

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA**

**MÔNICA MARIA MAGALHÃES CAETANO**

**AVALIAÇÃO DO SILENCIAMENTO DE SRPK POR CRISPR/Cas9 E DA  
INTERAÇÃO COM EFHD2 EM MELANOMA METASTÁTICO MURINO**

**VIÇOSA – MINAS GERAIS**

**2020**

**MÔNICA MARIA MAGALHÃES CAETANO**

**AVALIAÇÃO DO SILENCIAMENTO DE SRPK POR CRISPR/Cas9 E DA  
INTERAÇÃO COM EFHD2 EM MELANOMA METASTÁTICO MURINO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Gustavo Costa Bressan

Coorientadores: Juliana Lopes Rangel Fietto

Maria Roméria da Silva

Abelardo Silva Júnior

**VIÇOSA – MINAS GERAIS**

**2020**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

C128a  
2020  
Caetano, Mônica Maria Magalhães, 1993-  
Avaliação do silenciamento de SRPK por CRISPR/Cas9 e  
da interação com EFHD2 em melanoma metastático murino /  
Mônica Maria Magalhães Caetano. – Viçosa, MG, 2020.  
124 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Inclui apêndices.

Orientador: Gustavo Costa Bressan.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.101-117.

1. Proteínas quinases. 2. Melanoma. 3. Metástase.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica  
e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação em  
Bioquímica Aplicada. II. Título.

CDD 22 ed. 572.6

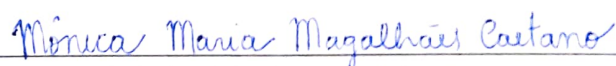
**MÔNICA MARIA MAGALHÃES CAETANO**

**AVALIAÇÃO DO SILENCIAMENTO DE SRPK POR CRISPR/Cas9 E DA  
INTERAÇÃO COM EFHD2 EM MELANOMA METASTÁTICO MURINO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção  
do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 28 de fevereiro de 2020.


Assentimento:



---

Mônica Maria Magalhães Caetano

Autora



---

Gustavo Costa Bressan

Orientador

## DEDICATÓRIA

A Deus.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por guiar minhas escolhas e estar sempre à frente no meu caminho. Pela saúde e força que recebo Dele diariamente e pelas oportunidades de me tornar uma pessoa melhor a cada dia.

A Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada por fornecerem a estrutura adequada para toda a minha formação profissional em Bioquímica.

A minha família, especialmente aos meus pais, Paulo e Célia, e minha irmã Mariana pelas orações, pelo apoio incondicional e por não medirem esforços para que eu alcance os meus objetivos na vida.

À minha avó Amélia e aos meus avós já falecidos, José Magalhães, José Mateus e Conceição por todo apoio, orações e incentivo. Vocês ensinaram à nossa família o grande valor da educação e sempre demonstraram o orgulho que sentiam ao verem seus filhos e netos alcançando grandes objetivos e chegando cada vez mais longe por meio dela.

Ao meu namorado, Ian, pelo amor, apoio, paciência e pela presença constante nos momentos felizes e tristes da vida.

Ao meu orientador, Gustavo Bressan, pela confiança e orientação ao longo desses anos. Por ensinar a todos, sempre com muita gentileza e paciência (quase infinita!), a confiarmos em nós mesmos e sermos pessoas mais otimistas acima de tudo.

Aos meus amigos querydas e querydos: Gabi, Janine, Flávia, Eloi, Victão, Ju Alves, Ju Ribeiro, Grazi, Roméria. Muito obrigada por toda ajuda, paciência e amizade. Foi muito bom comemorar os momentos felizes e também poder contar com o apoio de vocês nos momentos difíceis. Especialmente à Gabi e Roméria, por toda disponibilidade e ajuda, sempre. Vocês foram fundamentais nas etapas de planejamento e execução dos experimentos. Meus sinceros agradecimentos à Gabi, sobretudo pela ajuda com a execução dos experimentos *in vivo*, e também por todo apoio que recebi de você, uma pessoa tão alto astral, plena e feliz.

Aos amigos que, de perto ou de longe sempre comemoraram comigo os momentos felizes e me apoiaram nos momentos de dificuldade: Angélica, Túlio, Isadora, Vânia, Marcos, Patrícia, Ugo e Lorena. Especialmente à Angélica, pela paciência para ouvir minhas reclamações diárias e por estarmos sempre juntas comemorando as nossas conquistas. Também agradeço muito à minha amiga Patrícia, admirável pela sua inteligência, coragem e força. Muito obrigada pela ajuda com a realização dos experimentos na UFSCAR e pela troca de experiências ao longo do meu Doutorado.

Aos professores membros da banca examinadora: Tiago Mendes, Juliana Fietto, Felipe Teixeira e Leandro Licursi, pelas contribuições e pela disponibilidade ao me ajudarem sempre que eu recorri a vocês. Especialmente à professora Juliana Fietto, agradeço pelo empenho em tentar nos oferecer as melhores condições de trabalho possíveis nos laboratórios do nosso grupo de pesquisa, juntamente com os professores Gustavo Bressan e Raphael Vasconcellos.

Aos técnicos de laboratório, Dayse e Sr. Valdir, por toda ajuda e boa vontade, sempre. Vocês facilitam muito o nosso dia-a-dia e tornam o ambiente de trabalho mais agradável com as nossas conversas e brincadeiras.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica Celular e Bioprodutos (LBB), Laboratório de Infectologia Molecular Animal (LIMA) e outros laboratórios parceiros: Éverton, Raoni, Walmir, Nancy, Joice, Lethícia, Ju Leopoldo, Luciana, Duda, Adriana, Larissa, Renatão, Ruan, Gabi Peterlini, por tudo o que fizeram por mim, desde a ajuda com o planejamento dos experimentos, troca de reagentes, empréstimos de equipamentos, troca de experiências e conversas. Vocês com certeza foram muito importantes para mim!

Aos estagiários Geniana, Raíssa, Amanda e Lucas por toda ajuda na execução dos experimentos. Vocês tiveram papel essencial no desenvolvimento deste trabalho e eu agradeço pela oportunidade de poder ensinar e também de aprender com vocês.

Ao professor Felipe Teixeira, pela disponibilidade e colaboração com os experimentos realizados na UFSCAR.

A pesquisadora Dra. Ângela Saito, pela atenção e colaboração com os experimentos utilizando o sistema CRISPR. Também agradeço ao Laboratório de Organismos Modelo e ao Laboratório de Vetores Virais do LNBio/CNPEM pela infraestrutura disponível para a realização dos experimentos.

A pesquisadora Dra. Juliana Smetana, do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), pela parceria e colaboração com o ensaio de fosforilação radioativo.

Ao professor Patrick Eyers, da Universidade de Liverpool, pela colaboração com o ensaio de fosforilação e espectrometria de massas.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

A CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

*“Recria tua vida, sempre, sempre. Remove pedras e planta roseiras e faz doces. Recomeça.”*

*(Cora Coralina)*

## RESUMO

CAETANO, Mônica Maria Magalhães, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2020. **Avaliação do silenciamento de SRPK por CRISPR/Cas9 e da interação com EFHD2 em melanoma metastático murino.** Orientador: Gustavo Costa Bressan. Coorientadores: Juliana Lopes Rangel Fietto, Maria Roméria da Silva e Abelardo Silva Júnior.

As proteínas cinases serina/arginina (SRPK) são classicamente relacionadas à regulação do *splicing* do pré-mRNA pela fosforilação de fatores de *splicing* ricos em dipeptídeos serina e arginina, as proteínas SR. É evidente a importância de estudos que visem elucidar os mecanismos moleculares da atuação das SRPK em diversas vias de sinalização, *splicing* do pré-mRNA e outros processos celulares, sobretudo relacionados ao desenvolvimento do câncer e formação de metástase, nos quais essas cinases já foram identificadas superexpressas. Neste trabalho, avaliamos o impacto do silenciamento de SRPK em melanoma metastático murino. O silenciamento de SRPK2 na linhagem celular de melanoma, B16F10, prejudicou o desenvolvimento do tumor subcutâneo e a formação de nódulos pulmonares *in vivo* e diminuiu a proliferação e a invasão celular *in vitro*. A supressão da expressão de SRPK1 e SRPK2, simultaneamente, diminuiu a capacidade de formação de colônias de B16F10. O mecanismo de ação de SRPK2 no desenvolvimento do melanoma parece estar relacionado à sua atuação na dinâmica de polimerização do citoesqueleto de Actina, pois o silenciamento de SRPK2 diminuiu a formação de F-actina nas células B16F10. Um ensaio de duplo-híbrido em leveduras, realizado anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa, mostrou a possível interação entre a região espaçadora de SRPK2 e proteínas relacionadas à regulação do citoesqueleto de Actina. Dentre elas, EFhd2 está envolvida na regulação da dinâmica de polimerização do citoesqueleto de actina e formação de metástase em melanoma. Neste trabalho a interação entre SRPK2 e EFhd2 foi confirmada pelos ensaios de co-imunoprecipitação e *GST-pulldown*. Ensaios de fosforilação *in vitro* mostraram que EFhd2 pode ser fosforilada por SRPK2. Portanto, com os resultados obtidos até o momento, é possível sugerir que a diminuição da capacidade metastática de B16F10 em decorrência da supressão da expressão de SRPK2 pode envolver, pelo menos parcialmente, alterações na dinâmica do citoesqueleto de Actina via EFhd2. Esses dados criam novas perspectivas sobre o entendimento da relação funcional entre SRPK2 e a dinâmica do citoesqueleto de Actina no contexto do melanoma metastático e potencialmente em outros tipos de tumores.

Palavras-chave: Serine/arginine protein kinase. Melanoma. Metástase.

## ABSTRACT

CAETANO, Mônica Maria Magalhães, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2020. **Evaluation of SRPK silencing by CRISPR/Cas9 and its interaction with EFHD2 in murine metastatic melanoma.** Adviser: Gustavo Costa Bressan. Co-advisers: Juliana Lopes Rangel Fietto, Maria Roméria da Silva and Abelardo Silva Júnior.

Serine/arginine protein kinases (SRPK) are involved in the regulation of pre-mRNA splicing by the phosphorylation of splicing factors rich in serine and arginine dipeptides (SR proteins). It is clear the importance of studies that aim to elucidate the molecular mechanisms of SRPK action in several signaling pathways, pre-mRNA splicing and other cellular processes. This is especially related to the development of cancer and metastasis formation, in which these overexpressed kinases have already been identified. In this study, we evaluated the effect of SRPK silencing on murine metastatic melanoma. The silencing of SRPK2 in the melanoma cell line B16F10 impaired the development of a subcutaneous tumor and the formation of pulmonary nodules *in vivo* and decreased the proliferation and the cell invasion *in vitro*. The simultaneous suppression of the expression of SRPK1 and SRPK2 decreased the colony-forming ability of B16F10 cells. The mechanism of action of SRPK2 in the development of melanoma seems to be related to its role in the polymerization of the Actin cytoskeleton, since the silencing of SRPK2 decreased the formation of F-actin in B16F10 cells. A yeast two-hybrid assay previously performed by our research group showed a possible interaction between the SRPK2 spacer region and some proteins related to the regulation of the Actin cytoskeleton. Among the proteins found, EFhd2 is involved in the regulation of the polymerization dynamics of the Actin cytoskeleton and in the formation of metastases in melanoma. In this study, the interaction between SRPK2 and EFhd2 was confirmed by performing co-immunoprecipitation and GST pull-down assays. *In vitro* phosphorylation assays have demonstrated that EFhd2 can be phosphorylated by SRPK2. Therefore, from the results obtained so far, it is possible to suggest that the decrease in the metastatic ability of B16F10 cells due to the suppression of SRPK2 expression, may involve at least partially, changes to the dynamics of the Actin cytoskeleton via EFhd2. These data create new perspectives on the understanding of the functional relationship between SRPK2 and the dynamics of the Actin cytoskeleton in the context of metastatic melanoma and potentially in other types of tumors.

Keywords: Serine/arginine protein kinase. Melanoma. Metastasis.

