura *Schizosaccharomycespombe* (Despraset *et al.*, 2003). Uma série de estudos identificaram o papel da kin17 em processos nucleares, principalmente na replicação e no reparo do DNA. Células transfectadas com RNA antisense da kin17, apresentando assim baixos níveis da proteína, apresentam taxa reduzida de síntese de DNA, acúmulo na fase S e são mais sensíveis à mutagênese (Biardet *et al.*, 2002; Despraset *et al.*, 2003). Em contrapartida, a superexpressão da proteína resulta em inibição da proliferação celular (Kannouche e Angulo, 1999), indicando que o nível da expressão da kin17 deve ser estritamente regulado para o funcionamento adequado do ciclo celular. Agentes mutagênicos como radiação ionizante e luz ultravioleta induzem uma resposta tardia da kin17, resultando em aumento da expressão e alteração da localização nuclear (Kannouche *et al.*, 2000; Biardet *et al.*, 2002). Recentemente, foi constatado que a kin17 está associada ao complexo multiprotéico de replicação do DNA, em conjunto com outras proteínas como a RPA70 (human replication protein A), PCNA (proliferating cell nuclear antigen) e DNA polimerase α . Além disso, tal proteína associa-se diretamente a certas regiões de origens de replicação. Complexos multiprotéicos isolados de células HeLa (provenientes de carcinoma cervical humano) capazes de realizar replicação do DNA *in vitro* apresentam atividade reduzida quando a kin17 é inibida por imunodepleção (Miccoliet *et al.*, 2005). Em muitas linhagens celulares derivadas de tumores, foi constatado um alto nível de expressão da kin17 (Kannouche *et al.*, 2000; Despraset *et al.*, 2003), assim como em tecidos tumorais de pacientes de câncer de mama (Zeng *et al.*, 2011). Este último estudo apontou que a kin17 pode ser um potencial alvo no tratamento desse tipo de câncer, e correlacionou a expressão dessa proteína com fatores de regulação do ciclo celular, como a ciclina D1 e o ERK1/2 (extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2). Os dados obtidos até o momento sugerem que a kin17 pode atuar como um elo de ligação entre processos de replicação e reparo do DNA, impedindo a parada do ciclo celular devido a presença de lesões não reparadas no DNA. Além disso, a proteína kin17 também é parte do spliceossomo

(Rappsilberet *al.*, 2002) e pode ser capaz de se associar diretamente a moléculas de mRNA durante a espermatogênese, demonstrando que a proteína apresenta um papel no processamento do RNA. Tais processos podem ser regulados pela presença do motivo KOW (Pinon-Latailladeet *al.*, 2004).

Matriz nuclear

As sequências denominadas S/MARs (SARs, *ScaffoldAttachmentRegions* ou MARs, *Matrix AttachmentRegions*) são constituídas de algumas centenas de bases e a sua associação é resultante da interação com proteínas que promovem a associação do DNA à matriz nuclear (Laemmliet *al.*, 1992). MARs compreendem uma das poucas classes de DNA não-codificante eucariótica com uma função caracterizada experimentalmente, por estar envolvida na ligação da cromatina à matriz nuclear, à remodelação da cromatina e regulação da transcrição (Glazkoet *al.*, 2003).

A cromatina eucariótica é organizada como loops independentes (Henget *al.*, 2001), os quais são essenciais para a replicação do DNA, regulação da transcrição e empacotamento cromossômico. A formação de cada loop é dependente de um segmento de cromatina específico que deve funcionar como uma âncora para a matriz nuclear, facilitado pelas sequências S/MARs (Henget *al.*, 2004).

Em 1974, uma preparação baseada em extrações do núcleo foi publicada, introduzindo o termo “matriz nuclear” para a estrutura residual após as extrações salinas. Este resultado sugeriu que o núcleo é composto de proteínas específicas, as quais formam uma rede estrutural que mantém a forma nuclear (Berezney e Coffey, 1974). Matriz nuclear é então, uma estrutura fibrogranular resultante da extração em alta concentração salina ou com detergentes como o LIS (3,5 diiodosalicilato de lítio). A observação de matrizes sem a remoção de parte do DNA pela digestão com nucleases de restrição apresenta uma figura em halo causada pela liberação das alças do DNA (Gerdeset *al.*, 1994), e a remoção do DNA associado revela uma matriz nuclear que consiste em lamina nuclear e uma matriz interna.

Matriz nuclear é a rede de fibras encontradas em todo o interior do núcleo de uma célula, um tanto análoga ao citoesqueleto celular (Pederson, 2000) e possui uma identidade estrutural muito dinâmica no núcleo, fornecendo locais para o controle específico da síntese e transcrição do DNA e de partículas de transportes (Radulescu e Cleveland, 2010; Simon e Wilson, 2011; Pientaet *al.*, 1989).