## SUMÁRIO

<b>1. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>12</b>
1.1. SRPK regulam o <i>splicing</i> do pré-mRNA fosforilando as proteínas SR .....	12
1.2. SRPK como proteínas mediadoras no desenvolvimento do câncer .....	17
1.3. A inibição farmacológica de SRPK como potencial terapêutico contra o câncer.....	23
1.4. A formação de metástase é dependente do remodelamento do citoesqueleto de Actina	24
1.5. EFhd2: estrutura e diversas funções.....	27
1.6. Regulação da atividade de EFhd2 e sua atuação em câncer e metástase .....	32
<b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>37</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>38</b>
3.1. Objetivo geral.....	38
3.2. Objetivos específicos .....	38
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>39</b>
4.1. Silenciamento de SRPK em células B16F10 .....	39
4.1.1. Desenho das sequências alvo e clonagem no vetor lentiCRISPRV2 .....	39
4.1.2. Produção das partículas lentivirais .....	40
4.1.3. Cultivo celular, transdução e seleção das células resistentes à puomicina .....	40
4.1.4. Silenciamento simultâneo de SRPK1 e SRPK2 em células B16F10 .....	41
4.1.5. Lise celular, quantificação de proteínas pelo método de Bradford e análise da expressão de SRPK1 e SRPK2 por <i>western blotting</i> .....	42
4.2. Ensaio <i>in vivo</i> .....	43
4.2.1. Efeito do silenciamento de SRPK no desenvolvimento do melanoma subcutâneo ...	43
4.2.2. Análise histopatológica do tumor.....	44
4.2.3. Efeito do silenciamento de SRPK na indução da formação de nódulos pulmonares.	44
4.2.4. Análises estatísticas .....	45
4.3. Efeito do silenciamento de SRPK nas células B16F10 - ensaios <i>in vitro</i> .....	45
4.3.1. Ensaio de migração “ <i>wound healing</i> ” .....	45
4.3.2. Ensaio de proliferação .....	46
4.3.3. Ensaio de invasão em matrigel.....	47
4.3.4. Ensaio de formação de colônia.....	47
4.3.5. Efeito do silenciamento de SRPK no citoesqueleto de Actina das células B16F10 ..	48
4.4. RT-qPCR.....	48

4.5. Avaliação da interação entre SRPK2 e EFhd2.....	50
4.5.1. Ensaio de co-imunoprecipitação .....	50
4.5.1.1. Cultivo celular.....	50
4.5.1.2. Transfecção das células.....	50
4.5.1.3. Co-imunoprecipitação de FLAG-SRPK2 e GFP-EFhd2 .....	51
4.5.2. GST-Pulldown.....	52
4.5.2.1. Expressão de GST-EFhd2 e GST em sistema procarioto e lise celular .....	52
4.5.2.2. Expressão de 6xHis-SRPK1 e 6xHis-SRPK2 em sistema procarioto e lise celular.....	52
4.5.2.3. Purificação de 6xHis-SRPK1 ou 6xHis-SRPK2 por cromatografia de afinidade em FPLC .....	53
4.5.2.4. Ligação das proteínas GST à resina de sepharose-glutationa .....	53
4.5.2.5. GST-Pulldown .....	54
4.6. Ensaio de fosforilação <i>in vitro</i> utilizando ATP radioativo.....	54
4.7. Ensaio de fosforilação <i>in vitro</i> e análise por espectrometria de massas .....	55
4.7.1. Expressão e purificação de 6xHis-SRPK2 e 6xHis-EFhd2 e preparo das reações de fosforilação.....	55
4.7.2. Identificação do sítio de fosforilação em EFhd2 por espectrometria de massas .....	56
4.7.3. Análise dos dados de MS .....	57
4.8. Obtenção da proteína recombinante Destrin .....	57
4.8.1. Clonagem de Destrin em vetor para expressão em sistema procarioto.....	57
4.8.2. Expressão heteróloga de 6xHis-Destrin em sistema procarioto .....	58
4.8.3. Lise e purificação de 6xHis-Destrin por cromatografia de afinidade em resina contendo níquel.....	58
4.8.4. Análise da expressão e purificação de 6xHis-Destrin por <i>western blotting</i> .....	59
4.8.5. Lise e purificação de 6xHis-Destrin por cromatografia de troca catiônica em sistema FPLC.....	60
4.8.6. Lise e purificação de 6xHis-Destrin por cromatografia de troca aniônica em FPLC .....	60
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>61</b>
5.1. Realização do silenciamento gênico de <i>SRPK</i> nas populações de células B16F10.....	61
5.2. Efeito do silenciamento de <i>SRPK</i> no desenvolvimento do tumor subcutâneo .....	63
5.2.1. Análise histológica do tumor subcutâneo.....	65
5.3. Efeito do silenciamento de <i>SRPK</i> na formação de nódulos pulmonares .....	67

5.4. Efeito do silenciamento de SRPK em proliferação celular .....	68
5.5. Efeito do silenciamento de SRPK em invasão celular .....	69
5.6. Efeito do silenciamento de SRPK na capacidade de formação de colônias das células B16F10 .....	70
5.7. Efeito do silenciamento de SRPK na polimerização de Actina .....	71
5.8. Confirmação da interação entre SRPK2 e EFhd2 .....	72
5.9. Ensaios de fosforilação <i>in vitro</i> utilizando ATP radioativo .....	74
5.10. Ensaio de fosforilação - espectrometria de massas.....	76
<b>6. RESULTADOS COMPLEMENTARES .....</b>	<b>77</b>
6.1. Efeito do silenciamento de SRPK em migração celular .....	77
6.2. Efeito do silenciamento de SRPK na regulação da via NFκB e na expressão de genes relacionados à EMT .....	79
6.3. Avaliação da interação entre Akt e EFhd2.....	84
6.4. Expressão heteróloga de 6xHis-Destrin em sistema procarioto.....	85
<b>7. DISCUSSÃO .....</b>	<b>89</b>
<b>8. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>100</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>101</b>
<b>APÊNDICE A – Alinhamento do sgrNA.....</b>	<b>118</b>
<b>APÊNDICE B - Estabilidade do silenciamento de SRPK em B16F10 .....</b>	<b>119</b>
<b>APÊNDICE C – Mutação na sequência de EFhd2 clonada em pEGFPC1.....</b>	<b>120</b>
<b>APÊNDICE D – Curvas-padrão para RT-qPCR usando amostras de células B16F10 com SRPK silenciada .....</b>	<b>121</b>
<b>APÊNDICE E - Curvas-padrão para RT-qPCR usando amostras de tumores .....</b>	<b>122</b>
<b>ANEXO A - Certificado de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais.....</b>	<b>123</b>
<b>ANEXO B - Publicação: Inibição farmacológica combinada de SRPK e Akt apresenta efeito de sinergismo em células de leucemia.....</b>	<b>124</b>

## 1. REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1. SRPK regulam o *splicing* do pré-mRNA fosforilando as proteínas SR

O RNA mensageiro (mRNA) é gerado a partir do processamento de um pré-mRNA no núcleo. Além da remoção dos íntrons do pré-mRNA, sequências de éxons podem ser seletivamente unidas através do *splicing* alternativo, resultando em diferentes mRNAs. A reação de *splicing* é importante porque contribui para a formação de proteínas extras a partir de um conjunto limitado de genes, aumentando a complexidade e a diversidade de proteínas expressas em resposta a diversos estímulos (KALSOTRA & COOPER 2011).

O *splicing* do pré-mRNA em células de mamíferos ocorre em um grande complexo dinâmico de ribonucleoproteínas conhecido como spliceossomo. Os spliceossomos são compostos pelos fatores de *splicing* e pelos pequenos RNAs nucleares (snRNP) U1, U2, U4, U5 e U6, formados por um pequeno RNA estável ligado a proteínas. Essa maquinaria complexa é capaz de reconhecer elementos na sequência no pré-mRNA que definem os limites dos íntrons e promover a excisão precisa dos mesmos (JURICA & MOORE, 2003).

A interação entre o pré-mRNA e os snRNPs durante a montagem do spliceossomo é importante porque permite a seleção dos sítios de *splicing* e estabelece um *core* catalítico para que possa ocorrer a reação de *splicing* no spliceossomo (WANG et al, 1998). A maioria dessas interações é mediada pelos fatores de *splicing* não-snRNPs, sendo que dentre os melhores caracterizados pertencem à superfamília de fatores de *splicing* contendo domínios ricos em serina/arginina, as proteínas SR (FU, 1995).

A família de proteínas SR, reguladoras de *splicing*, é altamente conservada e caracteriza-se pela presença de um ou dois motivos de reconhecimento de RNA em sua região aminoterminal, um domínio rico em aminoácidos serina e arginina (SR) em sua extremidade carboxiterminal e outros domínios SR ao longo da cadeia polipeptídica. Os motivos de reconhecimento de RNA são responsáveis pela ligação da proteína ao RNA, enquanto os domínios SR estão envolvidos em diversas interações proteína-proteína importantes durante a montagem do spliceossomo (WANG et al., 1998).

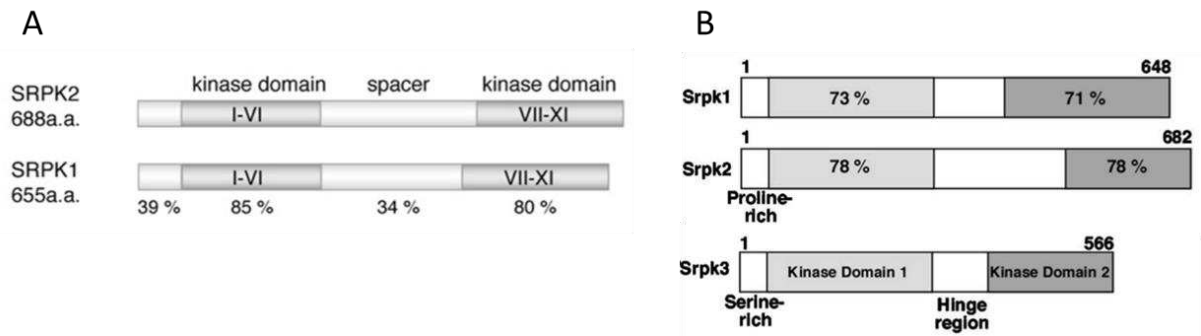
As proteínas SR podem sofrer modificações pós-traducionais. Seus resíduos SR são alvos de fosforilação, de forma reversível, sendo que este tipo de modificação é capaz de regular a atividade das proteínas SR durante o *splicing* (WANG et al., 1998). Duas famílias de proteínas cinases (Clk/Sty e SRPK) foram descobertas por sua capacidade de fosforilar as proteínas SR, alterando sua distribuição celular e atividade (WANG et al., 1998; PRASAD & MANLEY, 2003).

As proteínas cinases serina/arginina (SRPK) regulam a ação de fatores de *splicing* fosforilando de forma altamente específica os domínios SR encontrados na estrutura desses fatores (LIN e FU, 2007). A fosforilação nos domínios SR influencia a interação destas com outras proteínas e regula sua atividade no *splicing* do pré-mRNA (XIAO e MANLEY, 1997).

Em mamíferos, a família de SRPK é constituída por SRPK1, SRPK1a (isoforma de SRPK1), SRPK2 e SRPK3 (WANG et al., 1998; NIKOLAKAKI et al., 2001; NAKAGAWA et al., 2005). A expressão de SRPK1 ocorre na maioria dos tipos celulares e tecidos, como nos testículos e pâncreas, enquanto a expressão de SRPK2 é mais elevada no cérebro (WANG et al., 1998). SRPK3 é expressa nas células musculares esqueléticas e coração (NAKAGAWA et al., 2005). Essas cinases são conservadas e apresentam cerca de 70% de identidade em seus resíduos de aminoácidos (WANG et al., 1998; NAKAGAWA et al., 2005).

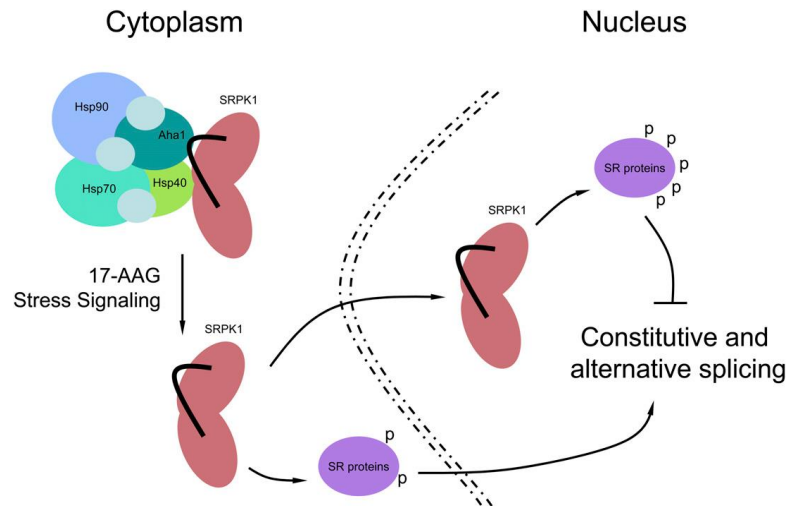
Genes ortólogos de SRPK podem ser encontrados em *Schizosaccharomyces pombe* (Dsk1), *Saccharomyces cerevisiae* (Sky1), *Drosophila* e *Caenorhabditis elegans* (SPK-1), sugerindo que essas cinases são evolutivamente conservadas entre as espécies (TANG et al., 1998; SIEBEL et al., 1999; LOH et al., 2012; KUROYANAGI et al., 2000).

A família das SRPK compartilham uma estrutura comum que consiste em uma extensão N-terminal, um domínio cinase central e uma cauda C-terminal (Figura 1). Além disso, apresentam um domínio cinase altamente conservado, separado em dois lóbulos por uma sequência não conservada conhecida como domínio espaçador, importante para estabilizar o domínio cinase e regular a localização citoplasmática dessas cinases (DING et al., 2006). Entretanto, cada membro da família de SRPK possui seu próprio domínio espaçador, com tamanho e sequência de resíduos de aminoácidos específicos, possivelmente relacionado a uma função específica de cada cinase (GIANNAKOUROS et al., 2011). A retirada do domínio espaçador de SRPK1 não altera sua atividade de cinase apesar de afetar sua localização celular, pois ocorre a maior translocação dessas proteínas para o núcleo (DING et al., 2006). Em contraste, a retirada do domínio espaçador de SRPK2 não induz sua translocação nuclear, e SRPK2 permanece no citoplasma (VIVARELLI et al., 2013).



**Figura 1.** Representação esquemática da estrutura da família de SRPK de camundongos. Os domínios conservados (cinza) das SRPK são bifurcados pela região espaçadora (branco). **(A)** SRPK1 e SRPK2 apresentam alta porcentagem de similaridade entre os seus domínios cinase, como indicado. **(B)** SRPK3 apresenta alta similaridade em relação ao domínio cinase de SRPK1 e SRPK2, mas não em relação à região N-terminal ou ao domínio espaçador (*Hinge region*). SRPK2 e SRPK3 possuem a região N-terminal rica em resíduos de aminoácidos prolina e serina, respectivamente (adaptada de LIANG et al., 2014; NAKAGAWA et al., 2005).