Essa estrutura foi descrita pela primeira vez por Berezney e Coffey (1974) e é associada na organização da cromatina na interfase nuclear. Consequentemente, essas mudanças a nível morfológico podem refletir alterações nas proteínas de matriz a nível molecular (Miller *et al.*, 1992).

As características morfológicas do núcleo celular têm sido muito utilizadas por patologistas para o diagnóstico clínico de câncer, e a matriz nuclear da célula, é conhecida por refletir essas características em relação ao tipo celular e de câncer (Catapanoet *al.*, 1996).

Western Blotting

O *western blotting* localiza, com o uso de anticorpos específicos, proteínas que foram previamente separadas através de eletroforese em gel. O *blot* utiliza membranas,

normalmente nitrocelulose. O gel é colocado em contato com a membrana, e a aplicação de uma corrente elétrica força as proteínas a se moverem do gel para a membrana e se aderirem a ela. A membrana então, é uma réplica do padrão de proteínas no gel, e é subsequentemente corada com corante de Ponceau-S e incubada com anticorpos específicos que irão se ligar às proteínas de interesse e localizá-la entre as demais proteínas.

PROTOSCOLOS

Extração de proteínas da matriz nuclear

- Coletar as células com raspadores estéreis e centrifugar a 2000 rpm e 4°C por 5 minutos para a retirada do meio;
- Ressuspender o pellet em 5 mL de CWB sem digitonina e com EDTA;
- Centrifugar por 5 minutos a 2000 rpm e 4°C;
- Ressuspender em tampão CWB com EDTA e digitonina;
- Transferir a solução do tubo e homogeneizar em doucer (gelado);
- Passar a solução em seringa de 5 mL com agulha 21G1;
- Passar 4 mL da solução de núcleos no colchão de glicerol (250 uL de glicerol em 2 mL de CWB com EDTA e digitonina);
- Centrifugar por 10 minutos a 2000 rpm;
- Ressuspender o pellet em 500 uL de CWB sem EDTA e com digitonina;
- Separar 100 uL desta solução (núcleos totais);
- Adicionar aos 400 uL restantes, 4 mL de CWB sem EDTA e sem digitonina e 2,67 uL de CuSO₄;
- Incubar por 20 minutos a 4°C;
- Injetar 5 mL da solução LIS com seringa e agulha 21G1 e incubar por 5 minutos à temperatura ambiente;
- Centrifugar por 10 minutos a 1800 rpm;
- Ressuspender o precipitado (proteínas associadas à matriz) em 50 uL de redloading e incubar com 0,4 µl de BenzodaseNuclease (≥ 250 units/µL).

Fracionamento de cromatina

(Mendez and Stillman, 2000. Molecular and cellular biology, 20: 8602-8612)

- Usar aproximadamente 7×10^6 células/mL.
- Lavar com 5 mL de PBS 1X.
- Ressuspender as células em 250 µL Buffer A + inibidor de protease 4,5 µL.

- Adicionar Triton X-100 com concentração final de 0.1% (5% μ L de uma solução de 5%).
- Incubar por 5 minutos no gelo.
- Centrifugar por 4 minutos, 1300g (3.800 rpm) a 4°C.
- Retirar o sobrenadante e armazenar (fração citoplasmática de proteínas) – **S1**.
- O pellet é a fração nuclear.
- Lavar o P1 com 200 μ L de Buffer A.
- Centrifugar 4 minutos, 1300g a 4°C.
- Retirar o sobrenadante e armazenar – **S1a**.
- Lise dos núcleos com 175 μ L de Buffer B + inibidor de protease 3,5 μ L.
- Incubar por 10 minutos no gelo.
- Centrifugar por 4 minutos, 1700g (4306 rpm) a 4°C.
- Retirar o sobrenadante e armazenar – fração de proteínas nucleares solúveis – **S2**.
- O pellet é a cromatina – **P2**.
- Ressuspender com 175 μ L do Buffer B, cuidadosamente.
- Centrifugar 1 minuto, 10.000g (10444 rpm) a 4°C.
- Ressuspender em 150 μ L de tampão de amostra para proteínas ou PBS 1X, pH 7,4 com DTT 1mM + inibidor de protease.
- Adicionar 1 μ L Benzonase e incubar por 30 a 60 minutos à temperatura ambiente.
- Ferver a 95°C, 5 minutos para inativar a ação da enzima.
- Realizar gel de poliacrilamida para DNA para visualizar as frações obtidas.