A distribuição celular das SRPK pode ser citoplasmática ou nuclear, e pode ser regulada por alguns sinais, como EGF (*epidermal growth factor*) (ZHOU et al., 2012) ou estresse osmótico (ZHONG et al., 2009). A localização principalmente citoplasmática dessas proteínas é mantida através de interações entre o seu domínio espaçador e membros específicos da família de chaperonas moleculares (Figura 2) (ZHOU et al., 2012). A repartição dessas cinases entre citoplasma e núcleo é considerada estratégica devido às suas funções relacionadas ao metabolismo do RNA. As SRPK possuem papel essencial na importação nuclear de proteínas SR recém-sintetizadas, pois o seu transporte ocorre de forma dependente de fosforilação. Além disso, na presença de um estímulo como EGF, as SRPK podem ser translocadas do citoplasma para o núcleo onde participam da regulação dos níveis de fosforilação das proteínas SR em diferentes fases do *splicing* (ZHOU et al., 2012; DING et al., 2006; ZHONG et al., 2009).



**Figura 2.** Modelo esquemático indicando o papel de chaperonas moleculares na regulação da translocação nuclear de SRPK1, fosforilação de proteínas SR e *splicing* do pré-mRNA. A formação do complexo entre SRPK1 e a maquinaria Hsp70/Hsp90 mantém SRPK1 no citoplasma atuando na fosforilação inicial de proteínas SR, crítica para a subsequente importação dessas proteínas para o núcleo. A interação entre SRPK1 e chaperonas moleculares pode ser modulada por um sinal de estresse, resultando na liberação de SRPK1 a partir do complexo e translocação para o núcleo. Sob determinadas condições fisiológicas, a migração de SRPK1 para o núcleo pode estimular o *splicing*. Entretanto, se o nível nuclear de SRPK1 for muito alto, a hiperfosforilação de proteínas SR pode causar um efeito inibitório no *splicing* (retirada de ZHONG et al., 2009).

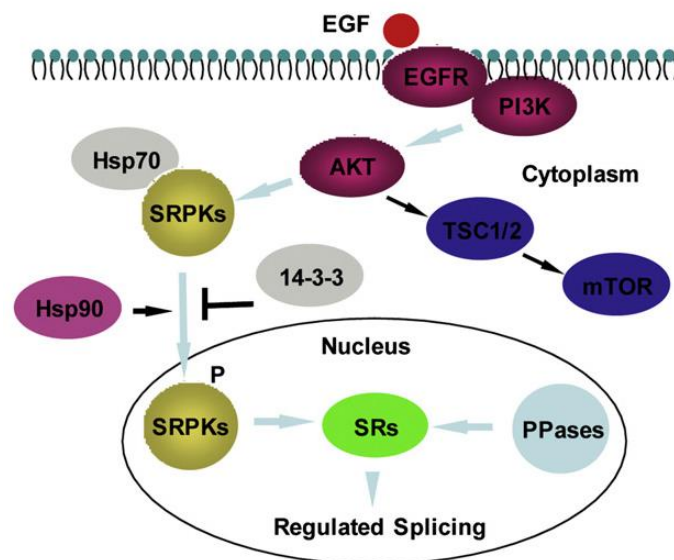
As SRPK são enzimas ativas constitutivamente e não requerem modificações pós-traducionais para iniciarem a atividade catalítica (NGO et al., 2007). Contudo, o seu estado de fosforilação bem como sua localização subcelular podem atuar como mecanismos regulatórios da sua atividade enzimática. Após o estímulo por EGF, ocorre a interação entre SRPK1 e Akt o que induz a autofosforilação de SRPK1, permitindo sua translocação para o núcleo e atuação no *splicing* (ZHOU et al., 2012). O mecanismo de autofosforilação de SRPK1 dependente da interação com Akt explica a observação prévia de que a atividade cinase de SRPK1 é requerida para sua importação nuclear (DING et al., 2006).

A fosforilação de SRPK2 por Akt em T492 induz sua translocação do citoplasma para o núcleo e aumenta a atividade de cinase de SRPK2, aumentando a expressão das ciclinas D1, e levando neurônios maduros à apoptose. Este movimento de translocação citoplasma/núcleo pode ser inibido através da interação de SRPK2 com a proteína 14-3-3, que ao impedir o acúmulo de SRPK2 no núcleo, evita a ocorrência de efeitos tóxicos para as células (JANG et al., 2009).

A identificação do mecanismo de fosforilação das SRPK mostrou que SRPK1 fosforila resíduos de serina próximos, em uma região específica do domínio SR dos fatores de *splicing*.

SRPK1 atua por um mecanismo processivo, em que a proteína SR permanece ligada ao domínio cinase enquanto é fosforilada nos resíduos de serina do domínio SR (AUBOL et al., 2003). O complexo formado entre SRPK1 e SRSF1 possui grande afinidade, que diminui à medida que SRSF1 vai sendo fosforilado. Isso faz com que haja uma alteração do mecanismo de fosforilação para uma forma distributiva, em que a interação SRPK1/SRSF1 ocorre em etapas de associação e dissociação conforme o domínio SR vai sendo fosforilado (GHOSH e ADAMS, 2011).

SRPK são consideradas transdutores centrais na via de sinalização de EGF e na regulação do *splicing* alternativo, enquanto outros fatores estabelecidos previamente possuem papéis menores, sugerindo que o eixo Akt-SRPK-SR constitui o ramo central na transdução de sinal de EGF para regular o programa de *splicing* no núcleo (Figura 3) (ZHOU et al., 2012).



**Figura 3. Regulação do *splicing* alternativo iniciada pela sinalização de EGF via Akt-SRPK-SR.**

Após a ligação de EGF ao seu receptor, EGFR, ocorre a ativação de PI3K e posteriormente Akt, que induz a autofosforilação e ativação de SRPK1. Após a ativação, SRPK1 inicia sua atividade fosforilando proteínas SR e regulando o *splicing*, sendo que o estado de fosforilação das proteínas SR é dependente do balanço entre as atividades de cinases e fosfatases. O complexo contendo Hsp70 é responsável por ancorar as SRPK no citoplasma, enquanto o complexo contendo Hsp90 facilita sua translocação para o núcleo. As proteínas 14-3-3 atuam na prevenção do acúmulo excessivo de cinases reguladoras de *splicing* no núcleo, o que poderia causar efeitos tóxicos para as células. Apesar de mTOR ser o principal efetor na via de sinalização de Akt, sua contribuição é limitada nos eventos de regulação de *splicing* alternativo induzido por EGF. A via de sinalização Akt-SRPK-SR regula a maioria dos eventos de *splicing* induzidos por EGF (retirada de ZHOU et al., 2012).

A ação de Akt é importante em diversas vias de sinalização, incluindo migração, diferenciação, proliferação e sobrevivência celular (MANNING e CANTLEY, 2007). Akt é fosforilada co-traducionalmente por mTORC2 em Thr450 (OH et al., 2010). Em resposta à EGF, PI3K (fosfatidilinositol 3-cinase) aumenta a produção de PIP3 (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato), que recruta Akt para a membrana plasmática podendo ser fosforilada por PDK-1. Esse evento desencadeia a fosforilação adicional mediada por mTORC2, o que torna Akt fortemente ativa. Akt está submetida a vários tipos de controle, resultando em uma atenuação rápida dos sinais de crescimento em células normais (CARRACEDO e PANDOLFI, 2008). Um mecanismo de regulação da ativação de Akt é a conversão de PIP3 em PIP2 pela fosfatase PTEN (MAEHAMA E DIXON, 1999). Além disso, Akt ativada também pode ser atenuada por desfosforilação em locais de ativação crítica (KUO et al., 2008; BROGNARD et al., 2007; GAO et al., 2005). A ativação constitutiva de Akt é uma característica de vários tipos de cânceres humanos (CARRACEDO e PANDOLFI, 2008).

## **1.2. SRPK como proteínas mediadoras no desenvolvimento do câncer**

O remodelamento do proteoma é essencial para o desenvolvimento celular, diferenciação e respostas aos estímulos fisiológicos. Através do *splicing* alternativo ocorre o aumento da diversidade de isoformas que atuam em diferentes processos celulares. Entretanto, eventos de *splicing* anormais podem gerar variantes que contribuem para o desenvolvimento de doenças, como o câncer. Alterações no padrão do *splicing* alternativo proporcionam a oportunidade para que as células cancerígenas produzam isoformas de proteínas que beneficiem o seu desenvolvimento. Entre os benefícios estão o aumento da proliferação celular e crescimento do tumor, aumento da invasividade e a capacidade de formação de metástase. Isso ocorre porque os genes normalmente afetados pelas alterações no padrão de *splicing* codificam proteínas envolvidas no controle do ciclo celular, proliferação, diferenciação, vias de transdução de sinais, morte celular e angiogênese (BRINKMAN, 2004).

Estudos indicam a expressão elevada de SRPK em diferentes tipos de câncer. Altos níveis de expressão de SRPK1 foram observados em carcinomas de pâncreas, de mama e de cólon (HAYES et al., 2007; ROOSMALEN et al., 2015), melanoma (GAMMONS et al., 2014), gliomas (CHANG et al., 2015), carcinoma e adenocarcinoma de pulmão (GOUT et al., 2012; GONG et al., 2016), carcinoma hepatocelular (ZHOU et al., 2013), próstata (BULLOCK et al., 2016) e ovário (ODUNSI et al., 2012). O desequilíbrio na expressão de

SRPK1 promove o câncer, pois tanto o aumento quanto a diminuição do nível de expressão dessa cinase contribui para o desenvolvimento do tumor (WANG et al., 2014).

O aumento da expressão de SRPK2 foi observado em leucemia (JANG et al., 2008), carcinoma das células não-pequenas do pulmão (GOUT et al., 2012), câncer de cólon (WANG et al., 2016; YANG et al., 2018), pâncreas (WANG et al., 2019) e próstata (ZHUO et al., 2018). A hiperfosforilação de SRPK2, indicativo de sua atividade exacerbada, foi observada em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC) (RADHAKRISHNAN et al., 2016).

A migração das células tumorais é importante para a disseminação do câncer no organismo a partir do tumor primário. A invasão das células cancerígenas entre os tecidos vizinhos e a formação de metástase em órgãos distantes é uma das principais causas de morte relacionadas ao câncer. Esse processo complexo é controlado por remodelamentos na matriz extracelular e no citoesqueleto, bem como pela reorganização dinâmica da adesão entre células vizinhas e com os tecidos conectivos subjacentes (adesões focais) (ROOSMALEN et al., 2015).

Roosmalen et al. (2015) identificaram a expressão elevada de *SRPK1* dentre os genes que regulam a migração celular em câncer de mama, e correlacionaram o aumento da expressão de SRPK1 com o mau prognóstico e formação de metástase no pulmão, fígado e baço. Surpreendentemente, os efeitos observados após o *knockdown* de SRPK1 em câncer de mama não foram mediados por modificações no *splicing* alternativo, mas na modulação da expressão de genes alvo componentes das vias canônica e não-canônica de NFκB. Entretanto, o mecanismo da regulação de SRPK1 nesta via bem como no contexto de formação de metástase ainda não foi totalmente elucidado (ROOSMALEN et al., 2015).

O crescimento de um tumor e o surgimento de metástase requerem a formação de novos vasos sanguíneos (HANAHAN & WEINBERG, 2000). Esse processo é dirigido sobretudo por VEGF (*vascular endothelial growth factor*), a molécula conhecida mais potente por seus efeitos angiogênicos (HURWITZ et al., 2004). Através do *splicing* alternativo, isoformas pró ou anti-angiogênicas de VEGF podem ser geradas e, por regularem o *splicing* de VEGF, as SRPK estão envolvidas indiretamente no processo de angiogênese, tão importante para o desenvolvimento do tumor (WOOLARD et al., 2004; NOWAK et al., 2010). Em células epiteliais tratadas com IGF-1 ocorre a maior fosforilação e translocação nuclear de SRSF1 e maior produção da isoforma pró-angiogênica de VEGF. Além disso, a inibição de SRPK1/2 reduz a angiogênese *in vivo* e bloqueia a translocação nuclear de SRSF1, indicando que essas

cinases são importantes para o balanço das isoformas anti ou pró-angiogênicas de VEGF (NOWAK et al., 2010; GAMMONS et al., 2014).

O controle da expressão das formas pró ou anti-angiogênicas de VEGF pelas SRPK pode ser explorado como estratégia terapêutica com o objetivo de diminuir a vascularização em tecidos tumorais, prejudicando o crescimento e o desenvolvimento do tumor.

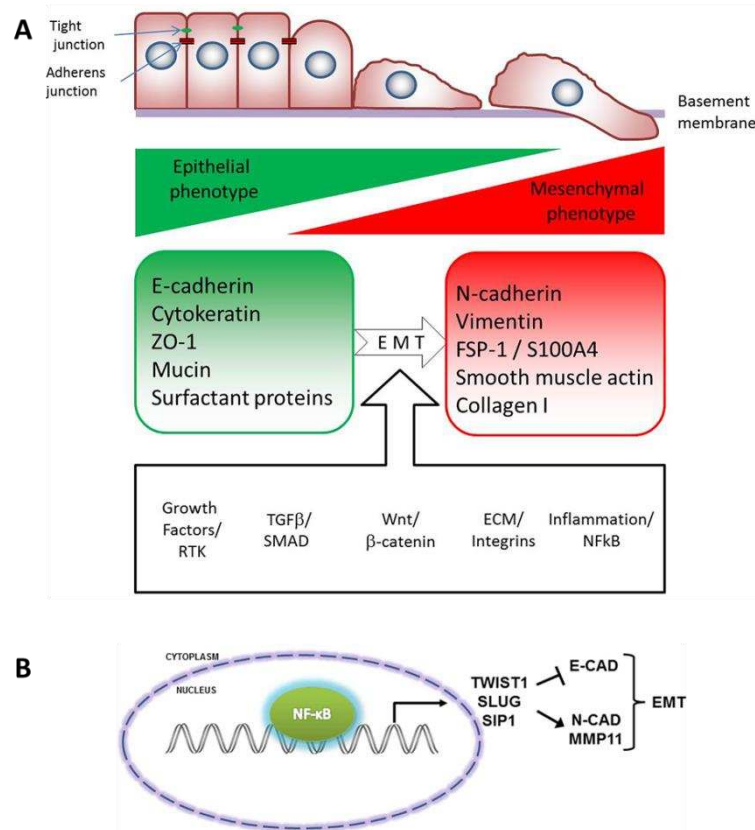
SRPK1 contribui para a regulação do *splicing* alternativo de Rac1b, uma variante de *splicing* da pequena GTPase Rac1, membro da família de proteínas ligadoras de GTP, Rho (FIEGEN et al., 2004). Essa isoforma é gerada a partir do aumento da inclusão do exon 3 de Rac1 promovido por SRSF1, que se transloca para o núcleo de forma dependente de fosforilação induzida por SRPK1 (GONÇALVES et al., 2014). Tanto Rac1 quanto Rac1b regulam a ativação de diversas cascatas de sinalização que controlam processos importantes como remodelamento do citoesqueleto de Actina, proliferação e sobrevivência (MATOS et al., 2000; BOUREUX et al., 2007). Rac1b contém um domínio adicional em relação a Rac1 que resulta na troca acelerada de GDP por GTP ao mesmo tempo em que prejudica a hidrólise de GTP, tornando-o constitutivamente ativo (FIEGEN et al., 2004).

Rac1b é capaz de aumentar a expressão de ciclina D1 e promover a progressão do ciclo celular e sobrevivência via sinalização de NFκB em câncer de cólon (MATOS; JORDAN, 2005). A expressão de Rac1b é elevada em tumores de cólon, mama e pulmão e está correlacionada com o mau prognóstico dos pacientes (MATOS et al., 2016; SCHNELZER et al., 2000; ZHOU et al., 2013). A depleção de SRPK1 em células de câncer de cólon previne o transporte nuclear de SRSF1 além de induzir sua degradação, limitando sua habilidade de controlar o *splicing* de Rac1b (GONÇALVES et al., 2014; FIEGEN et al., 2004).

Também em células de câncer de cólon, SRPK2 contribui para o crescimento e migração das células tumorais. Esse efeito ocorre pela ativação da via de sinalização mediada por ERK (*extracellular-related kinase*), através da formação de um complexo entre SRPK2 e B-Raf, um regulador *upstream* na via de sinalização de ERK (WANG et al., 2016).

A transição epitelial-mesenquimal (*epithelial-mesenchymal transition*, EMT) é uma fase importante quando células tumorais se disseminam a partir do tumor primário para colonizar órgãos distantes, pois permite que as células obtenham um comportamento invasivo e sejam capazes de penetrar no epitélio vascular, entrarem na circulação e formarem metástases em órgãos distantes (KALLURI; WEINBERG, 2009). Este processo complexo é caracterizado pela perda das características epiteliais originais das células tumorais e obtenção do fenótipo mesenquimal, em que ocorre o rompimento das junções intercelulares, perda da polaridade

celular, rompimento dos microtúbulos e a ruptura da membrana basal (Figura 4) (LEVAYER e LECUIT, 2008).



**Figura 4. Representação esquemática das modificações que caracterizam o processo de transição epitelial-mesênquimal (EMT).** (A) Várias vias de sinalização são capazes de ativar EMT: receptores tirosina cinases ativados por EGF, IGF, integrinas, Wnt, TGF- $\beta$ , NF $\kappa$ B. A atuação dessas vias tem em comum o aumento da expressão de fatores de transcrição responsáveis por ativar EMT em células epiteliais (SNAIL, SLUG, ZEB1, TWIST1, etc), regulando de forma negativa a expressão de E-caderina e outros genes ligados ao fenótipo epitelial e ativando a transcrição de genes associados ao fenótipo mesênquimal. Com isso as células perdem progressivamente a capacidade de adesão célula-célula e adesão com a matriz extracelular e adquirem a capacidade de migrar a partir do tumor primário e alcançar outros tecidos e órgãos distantes. (B) A via de NF $\kappa$ B possui papel importante em EMT principalmente por regular transcricionalmente a expressão de fatores de transcrição (TWIST1, SLUG e SIP1) reprimindo a expressão de marcadores epiteliais (E-caderina) e ativando a expressão de marcadores mesênquimais (N-caderina e MMP11), resultando na indução do processo EMT (adaptada de BARTIS et al., 2014; PIRES et al., 2017).

EMT pode ser induzida em resposta aos fatores de crescimento TGF- $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* ) ou EGF (*epithelial growth factor*), levando à ativação das vias de sinalização Wnt e Notch, e ativando a expressão *downstream* de alguns fatores de transcrição como SNAIL, ZEB, SMAD e TWIST1, responsáveis pela indução da expressão de genes efetores em EMT (SHANKAR; NABI, 2015).

Em células de câncer de cólon, SRPK2 foi identificada atuando em EMT por induzir o aumento da expressão de TWIST1, um fator de transcrição que controla a expressão de proteínas envolvidas em adesão celular, consideradas marcadores de EMT, como E-caderina e N-caderina (YANG et al., 2004; KALLURI, R.; WEINBERG, 2009). A superexpressão de TWIST1 tem sido observada em muitos tumores primários, incluindo carcinoma de cólon, melanoma, próstata e mama, além de estar correlacionada ao aumento de migração das células tumorais, invasão e metástase (MAESTRO et al., 1999; KWOK et al., 2005; ANSIEAU et al., 2008; WEISS et al., 2012).

O *knockdown* de SRPK2 em células de câncer de cólon levou à diminuição da expressão de TWIST1 e Vimentina (marcador mesenquimal) enquanto aumentou a expressão de E-caderina (marcador epitelial). Entretanto, o *knockdown* de TWIST1 não alterou significativamente a expressão de SRPK2, indicando que SRPK2 está atuando de forma *upstream* a TWIST1. Como conclusão, SRPK2 pode promover EMT por meio do aumento da expressão de TWIST1 em células de câncer de cólon (YANG et al., 2018).

SRPK1 regula a atividade do fator de *splicing*, SRSF1, por meio da fosforilação dos resíduos de serina localizados no domínio SR (GONÇALVES et al., 2014). O aumento da expressão ou da atividade do fator de *splicing*, SRSF1, também promove EMT por regular o *splicing* do mRNA codificante do proto-oncogene RON1, um receptor tirosina-kinase que ativa uma cascata de sinalização levando à dissociação celular, migração e invasão da matriz (GHIGNA, et al., 2005).

IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*) é capaz de induzir EMT através do aumento da expressão de SRPK1 e dos níveis de Akt fosforilada em câncer gástrico. Na presença de IGF-1 ocorre o aumento da expressão de marcadores de EMT, como N-caderina, MMP2 e SLUG. O *knockdown* de SRPK1 afetou significativamente os níveis de expressão de MMP2, N-caderina e SLUG além da capacidade de migração, invasão e proliferação dessas células (WANG et al., 2017).

A via de sinalização de mTORC1 (*rapamycin complex 1*) é importante por integrar sinais a partir de fatores de crescimento, nutrientes ou do estado de energia celular e regular processos celulares anabólicos ligados ao crescimento e sobrevivência celular (DIBBLE; MANNING, 2013; SAXTON; SABATINI, 2017). A síntese *de novo* de lipídeos em células cancerígenas é importante porque disponibiliza ácidos graxos e colesterol para a expansão das membranas celulares e de organelas (MENENDEZ et al., 2007). Foi descoberto que mTORC1 é capaz de promover a biogênese de lipídeos via SRPK2, e vários genes relacionados à

biossíntese de lipídeos foram identificados como sendo alvos dessa via de sinalização. Após a fosforilação de SRPK2 no resíduo Ser494 por S6K1 (diretamente ativada por mTORC1) e posteriormente em Ser497 por CK1, SRPK2 pôde se translocar para o núcleo e fosforilar proteínas SR, induzindo o *splicing* eficiente dos mRNAs de enzimas lipogênicas (LEE et al., 2017).

A depleção de SRPK1 mediada por siRNA em células de glioma induz apoptose, reduz a migração e invasão e inibe angiogênese e o crescimento do tumor (CHANG et al., 2015). Resultados similares foram encontrados em células de câncer de próstata, em que o silenciamento de SRPK1 atenuou a angiogênese e o crescimento de tumores (MAVROU et al., 2015).

Sridhara et al. (2017) mostrou que SRPK2 participa da manutenção da estabilidade do genoma em células de osteosarcoma. A estabilidade do genoma pode ser afetada pelos *R-loops*, estruturas híbridas de RNA:DNA ou DNA de fita simples formadas durante a transcrição. O acúmulo de *R-loops* pode causar a instabilidade do genoma e consequentemente, quebras na fita dupla de DNA, impactando no desenvolvimento do câncer. A pausa da RNA-polimerase II em decorrência da formação dessas estruturas, inicia uma cascata de sinalização que leva à fosforilação da helicase DDX23 por SRPK2, culminando na supressão da formação dos *R-loops*. A helicase DDX23 possui um domínio RS (SRIDHARA et al., 2017).

Em linhagens de hepatocarcinoma celular, o *knockdown* de SRPK2 aumentou a expressão da proteína Numb e inibiu a proliferação, migração e invasão (LU et al., 2015). A proteína Numb está envolvida em neurogênese e também no controle da função da proteína supressora de tumor, p53, por prevenir a sua degradação dependente de ubiquitinação (COLALUCA et al., 2008). Em células de câncer de pâncreas tratadas com gemcitabine e oxaliplatin (agentes quimioteráuticos amplamente utilizados), ocorre o aumento da expressão de p53. Sob o tratamento com os quimioterápicos, o silenciamento ou a superexpressão de SRPK2 induziu o aumento ou a diminuição, respectivamente, dos níveis de Numb e p53. Esses dados indicaram que SRPK2 pode regular negativamente os níveis de p53 ativado, induzido por agentes químicos, por meio da diminuição da expressão da proteína Numb (WANG et al., 2019). Resultados semelhantes foram encontrados em células de câncer colorretal (WANG et al., 2020).

Os estudos publicados ao longo dos últimos anos permite-nos concluir que as SRPK atuam de formas diversificadas em cada processo celular, em uma célula saudável ou tumoral.

Observamos que SRPK1 afeta processos importantes em diferentes tipos de câncer, como angiogênese em cânceres de próstata (MAVROU et al., 2016) e melanoma GAMMONS et al., 2014), apoptose em câncer de mama e cólon (HAYES et al., 2007) e migração em câncer de mama (ROOSMALEN et al., 2015). Além disso, a superexpressão de SRPK1 em carcinoma das células não-pequenas do pulmão tem como principal efeito o estímulo para que as células cancerígenas apresentem o fenótipo de células estaminais, podendo se diferenciar em diversas linhagens e apresentando a capacidade de autorrenovação e divisão indefinida (GONG et al., 2016).

SRPK2 também foi encontrada envolvida em diferentes processos, como proliferação em leucemia (JANG et al., 2008), migração celular e ativação do processo de EMT em câncer de cólon (WANG et al., 2016; YANG et al., 2018), metástase em câncer de próstata (ZHUO et al., 2018), biossíntese de lipídeos (LEE et al., 2017) e manutenção da estabilidade do genoma (SRIDHARA et al., 2017).

Esta pleiotropia provavelmente está relacionada à ativação preferencial de diferentes vias de sinalização *downstream* pelas SRPK em cada câncer afetando eventos celulares diferentes. Os diversos papéis das SRPK nestes eventos podem ser mediados pela fosforilação de diferentes proteínas SR tecido-específicas ou célula-específicas, dependendo do tumor (BULLOCK; OLTEAN, 2017). Além disso, as SRPK podem estar atuando de outras formas, ainda desconhecidas, e não exclusivamente pela fosforilação de proteínas SR e regulação do *splicing* do pré-mRNA.

Observando o panorama atual em relação às últimas descobertas sobre as diferentes funções das SRPK é evidente a importância de estudos que visem elucidar os mecanismos moleculares de atuação das SRPK nas vias de sinalização, *splicing* do pré-mRNA, além de outros processos celulares, sobretudo relacionados ao desenvolvimento do câncer e formação de metástase. Dessa forma, novas descobertas poderão ser feitas sobre o papel oncogênico das SRPK, permitindo que essas cinases sirvam como potenciais biomarcadores ou como alvos terapêuticos atraentes contra o câncer.

### **1.3. A inibição farmacológica de SRPK como potencial terapêutico contra o câncer**

Estudos recentes tem mostrado o potencial da inibição farmacológica de SRPK como um alvo promissor para o controle de diferentes neoplasias, impulsionando a busca de inibidores específicos para essas cinases a fim de serem utilizados em tratamentos contra o câncer.