Western Blot

- Preparar os géis utilizando uma solução de acrilamida/bis-acrilamida na proporção de 29:1%;

Gel de empilhamento (5%):

- 500 μ L de acrilamida
- 420 μ L de Tris-HCl 1M
- 30 μ L de SDS 10%
- 3 μ L de TEMED
- dH₂O q.s.p. 3mL
- 55 μ L de Persulfato de Amônio 10%

Gel de corrida (10%):

- 1,97mL de acrilamida
- 1,56mL de Tris-HCl 1M
- 60 μ L de SDS 10%
- 2,57 μ L de TEMED
- dH₂O q.s.p. 6mL
- 85 μ L de Persulfato de Amônio 10%

- Incubar as amostras a 95°C por 5min e, aplicar no gel de separação eletroforética;
- Realizar a eletroforese a 100 volts por 90 minutos;
- Transferir as proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose por 40 minutos a 70v e 20 minutos a 100v;
- Avaliar a eficiência da eletrotransferência pela coloração das membranas com o corante Ponceau-S.
- Remover o corante por sucessivas lavagens com TBS-T 1X;
- Realizar o bloqueio com solução de bloqueio (com leite em pó Molico desnatado em TBS-T 1X), por 1 hora, sob agitação a temperatura ambiente;
- Realizar a detecção utilizando anticorpo anti-kin17 K58 (SC-32769 - Santa Cruz Biotechnology) a uma diluição de 1:5000 em solução de bloqueio durante 16 horas a 4°C;

- Lavar a membrana 3X de 5 minutos, com TBS-T 1X;
- Diluir o anticorpo secundário (goatanti-mouse HRP Dako, P0447) a uma diluição de 1:10000;
- Incubar por 1 hora, sob agitação, à temperatura ambiente;
- Revelar a membrana utilizando o kit ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare), e o equipamento GE Imagem Quant LAS 500.

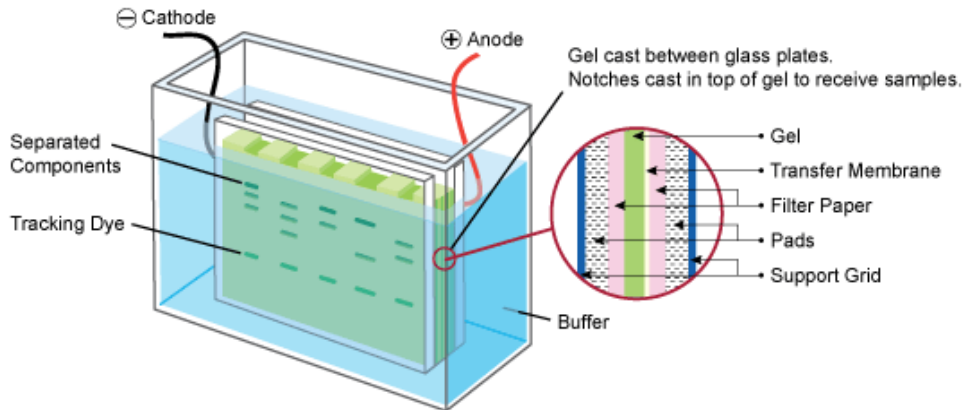


Figura 3. Esquema para preparo de *Western Blot*.

REFERÊNCIAS

- Anderson, D. G.; Kowalczykowski, S. C. Reconstitution of an sos response pathway: derepression of transcription in response to dna breaks. *Cell* 95: 975-979, 1998.
- Angulo, J. F.; Moreau, P. L.; Maunoury, R.; Laporte, J.; Hill, A. M.; Bertolotti, R.; Devoret, R. Kin, a mammalian nuclear protein immunologically related to E. coli reca protein. *Mutation Research* 217: 123-134, 1989.
- Angulo, J. F.; Rouer, E.; Mazin, A.; Mattei, M. G.; Tissier, A.; Horellou, P.; Benarous, R.; Devoret, R. Identification and expression of the cDNA of kin17, a zinc-finger gene located on mouse chromosome 2, encoding a new dna-binding protein. *Nucleic Acids Research* 19: 5117-5123, 1991.
- Biard, D. S. F.; Miccoli, L.; Despras, E.; Frobert, Y.; Créminon, C.; Angulo, J. F. Ionizing radiation triggers chromatin-bound kin17 complex formation in human cells. *The Journal Of Biological Chemistry* 277: 19156-19165, 2002.
- Catapano CV, Carbone GMR, & Fernandes DJ. The nuclear matrix as a target for cancer therapy. *Annals of Oncology*. 1996; 7: 659-666.
- Despras, E.; Miccoli, L.; Créminon, C.; Rouillard, D.; Angulo, J. F.; Biard, D. S. F. depletion of kin17, a human dna replication protein, increases the radiosensitivity of rko cells. *Radiation Research* 159: 748-758, 2003.