SRPIN340 ou N-[2-(1-piperidinil)-5-(trifluorometil) fenil] isonicotinamida é um inibidor seletivo de SRPK1 e SRPK2, derivado de isonicotinamida, capaz de diminuir a viabilidade

celular, induzir a apoptose e causar modificações no *splicing* alternativo em células de leucemia (SIQUEIRA et al., 2015). Em células de melanoma, B16F10, SRPIN340 foi capaz de reduzir a migração, invasão e formação de colônias (MOREIRA et al., 2018). *In vivo*, SRPIN340 foi capaz de inibir a tumorigênese em animais com melanoma (GAMMONS et al., 2014) e a formação de nódulos pulmonares (MOREIRA et al., 2018).

Além do SRPIN340, dois novos inibidores de SRPK1 foram identificados. O primeiro, SRPIN803, foi capaz de prevenir a produção de VEGF de forma mais eficiente do que SRPIN340, pois SRPIN803 causa a inibição de SRPK1 e CK2 (casein kinase 2) inibindo a angiogênese em degeneração macular em camundongos. Estes resultados sugerem o potencial de SRPIN803 para ser utilizado tendo como alvo a angiogênese em tumores (MOROOKA et al., 2015).

Outro inibidor de SRPK descoberto recentemente é o SPHINX, que apresenta alta seletividade para SRPK1 (GAMMONS et al., 2013). O efeito de SPHINX foi observado em câncer de pâncreas, em que a administração intraperitoneal deste composto diminuiu a expressão da isoforma pró-angiogênica de VEGF assim como reduziu o crescimento do tumor em camundongos (MAVROU et al., 2015). Em células tumorais de pulmão, o tratamento com SPHINX levou à inibição do crescimento dessas células (LIU et al., 2016).

O inibidor de SRPK1 e SRPK2 mais recentemente descoberto, SRPKIN-1, é o primeiro capaz de se ligar covalentemente à estrutura da cinase e inibir de forma irreversível a sua atividade. SRPKIN-1 é mais eficiente do que SRPIN340, pois é capaz de atenuar a fosforilação de proteínas SR em concentrações submicromolares, favorecendo a isoforma pró-angiogênica de VEGF em anti-angiogênica, além de bloquear a neovascularização em um modelo de retina murino (HATCHER et al., 2018). Considerando seu efeito proeminente em diminuir a angiogênese em doenças oculares, SRPKIN-1 também pode ser útil para inibir angiogênese em certos tipos de câncer em que SRPK1 e SRPK2 estão superexpressas.

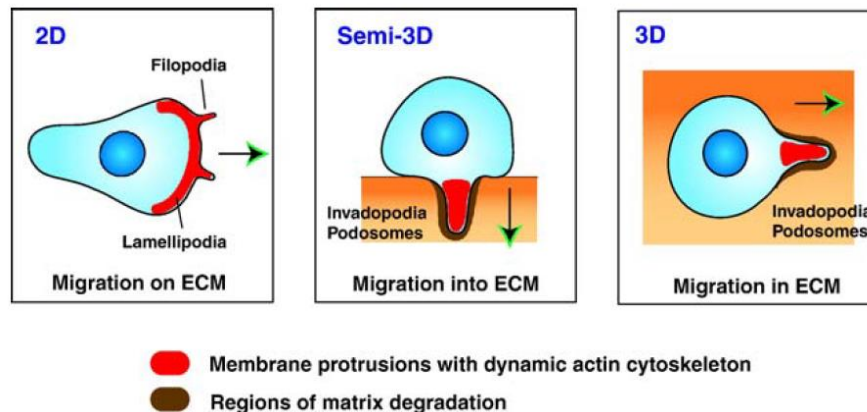
#### **1.4. A formação de metástase é dependente do remodelamento do citoesqueleto de Actina**

A Actina é uma das proteínas mais abundantes em células de mamíferos. O citoesqueleto de Actina é uma estrutura altamente conservada, formado pela polimerização de monômeros de Actina (G-Actina) em microfilamentos (F-Actina), uma estrutura altamente dinâmica e constantemente remodelada por várias proteínas de ligação à Actina. A reorganização dinâmica do citoesqueleto ocorre devido à montagem e reciclagem contínua da

Actina para manter processos celulares essenciais como endocitose, transporte intracelular, morfogênese e mobilidade celular (PAPAKONSTANTI; STOURNARAS, 2008).

A iniciação de novos filamentos de Actina e sua organização subsequente é uma etapa importante na formação de estruturas celulares especializadas, como filopodia (protrusões de membrana tipo espinhos), lamelipodia (protrusões tipo folhas), fibras de estresse (feixes elásticos), microvilosidades (saliências na superfície da membrana), invadopodia (estruturas invasivas), entre outras (STEVENSON et al., 2012).

O citoesqueleto é importante para a função celular normal, mas também pode favorecer o desenvolvimento das células tumorais auxiliando no crescimento celular, rigidez, movimento e invasividade. A Actina apresenta papel importante durante todas as etapas da formação de metástase. Inicialmente a migração celular é facilitada pela formação das protrusões de membranas especializadas dependentes da polimerização dos filamentos de Actina para romper membranas basais, invadir tecidos, vasos sanguíneos e linfáticos (MACHESKY, 2008; NICHOLSON-DYKSTRA et al., 2005; FAIX; ROTTNER, 2006; BUCCIONE et al., 2004). A movimentação de células tumorais é possível devido ao desenvolvimento das estruturas invasivas como invadopodia, lamelipodia e filopodia (CONDEELIS; SEGALL, 2003) (Figura 5).



**Figura 5. Protrusões de membrana formadas durante a migração e invasão celular.** Essas estruturas são denominadas filopodia, lamelipodia e invadopodia/podossomos, dependendo de sua morfologia, estrutura e características funcionais. Os lamelipódios são protuberâncias planas em forma de folha, formadas na borda principal das células em migração. Os filopódios são projeções finas e também são observados na frente migratória das células. Invadopodia são protuberâncias de membrana com atividade de degradação da matriz extracelular formada por células cancerígenas altamente invasivas. ECM: *extracellular matrix* (retirada de YAMAGUCHI; CONDEELIS, 2007).

Acredita-se que a lamelipodia apresenta o principal papel na condução da migração celular, gerando força para puxar a célula pra frente. Os lamelipódios contêm a maquinaria molecular que controla a polimerização/despolimerização e organização dos filamentos de Actina (NICHOLSON-DYKSTRA et al., 2005). Em resposta ao sinal de EGF, a lamelipodia é formada após alguns minutos (SEGALL et a., 1994).

Os filopódios são protrusões de membrana finas, em forma de dedos, altamente dinâmicas consistindo em filamentos de Actina agrupados e também são observados na borda das células (FAIX; ROTTNER, 2006).

Invadossomos são protuberâncias de membrana com atividade de degradação da matriz extracelular formadas por células cancerígenas altamente invasivas. Os invadossomos são compostos por várias proteínas, como Actina, proteínas reguladoras de Actina, moléculas de adesão, proteínas de remodelação da membrana e enzimas de degradação da matriz extracelular (BUCCIONE et al., 2004).

Quando as células epiteliais passam pelo processo de EMT, adquirem características de fenótipo mesenquimal e perdem suas conexões com células vizinhas. Como resultado, as células epiteliais perdem sua polaridade enquanto ganham potencial migratório e invasividade (GREENBURG; HAY, 1982). Modificações na estrutura do citoesqueleto e na expressão de genes responsáveis pela forma da célula também são observadas (KALLURI; WEINBERG, 2009). Finalmente, a EMT é caracterizada pelo aumento da contratibilidade celular e formação de fibras de estresse de Actina. Entretanto, os mecanismos específicos que controlam a dinâmica de formação de F-Actina em EMT ainda precisam ser elucidados (TESFAMARIAM; 2016).

Durante o extravasamento, as células se prendem à parede do vaso sanguíneo e passam pela matriz extracelular, para estabelecerem um novo sítio de formação do tumor. A penetração das células na parede celular é facilitada pelos invadossomos, que exercem uma função proteolítica de degradação da matriz extracelular permitindo a entrada das células em outros locais e formação de um novo tumor (SIBONY-BENYAMINI; GIL-HENN, 2012).

O citoesqueleto de Actina também contribui para a sobrevivência das células tumorais durante o seu transporte pelos vasos sanguíneos, pois auxilia na proteção das células contra a degradação e promove a formação de junções com células sanguíneas, como os eritrócitos e trombócitos. Essa interação oferece proteção física contra a destruição e prevenção contra a ação do sistema imune sobre as células cancerígenas (MACHESKY; 2008).

O processo de montagem e desmontagem dos microfilamentos de Actina é controlado pelas proteínas de ligação á Actina (ABP, *actin-binding proteins*). Essas proteínas influenciam a dinâmica de polimerização pela liberação dos monômeros de Actina a partir dos complexos de proteínas (Actina/Profilina), bloqueio das extremidades dos filamentos (Gelsolina, Vilina e Fragmina), ramificação (Complexo Arp 2/3), formação de novos sítios de polimerização (Cofilina), criação de filamentos agrupados (Fascina, Fimbrina, Swiprosina-1), estabilização das redes de Actina (Formina) (REMEDIOS et al., 2003; PARK et al., 2016b). A ligação das ABPs à Actina é controlada por cascatas de sinalização intracelulares. Em resposta a um sinal interno (pressão osmótica, concentração de  $Ca^{2+}$ ) ou externo (fatores de crescimento), as ABPs ativam as GTPases da família Rho, principais reguladoras da dinâmica de Actina durante EMT (IZDEBSKA et al., 2018).

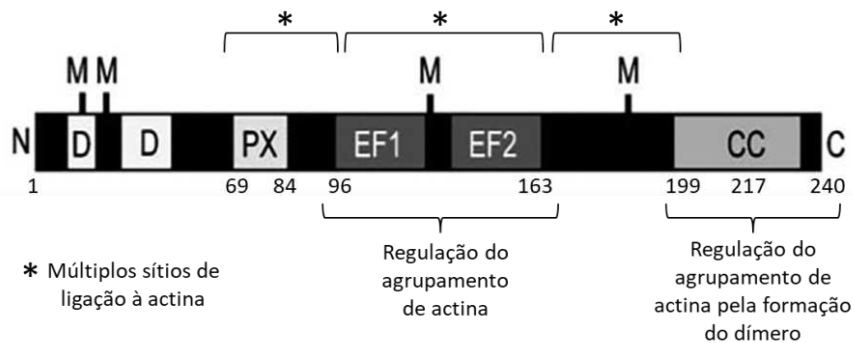
A metástase é um evento importante em relação ao aspecto mortal do câncer, porém o entendimento dos seus mecanismos moleculares ainda é um desafio para as pesquisas modernas. O citoesqueleto de Actina é composto por várias proteínas envolvidas em mobilidade, invasão, polaridade, sobrevivência e crescimento em células normais, mas também apresenta papel importante no desenvolvimento de células tumorais. A compreensão mais profunda da função das redes de proteínas que cooperam com a Actina para manter a dinâmica do citoesqueleto permitirá a obtenção de estratégias terapêuticas mais eficazes. Não há um alvo específico a ser combatido, deve-se levar em conta um conjunto de proteínas e estruturas montadas que permitem a sobrevivência e a locomoção das células tumorais.

### **1.5. EFhd2: estrutura e diversas funções**

EFhd2 ou SWSI, também conhecida como Swiprosin-1 é uma proteína de ligação á Actina que possui 240 resíduos de aminoácidos e massa molecular predita e aparente de 27 kDa e 33 kDa, respectivamente. Inicialmente EFhd2 foi identificada predominantemente em linfócitos T CD8<sup>+</sup> humanos (VUADENS et al., 2004) e posteriormente em células B imaturas em repouso ou ativadas (MIELENZ et al., 2005; AVRAMIDOU et al., 2007). Sua expressão pode ser observada em diferentes células ou tecidos como células epiteliais e endoteliais, mas principalmente no sistema nervoso central (VEGA et al., 2008; FERRER-ACOSTA et al., 2013).

Estruturalmente, EFhd2 consiste de regiões desordenadas N-terminais, dois domínios *EF-hand* (EF) e um domínio *coiled-coil* (CC) C-terminais e três sítios de ligação a proteínas contendo domínios SH3 (PX) (VUADENS et al., 2004; AVRAMIDOU et al., 2007). A

ligação de dois íons  $\text{Ca}^{2+}$  aos domínios *EF-hand* confere rigidez estrutural a EFhd2 (PARK et al., 2016a). O domínio *coiled-coil* facilita a dimerização da proteína na presença de cálcio e, juntamente com os motivos *EF-hand*, medeia a função de agrupamento dos filamentos de Actina além de facilitar a interação entre EFhd2 e outras proteínas (KWON et al., 2013). Os três sítios de ligação à Actina estão localizados entre os resíduos de aminoácidos 69-96, 96-163 e 163-199 (KWON et al., 2013) (Figura 6).



**Figura 6. Diagrama esquemático de EFhd2 mostrando seus respectivos domínios e papéis específicos na regulação da organização da Actina.** D: regiões desordenadas. M: sítios de miristoilação. PX: domínio rico em prolina. EF: domínio *EF-hand*, CC: domínio *coiled-coil* (adaptada de KWON et al., 2013; THYLUR et al., 2018).

Devido à identificação inicial de EFhd2 em células imunitárias, por muito tempo a investigação de suas funções foi focada no seu envolvimento em resposta imune (VUADENS et al., 2004; MIELENZ et al., 2005). A indução da expressão de EFhd2 pela via  $\text{PKC-}\beta/\eta$  em mastócitos sugere o seu envolvimento na resposta inflamatória dessas células (THYLUR et al., 2009). EFhd2 foi encontrada em estruturas de membrana do tipo microvilo modulando a ativação de células mastocitárias através do remodelamento de Actina, pois EFhd2 co-localiza com F-Actina em células HMC-1 (THYLUR et al., 2009).