- Gerdes M. G., Carter K. C., Moen .P. T. & Lawrence J.B. Dynamic changes in the higher-level chromatin organization of specific sequences revealed by in situ hybridization to nuclear halos. *J Cell Biol.* 1994; 126, 289-304.
- Glazko GV, Koonin EV, Ogozin IB, Shabalina SA. A significant fraction of conserved noncoding DNA in human and mouse consists of predicted matrix attachment regions. *Trends Genet.* 2003; volume 19, Issue 3, Pages 119-124.
- Heng HH, Krawetz SA, Lu W, Bremer S, Liu G. and Ye CJ. Re-defining the chromatin loop domain. *Cytogenet. Cell Genet.* 2001;93, 155-161.
- Heng HHQ, Goetze S, Ye CJ, Liu G, et al. Chromatin loops are selectively anchored using scaffold/matrix-attachment regions. *Journal of Cell Science.* 2004; 117, 999-1008.
- Kannouche, P.; Mauffrey, P.; Pinon-Lataillade, G.; Mattei, M. G.; Sarasin, A.; Daya-Grosjean, L.; Angulo, J. F. Molecular cloning and characterization of the human kin17 cDNA encoding a component of the uvc response that is conserved among metazoans. *Carcinogenesis* 21: 1701-1710, 2000.
- Laemmli UK, Käs E, Poljak L. & Adachi Y. Scaffold-associated regions: cis-acting determinants of chromatin structural loops and functional domains. *Curr Opin Genet Dev.* 1992;2, 275-85.
- Le Maire, A.; Schiltz, M.; Stura, E. A.; Pinon-Lataillade, G.; Couprie, J.; Moutiez, M.; Gondry, M.; Angulo, J. F.; Zinn-Justin, S. A tandem of sh3-like domains participates in rna binding in kin17, a human protein activated in response to genotoxics. *Journal Of Molecular Biology* 364: 764-776, 2006.
- Mazin, A.; Timchenko, T.; Murcia, J. M.; Schreiber, V.; Ângulo, J.; Murcia, G.; Devoret, R. Kin17, A mouse nuclear zinc finger protein that binds preferentially to curved Dna. *Nucleic Acids Research* 22: 4335-4341, 1994.
- Méndez J., Stillman B. (2000). Chromatin association of human origin recognition complex, cdc6, and minichromosome maintenance proteins during the cell cycle: assembly of prereplication complexes in late mitosis. *Mol Cell Biol.* 20(22): 8602–8612.
- Miccoli, L.; Frouin, I.; Novac, O.; Di Paola, D.; Harper, F.; Zannis-Hadjopoulos, M.; Maga, G.; Biard, D.S.; Angulo, J.F. The human stress-activated protein kin17 belongs to the multiprotein DNA replication complex and associates in vivo with mammalian replication origins. *Molecular and Cellular Biology*, 25: 3814-3830, 2005.
- Miller TE, Beausang LA, Winchell LF. Detection of nuclear matrix proteins in serum from cancer patients. *Cancer Res.* 1992; 52:422-427.
- Pederson T. "Half a century of "the nuclear matrix". *Mol. Biol. Cell.* 2000; 11(3):799–805. [PMC 14811](#). [PMID 10712500](#).
- Pienta KJ, Partin AW and Coffey DS. Cancer as a Disease of DNA Organization and Dynamic Cell Structure. *Cancer research.* 1989; 49, 2525-2532.

- Pinon-Lataillade, G.; Masson, C.; Bernardino-Sgherri, J.; Henriot, V.; Mauffrey, P.; Frobert, Y.; Araneda, S.; Angulo, J. F. Kin17 encodes an rna-binding protein and is expressed during mouse spermatogenesis. *Journal Of Cell Science* 117: 3691-3702, 2004.
- Radulescu AE & Cleveland DW. NuMA after 30 years: the matrix revisited. *Trends Cell Biol.* 2010;20, 214-22.
- Rappsilber, J.; Ryder, U.; Lamond, A. I.; Mann, M. Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. *Genome Research* 12: 1231-1245, 2002.
- Steiner, T.; Kaiser, J. T.; Marinkovic, S.; Huber, R.; Wahl, M. C. Crystal structures of transcription factor nusg in light of its nucleic acid- and protein-binding activities. *The Embo Journal* 21: 4641-4651, 2002.
- Zeng, T.; Gao, H.; Yu, P.; He, H.; Ouyang, X.; Deng, L.; Zhang, Y. Upregulation of kin17 is essential for proliferation of breast cancer. *PlosOne* 6, 2011.