A via de  $\text{NF}\kappa\text{B}$  é uma via de sinalização inflamatória que modula a expressão de mediadores pró-inflamatórios como citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão (LAWRENCE, 2009). O envolvimento de EFhd2 na sinalização pró-apoptótica em células B está relacionado à sua atuação como um regulador negativo da via de  $\text{NF}\kappa\text{B}$  por bloquear a expressão do gene alvo de  $\text{NF}\kappa\text{B}$ , *bclxL*. A expressão ectópica de EFhd2 nas células B levou à diminuição do potencial de membrana em condições normais, sugerindo que EFhd2 pode estar modulando a expressão de Bcl-xL em nível transcricional e influenciando a sinalização pró-apoptótica em células B imaturas (AVRAMIDOU et al., 2007).

Alternativamente, em mastócitos EFhd2 regula positivamente a via de NFκB induzindo sua atividade promotora, em parte por induzir a degradação de IκBα e aumentando a expressão das citocinas IL-3 e IL-8 (THYLUR et al., 2009). Esses resultados sugerem que EFhd2 pode estar envolvida na ativação de mastócitos como uma molécula adaptadora de sinal (THYLUR et al., 2009). Já em células T ativadas podemos observar a influência da via de NFκB sobre a expressão de EFhd2, pois o aumento da expressão de EFhd2 é mediado pela via de NFκB e PKC-θ, enquanto a sinalização por Ca<sup>2+</sup> parece exercer um efeito negativo na expressão de EFhd2 (KIM et al., 2013).

A expressão de EFhd2 está aumentada em osteoclastogênese, um processo regulado primariamente pelo ligante do receptor ativador nuclear kappa B (RANKL) (BOYLE et al., 2003). A linhagem de macrófagos RAW264 se diferencia em células multinucleadas osteoclasto-*like* na presença de RANKL e, durante a diferenciação, foi identificada uma maior expressão de EFhd2, indicando que ocorre o aumento na expressão de EFhd2 induzido por RANKL (NOMIYAMA et al., 2005).

EFhd2 regula positivamente o fluxo de Ca<sup>2+</sup> a partir do retículo endoplasmático em linhagem de células B murinas, WEHI231 (KROCZEK et al., 2010). A ativação de células B maduras é resultado da abertura de canais de Ca<sup>2+</sup> no retículo endoplasmático que ocorre em resposta à ativação do receptor de células B (BCR) e depende de outras proteínas envolvidas na sinalização a partir deste receptor, como Syk, PLCγ2 e Lyn (WANG et al., 2000). EFhd2 age como um regulador positivo do fluxo de Ca<sup>2+</sup> que ocorre pela montagem de Syk, PLCγ2 e BCR nas balsas lipídicas localizadas na membrana plasmática. Após a ativação de BCR, EFhd2 é capaz de agir como uma proteína adaptadora que estabiliza a associação de BCR com Syk e PLCγ2 aumentando a interação constitutiva de Syk e PLCγ2 com Lyn levando à abertura dos canais de Ca<sup>2+</sup> e o efluxo de Ca<sup>2+</sup> a partir do retículo para o citosol (KROCZEK et al., 2010). A região N-terminal de EFhd2 assim como a ligação de Ca<sup>2+</sup> aos seus motivos *EF-hand* estão envolvidos no controle da concentração de Ca<sup>2+</sup> intracelular em resposta à estimulação pelo receptor BCR, sendo este processo mediado por um *feedback* positivo em resposta à presença dos íons Ca<sup>2+</sup> (HAGEN et al., 2012).

Apoptose é um processo de morte celular executado por caspases que pode ser induzido por agentes quimioterápicos, radiação ionizante ou danos mitocondriais (CHECINSKA et al., 2009). EFhd2 está envolvida em apoptose em células B imaturas pela via de caspase-7 por levar à diminuição do nível de expressão da proteína antiapoptótica Bcl-xL, membro da família Bcl-2 (AVRAMIDOU et al., 2007). Em carcinoma de células não pequenas do

pulmão foi visto que EFhd2 pode se ligar a caspase 9 via proteínas ERM (*ezzrin*, *radixin* e *moesin*), responsáveis pelo *crosslink* entre proteínas de membrana e filamentos de Actina, levando a ativação de caspase-9 durante a apoptose (CHECINSKA et al., 2009). A superexpressão de EFhd2 foi observada em podócitos nos estágios iniciais de nefropatia diabética e promove apoptose dependente de mitocôndria por ativar a via de sinalização p38 MAPK nessas células (WANG et al., 2018).

A imunidade humoral leva à produção de anticorpos, ativação de células Th2, produção de citocinas, formação de um centro germinal e geração de células de memória (ERARD et al., 1993; HARRIS; GAUSE, 2011). O envolvimento de EFhd2 em imunidade humoral pode ser observado em camundongos *knockout* (EFhd2<sup>-/-</sup>), nos quais ocorre a indução da produção de IgE e IgM mediada por células Th2 a partir da infecção por helmintos (BRACHS et al., 2014). Esses resultados sugerem que EFhd2 age como um regulador negativo da imunidade humoral tipo 2, dependente do centro germinal (BRACHS et al., 2014).

EFhd2 está altamente expressa em neurônios da região cortical, no hipocampo e no tálamo em relação a outros tipos celulares do sistema nervoso central, em compartimentos axonais e dendríticos (BORGER et al., 2014). A caracterização de camundongos EFhd2 *knockout* proporcionou novas descobertas a respeito da função desta proteína no sistema nervoso central, no qual EFhd2 apresentou um impacto negativo no transporte de vesículas em neurônios do hipocampo e o *knockout* de EFhd2 aumentou a velocidade do transporte axonal (PUROHIT et al., 2014). Além disso, EFhd2 apresenta níveis de expressão alterados no córtex frontal em demência, e o *knockdown* de EFhd2 parece impulsionar a formação de novas conexões sinápticas, sendo que o mecanismo também parece estar relacionado ao efeito de EFhd2 em afetar o transporte vesicular ao longo de microtúbulos (BORGER et al., 2014).

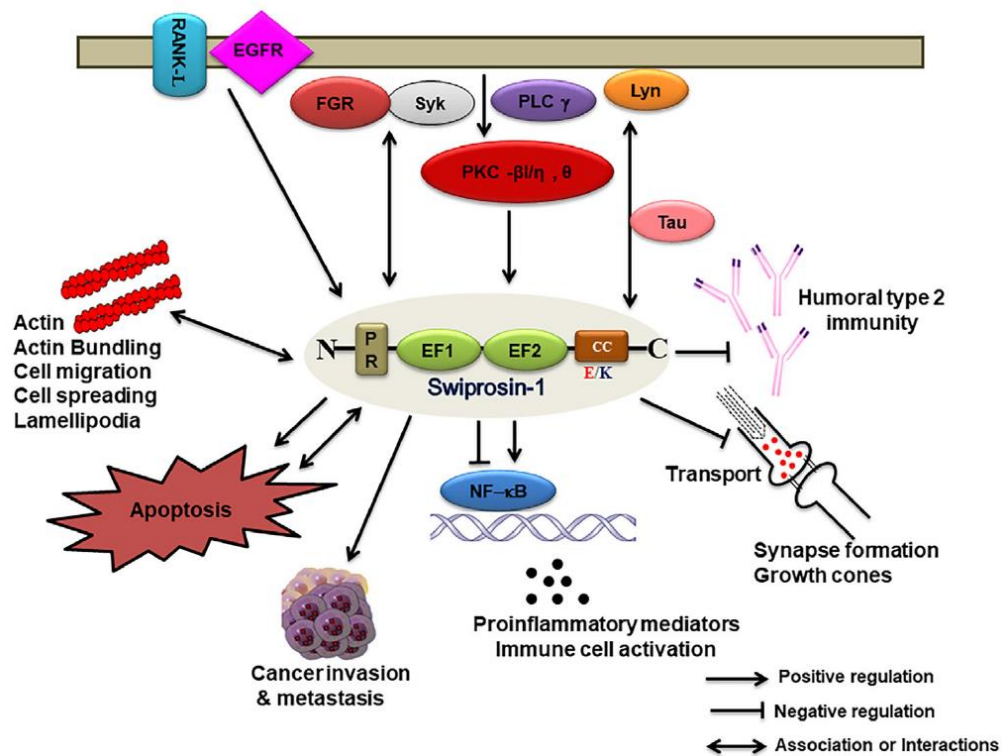
EFhd2 apresenta expressão elevada em situações patológicas como inflamação, neurodegeneração, demência, esquizofrenia e câncer (FERRER-ACOSTA et al., 2013; HUH et al., 2015). O envolvimento de EFhd2 em doenças neurodegenerativas pode estar ligado às suas características estruturais similares com proteínas amiloides encontradas em distúrbios neurológicos, como mal de Alzheimer (FERRER-ACOSTA et al., 2013). Além disso, EFhd2 é capaz de formar agregados e interagir com proteínas já conhecidas por estarem envolvidas em processos degenerativos como Tau, C9orf72 e Lrrk2 (VEGA et al., 2008; FERRER-ACOSTA et al., 2013; VEGA, 2016).

A expressão elevada de EFhd2 foi observada principalmente em lamelipodia, filopodia e nas bordas das células imunes e neuronais de mamíferos (MIELENZ et al., 2005;

AVRAMIDOU et al., 2007; THYLUR et al., 2009; FERRER-ACOSTA et al., 2013). A presença de EFhd2 nessas estruturas de protruções de membrana indica o seu papel importante no remodelamento do citoesqueleto de Actina (KWON et al., 2013). Através dos seus sítios de ligação à Actina, EFhd2 se liga diretamente à F-Actina e funciona como uma proteína estrutural importante para a formação de protruções lamelipodiais além de induzir o espalhamento celular e migração (KWON et al., 2013).

O papel de EFhd2 na regulação da polimerização do citoesqueleto de Actina também foi observado em macrófagos durante o processo de migração induzido por lipopolissacarídeos (LPS) (TU et al., 2018). A migração de macrófagos induzida por LPS ocorre a partir da reorganização do citoesqueleto de Actina e da extensão de protruções de membrana, tornando os macrófagos capazes de invadir as regiões infectadas por bactérias (KLEVETA et al., 2012). O aumento da expressão de EFhd2 induzido por LPS ocorre de forma dependente de c-Src, uma cinase que atua sobre proteínas requeridas para a nucleação e polimerização de Actina, NPFs (*actin nucleation promoting factors*) (OLIVARES et al., 2014). EFhd2 atua no processo de migração de macrófagos induzida por LPS promovendo a polimerização de Actina diretamente. LPS também induz a fosforilação de EFhd2 nos resíduos Tyr83 e Tyr104, sendo que essa fosforilação parece ser irrelevante para a sua função no remodelamento de Actina (TU et al., 2018; HUH et al., 2013). Finalmente, EFhd2 pode servir como um alvo *downstream* de c-Src no processo de migração de macrófagos induzida por LPS por ativar NPFs, incluindo N-WASP e WAVE (TU et al., 2018).

As funções diversas de EFhd2 estão resumidas na Figura 7.

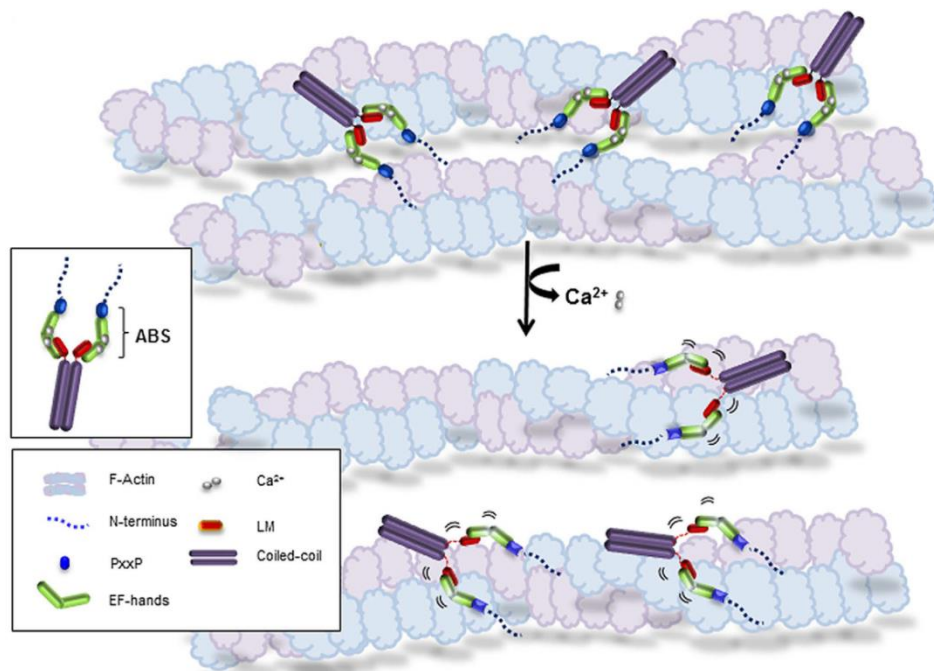


**Figura 7. Funções de EFhd2 e sua associação com vias de sinalização em diversos processos biológicos.** A expressão de EFhd2 pode ser regulada por RANK-L, PKC $\beta$ 1/ $\eta$ , PKC $\theta$  e EGFR, o que pode levar ao aumento da associação constitutiva de BCR, Syk e PLC $\gamma$ 2 em balsas lipídicas. Isso também estabiliza a associação de BCR com Syk e PLC $\gamma$ 2 aumentando a interação constitutiva de Syk e PLC $\gamma$ 2 com Lyn. A região N-terminal de EFhd2 e/ou a ligação de Ca<sup>2+</sup> ao seu domínio EF-hand são os reguladores do influxo de Ca<sup>2+</sup> desencadeado por BCR. EFhd2 exibe o papel de regulador negativo da ativação de NF $\kappa$ B por apoptose e neurodegeneração mas também pode atuar como um regulador positivo da ativação de NF $\kappa$ B por liberar mediadores inflamatórios e levar à ativação de células imunes. Durante apoptose, EFhd2 se associa com o complexo de caspase-9 e regula a invasão e metástase. EFhd2 se associa com o citoesqueleto de Actina e seus motivos EF-hand e coiled-coil regulam o agrupamento de Actina e a migração celular (espalhamento celular e lamelipódios). EFhd2 se associa com Tau em doença de Alzheimer. EFhd2 regula negativamente o transporte de microtúbulos mediado por kinesina e formação de sinapses. Finalmente, EFhd2 regula negativamente a imunidade humoral tipo-2 dependente do centro germinal (retirada de THYLUR et al., 2018).

### 1.6. Regulação da atividade de EFhd2 e sua atuação em câncer e metástase

As protrusões de membrana, como lamelipódios e filopódios, são estruturas dinâmicas caracterizadas pelo rápido *turnover* dos filamentos de Actina necessários para a migração celular (KWON et al., 2013). A dinâmica de Actina é regulada por várias proteínas que agem cooperativamente para mediar a montagem, desmontagem e a reorganização dos filamentos (POLLARD & BORISY, 2003). O complexo Arp2/3 inicia a ramificação e polimerização de F-Actina enquanto ADF/cofilin medeia a despolimerização dos filamentos modulando o *turnover* das redes de Actina (MOUNEIMNE et al., 2006; YAMAGUCHI & CHONDEELIS, 2007).

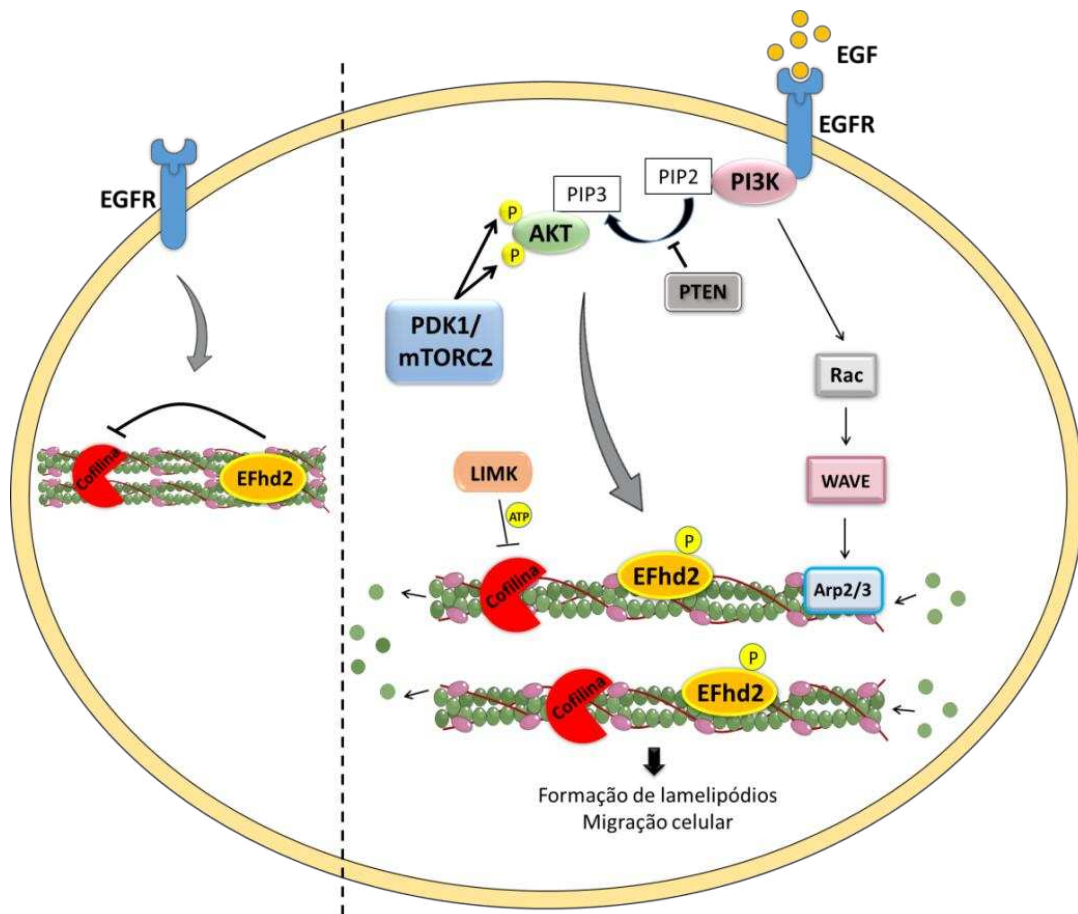
EFhd2 atua como uma proteína estrutural capaz de se ligar diretamente a Actina controlando o agrupamento dos filamentos e aumentando a migração e o espalhamento celular. Sua atuação no agrupamento de Actina é mediada pelos domínios *EF-hand* e *coiled-coil*, na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ . O domínio *coiled-coil* facilita a dimerização de EFhd2 de forma paralela, crítica para a sua função de agrupar os filamentos de Actina. A ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  não impede a interação entre EFhd2 e Actina mas interfere essencialmente no agrupamento dos filamentos mediado por EFhd2 (KWON et al., 2013; PARK et al., 2016a). A região do core de EFhd2, que compreende os domínios *EF-hand*, mantém sua estrutura na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$ , mas as modificações na flexibilidade conformacional de EFhd2 reduzem a sua atividade de agrupamento de F-Actina devido à coordenação incorreta dos sítios de ligação à Actina durante a formação do dímero paralelo (Figura 8) (PARK et al., 2016a).



**Figura 8. Modelo esquemático da atividade de EFhd2 em agrupar os filamentos de Actina.** Na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  (acima) ocorre a formação do dímero paralelo de EFhd2 e o agrupamento de F-Actina. Na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  (abaixo) ocorre o aumento da flexibilidade estrutural de EFhd2 que perde sua atividade de agrupar os filamentos, sem alterar a sua capacidade de ligação à Actina. ABS: sítio de ligação à Actina; LM:  $\alpha$ -hélice conectora; PxxP: domínio rico em prolina (retirada de PARK et al., 2016a).

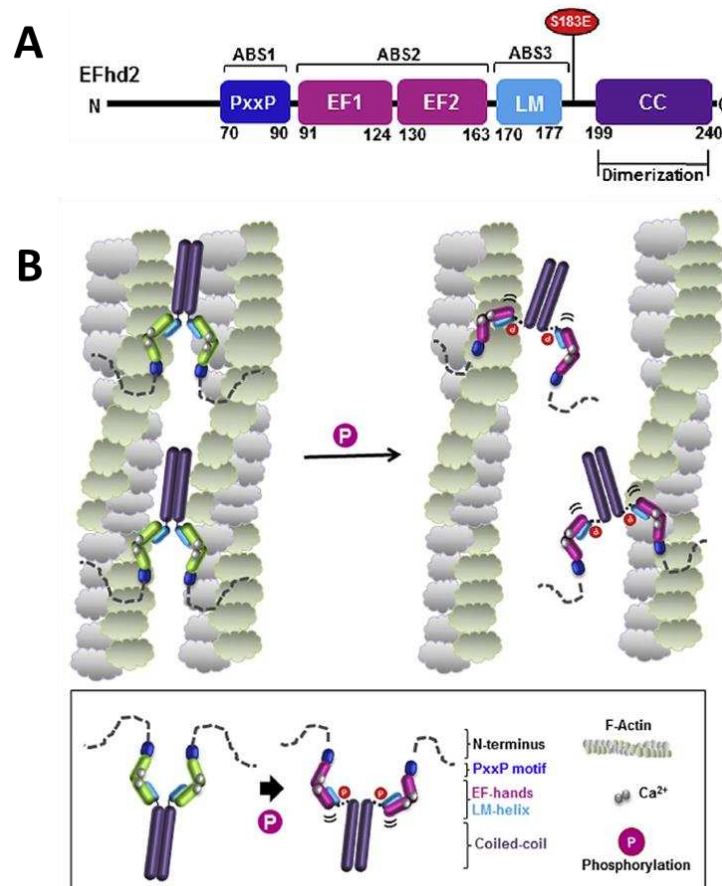
A função principal de EFhd2, relacionada ao aumento da formação dos lamelipódios, espalhamento celular e migração é regular o acesso de Cofilina aos filamentos de F-Actina (HUH et al., 2013). Cofilina é uma proteína despolimerizante de Actina capaz de se ligar a F-Actina e iniciar a separação do filamento em monômeros aumentando o *pool* de G-Actina. A

separação dos filamentos de Actina em monômeros efetuada por Cofilina aumenta a disponibilidade de extremidades livres nos filamentos que servem como substratos preferidos pelo complexo de nucleação Arp2/3 (YAMAGUCHI & CHONDEELIS, 2007). A fina regulação da atividade de Cofilina é crucial para a formação das protrusões de membrana, sendo que a atividade de Cofilina é regulada principalmente por ciclos de fosforilação e desfosforilação, mas também pelo controle do seu acesso aos filamentos de Actina mediado por EFhd2 (Figura 9) (NISHITA et al., 2005; HUH et al., 2013).



**Figura 9. Representação esquemática da via de sinalização iniciada por EGF na regulação da polimerização e despolimerização dos filamentos de Actina e o papel de EFhd2 neste processo.** EFhd2 age regulando o acesso de Cofilina à F-Actina sendo sua função regulada por fosforilação. No estado não fosforilado, EFhd2 inibe o acesso de Cofilina aos filamentos de Actina, impedindo a despolimerização dos filamentos. No estado fosforilado, induzido após a ativação da via por EGF, EFhd2 deixa de inibir a atuação de Cofilina, que pode atuar despolimerizando os filamentos (HUH et al., 2013). A fosforilação de Cofilina por LIMK inibe sua função despolimerizante de Actina (NISHITA et al., 2005). Na outra extremidade do filamento, o complexo Arp2/3 atua fazendo a nucleação de novos filamentos de Actina (YAMAGUCHI & CHONDEELIS, 2007). Este mecanismo dinâmico de polimerização/despolimerização do citoesqueleto de Actina leva à formação de lamelipódios e aumento da migração celular (HUH et al., 2013).

A atividade de EFhd2 em agrupar os filamentos de Actina é dependente de fosforilação em seu resíduo Ser183, localizado na região entre os sítios de ligação à Actina e o domínio *coiled-coil* C-terminal (HUH et al., 2013). A presença da fosforilação nessa região aumenta a sua flexibilidade e provoca repulsão eletrostática entre os sítios de ligação a Actina alterando a atividade de EFhd2 em agrupar F-Actina (Figura 10) (PARK et al., 2016b). A fosforilação em Ser183 pode ocorrer de forma transiente em resposta ao sinal de EGF sem afetar a distribuição de EFhd2 em lamelipodia e nem a sua ligação à F-Actina, mas bloqueando a capacidade de EFhd2 de inibir a atividade de Cofilina (HUH et al., 2013). A troca dinâmica entre os estados fosforilado/desfosforilado de EFhd2 é essencial para a regulação da dinâmica de Actina e mediar a formação de lamelipodia (HUH et al., 2013).



**Figura 10. Modelo esquemático do mecanismo de regulação da atividade de EFhd2 por fosforilação.** (A) Identificação dos domínios de EFhd2, destacando em vermelho a localização do resíduo de Serina 183, alvo de fosforilação. (B) EFhd2 no estado não fosforilado (à esquerda) forma uma estrutura rígida para se ligar à F-Actina. Em contraste, EFhd2 no estado fosforilado (à direita), apresenta a atividade de ligação à Actina reduzida devido à flexibilização dos sítios de ligação à Actina na estrutura dimérica. ABS: sítio de ligação à Actina; PxxP: região rica em prolina; LM-helix:  $\alpha$ -hélice conectora (retirada de PARK et al., 2016b).

A atividade de EFhd2 de regular a dinâmica de membrana lamelipodial como uma proteína de ligação e agrupamento de Actina indica o seu potencial papel em invasão e metástase (HUH et al., 2015).

A superexpressão de EFhd2 aumenta a formação de protrusões de membrana em células de melanoma murino, B16F10, e também aumenta o potencial metastático dessas células (HUH et al., 2013; HUH et al., 2015). A superexpressão de EFhd2 também foi observada em alguns tipos de cânceres humanos, como melanoma e cólon (HUH et al., 2015). Também, sua expressão está associada com o aumento da habilidade invasiva de células de câncer de pulmão, além de servir como um marcador de recorrência pós-cirúrgica em pacientes com adenocarcinoma de pulmão do tipo I (FAN et al., 2017).

Foi observada a correlação entre a expressão de EFhd2 e EGFR em células B16F10 e aumento nos níveis de EGFR fosforilado, indicando a ativação deste receptor por EGF. Na presença de EGF houve aumento da expressão de EFhd2 de forma dependente da concentração e do tempo de exposição ao EGF, indicando que EFhd2 pode ser *up*-regulada pela via de sinalização de EGFR em melanoma maligno (HUH et al., 2015). EFhd2 é capaz de modular a capacidade de invasão e metástase em melanoma murino por mediar a formação de protrusões de membrana e estimular a atividade da família de Rho GTPases, requerida para a formação de lamelipodia (HUH et al., 2015).

O processo de transição epitelial-mesenquimal medeia a dissociação de células neoplásicas a partir do tumor primário para órgãos distantes por promover o aumento da proliferação, migração e invasão, além de aumentar a resistência dessas células contra apoptose e torná-las capazes de apresentarem propriedades de células mesenquimais (KALLURI; WEINBERG, 2009; YANG et al., 2018). O *knockdown* de EFhd2 em células de câncer de pulmão diminuiu a expressão do marcador mesenquimal Vimentina e dos fatores de transcrição envolvidos no processo EMT, SNAIL, TWIST1, ZEB1 e ZEB2. Em contraste, a superexpressão de EFhd2 aumentou a expressão de Vimentina, SNAIL, TWIST1, ZEB1 e ZEB2 e reduziu a expressão do marcador epitelial, E-caderina. Coletivamente, esses dados sugerem que EFhd2 contribui para a promoção de EMT e metástase em células de adenocarcinoma de pulmão (FAN et al., 2017).

## 2. JUSTIFICATIVA

As proteínas cinase serina/arginina (SRPK) regulam a ação de fatores de *splicing* fosforilando de forma altamente específica os domínios SR encontrados em sua estrutura (XIAO e MANLEY, 1997).

Diversos estudos mostraram a expressão elevada de SRPK em vários tipos de câncer (HAYES et al., 2007; ROOSMALEN et al., 2015; GAMMONS et al., 2014; CHANG et al., 2015; GOUT et al., 2012; GONG et al., 2016; ZHOU et al., 2013; ODUNSI et al., 2012; BULLOCK et al., 2016; JANG et al., 2008; GOUT et al., 2012; WANG et al., 2016; ZHUO et al., 2018).

Fica evidente, portanto, a importância de estudos que visem esclarecer mais detalhadamente a forma de atuação de SRPK nas vias de sinalização, *splicing* do pré-mRNA, além de outros processos celulares, sobretudo relacionados ao desenvolvimento do câncer e formação de metástase. Novas descobertas sobre o papel oncogênico das SRPK certamente impactarão no uso dessas cinases como potenciais biomarcadores ou alvos terapêuticos atraentes contra o câncer.

Resultados encontrados pelo nosso grupo de pesquisa mostraram que a inibição farmacológica de SRPK leva à diminuição de formação de nódulos pulmonares em melanoma murino (MOREIRA et al., 2018). Também, a fim de descobrirmos novas proteínas parceiras de interação para SRPK2, foi realizado um ensaio de duplo-híbrido em leveduras pelo nosso grupo de pesquisa que identificou uma possível interação entre a região espaçadora de SRPK2 e EFhd2, uma proteína envolvida na regulação da dinâmica do citoesqueleto de Actina, migração celular e metástase (MELLO, 2014; HUH et al., 2015).

A atividade de SRPK2 e EFhd2 pode ser regulada pela via de sinalização iniciada por EGF. O eixo Akt-SRPK-SR constitui o ramo central na transdução de sinal de EGF para regular o programa de *splicing* no núcleo (ZHOU et al., 2012). Em células de melanoma, EGF é capaz de induzir o aumento da expressão de EFhd2 (HUH et al., 2015). EGF também é capaz de afetar a atividade de EFhd2 por induzir a fosforilação transiente em seu resíduo Ser183, bloqueando a capacidade de EFhd2 de inibir a atividade de Cofilina, uma proteína despolimerizante de Actina (HUH et al., 2013). Essa troca dinâmica entre os estados fosforilado/desfosforilado de EFhd2 é essencial para a regulação da dinâmica de Actina, mediar a formação de lamelipodia e induzir a migração celular (HUH et al., 2013).

Recentemente SRPK2 e EFhd2 foram identificadas, independentemente, envolvidas no processo de transição epitelial-mesenquimal (EMT), um evento requerido para a formação de metástase (YANG et al., 2018; FAN et al., 2017). Ambas influenciam a expressão de

proteínas consideradas marcadores de EMT, como TWIST1, um fator de transcrição que modula a expressão de moléculas de adesão e auxilia na transição epitelial-mesenquimal em células tumorais (KALLURI, R.; WEINBERG, 2009). Considerando as informações citadas, este trabalho foi desenvolvido com a finalidade de entendermos melhor o efeito da supressão da expressão de SRPK em melanoma metastático murino e desvendarmos a relação entre SRPK2 e EFhd2 nesse contexto. Esperamos que os dados obtidos possam contribuir com a busca por estratégias terapêuticas contra tumores, sobretudo metastáticos.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito da supressão da expressão de SRPK e da interação entre SRPK2 e EFhd2 no contexto do melanoma metastático murino.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Promover o silenciamento gênico de *SRPK1*, *SRPK2* ou o silenciamento simultâneo de *SRPK1* e *SRPK2* em células B16F10;
- Avaliar o efeito do silenciamento de SRPK1 e SRPK2 no desenvolvimento do melanoma subcutâneo e na formação de nódulos pulmonares em camundongos;
- Avaliar o efeito do silenciamento de SRPK1 e SRPK2 *in vitro*, nos fenótipos relacionados à capacidade metastática de células B16F10, tais como migração, invasão, proliferação e formação de colônias;
- Avaliar o efeito do silenciamento de SRPK1 e SRPK2 na polimerização de Actina em células B16F10;
- Confirmar a interação entre SRPK2 e EFhd2;
- Avaliar se EFhd2 é substrato de fosforilação para SRPK2 *in vitro* e identificar o resíduo fosforilado em EFhd2 por SRPK2.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Silenciamento de SRPK em células B16F10

#### 4.1.1. Desenho das sequências alvo e clonagem no vetor lentiCRISPRV2

Esta etapa foi realizada em parceria com a pesquisadora Dra. Ângela Saito, coordenadora do Laboratório de Organismos Modelo do LNBio/CNPEM.

A ferramenta de análise CRISPR Design Tool do MIT (<http://tools.genome-engineering.org>) (HSU et al., 2013) foi utilizada para identificar e classificar os sítios alvos mais adequados e computacionalmente prever os sítios *off-target* de cada sequência alvo. Se a sequência alvo de 20 nucleotídeos não iniciar com uma base guanina, a eficiência de transcrição do promotor U6 pode ser reduzida. Nesse caso, uma guanina foi adicionada na primeira posição da porção 5', formando uma sequência alvo de 21 bases (RAN et al. 2013).

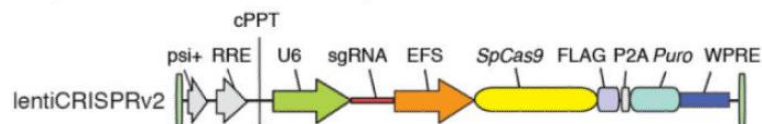
Para cada construção de RNA guia (sgRNA) (Tabela 1, Apêndice A), dois oligonucleotídeos que correspondem à fita de DNA superior e à fita inferior da sequência alvo foram fosforilados pela enzima T4 polinucleotídeo quinase (T4 PNK, NEB) e anelados através de incubação de 1 µl do oligo superior a 100 µM, 1 µl do oligo inferior a 100 µM, 1 µl de tampão 10x da T4 DNA ligase (NEB), 0,5 µl de T4 PNK e 6,5 µl de água, nas seguintes condições: incubação a 37°C por 30 min (fosforilação dos oligos), seguido de desnaturação a 95°C por 5 min, resfriamento gradual até 25°C à 0,1°C/segundo, 25°C por 10 min.

**Tabela 1.** Sequência dos sgRNAs clonadas no vetor lentiCRISPRV2. As sequências tem como alvo regiões específicas dos genes *SRPK1* ou *SRPK2*.

Vetor	Clone	Sequência do sgRNA	Alvo
lentiCRISPR SRPK1	1.1	GGCGGTTACCGGTCTCGCCA	Promotor e Exon 1
	2.1	GGTCTCGCCATGGAGCGGAA	Promotor e Exon 1
	3.1	TTACCGGTCTCGCCATGGAG	Promotor e Exon 1
lentiCRISPR SRPK2	4.1	GGCTATCATCCAGTGAAAAT	Exon 3
	5.1	AGGCTGTCTCTGTATAATGC	Exon 4
	6.3	GGCTGTCTCTGTATAATGCT	Exon 4
lentiCRISPR V2		Vetor vazio	

Para a clonagem do oligo anelado no vetor lentiviral lentiCRISPRV2 (Addgene #52961) (Figura 11), o mesmo foi digerido com a enzima de restrição BsmBI (NEB), defosforilado com a enzima fosfatase alcalina (CIP, NEB) e purificado. O vetor linearizado (50 ng) foi então ligado ao oligo anelado (1 µl) utilizando 0,5 µl de T4 DNA ligase (NEB) e tampão da T4 DNA ligase. A reação de ligação foi incubada à 16 °C por 16 h, transformada em bactérias

DH5 $\alpha$  termocompetentes e plaqueada em meio LB sólido contendo 100  $\mu$ g/ml de ampicilina. A confirmação de clonagem foi realizada por sequenciamento de DNA com o *primer* reverso U6 seq F (GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTC) (SANJANA et al., 2014).



**Figura 11. Vetor de expressão lentiviral lentiCRISPRv2.** A sequência de cada sgRNA foi clonada neste vetor que também codifica Cas9 e apresenta a marca de seleção para puromicina. Psi packaging signal (psi+), rev response element (RRE), central polypurine tract (cPPT), human U6 promoter (U6); elongation factor-1 $\alpha$  short promoter (EFS), *Streptococcus pyogenes* Cas9 (SpCas9); FLAG octapeptide tag (FLAG), 2A self-cleaving peptide (P2A), puromycin selection marker (puro), posttranscriptional regulatory element (WPRE) (adaptada de SANJANA et al., 2014).

#### 4.1.2. Produção das partículas lentivirais

A produção dos vírus foi realizada no Laboratório de Vetores Virais (LVV) do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio/CNPEM). As partículas virais foram tituladas utilizando a linhagem de células NIH3T3 tratadas com 1  $\mu$ g/ml de puromicina.

#### 4.1.3. Cultivo celular, transdução e seleção das células resistentes à puromicina

Células B16F10 foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram mantidas em cultura a 37 °C, em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>.

Para a transdução lentiviral, 1 x 10<sup>5</sup> células foram plaqueadas em cada poço da placa de 6 poços e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h. Foi preparada uma mistura contendo meio RPMI acrescido de 10% de SFB, polybreno (Sigma) (10  $\mu$ g/ml) e o volume de vírus correspondente a MOI 1 (*multiplicity of infection*) considerando a quantidade de células em cada poço igual a 2 x 10<sup>5</sup> após 24 h do plaqueamento. Em cada poço foram pipetados 3 ml da mistura preparada, e após 24 h o meio de cultivo foi descartado e substituído por 2 ml de meio RPMI acrescido de 10% de SFB e puromicina (2  $\mu$ g/ml). A cada 2 dias o meio de cultivo completo contendo puromicina (2  $\mu$ g/ml) foi substituído até que houvesse a completa eliminação das células não-infectadas (controle) e restassem apenas as células resistentes à puromicina. As células foram então transferidas para uma garrafa de cultivo (25 cm<sup>2</sup>) e incubadas em estufa por aproximadamente 1 semana até que fosse possível obter uma quantidade suficiente de células para as análises da expressão de SRPK1 e SRPK2 por *western blotting*.

Neste trabalho as células B16F10 que sofreram o silenciamento gênico de *SRPK1*, *SRPK2* ou ambas (simultaneamente) serão chamadas, respectivamente, B16F10 SRPK1<sup>-</sup>, B16F10 SRPK2<sup>-</sup> e B16F10 SRPK1/2<sup>-</sup>. As células B16F10 transduzidas com o vetor lentiCRISPRV2 vazio (controle) serão chamadas B16F10 V2.

Com o objetivo de se obter um clone de células com a menor expressão possível de SRPK1, as colônias das células B16F10 SRPK1<sup>-</sup> foram isoladas. A metodologia de isolamento de colônias de células está descrita no item 4.1.4.

#### **4.1.4. Silenciamento simultâneo de SRPK1 e SRPK2 em células B16F10**

Para realizarmos o silenciamento simultâneo de SRPK1 e SRPK2 nas células B16F10 (SRPK1/2<sup>-</sup>), inicialmente foram obtidas as células B16F10 com a expressão silenciada de SRPK2 a partir da transdução com a sequência 5.1 do sgRNA, conforme item 4.1.3.

Cerca de  $1 \times 10^5$  células foram plaqueadas em cada poço da placa de 6 poços e incubadas por 24 h em estufa a 37 °C sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Essas células foram então transduzidas com o vetor contendo a sequência 3.1 do sgRNA para *SRPK1* considerando MOI igual a 1, conforme item 4.1.3. Após 24 h iniciou-se o tratamento com puromicina (2 µg/ml) durante alguns dias até que todas as células do poço considerado controle (células B16F10 que não foram transduzidas) estivessem mortas.

A placa foi deixada em cultivo até que o poço contendo as células B16F10 SRPK1/2<sup>-</sup> estivesse confluyente. As células foram então retiradas dos poços por tripsinização, centrifugadas e ressuspendidas em 500 µl de meio RPMI completo. Este volume foi adicionado a um poço de uma nova placa de 6 poços contendo 500 µl de meio RPMI completo em cada poço. O volume foi misturado e 500 µl foram passados para o segundo poço. Este processo foi repetido em todos os poços da placa de 6 poços, e ao final, todos os volumes foram completados para 2 ml com meio RPMI completo.

A placa foi incubada em estufa durante aproximadamente 6 dias até que se verificasse o crescimento das colônias de células. As colônias isoladas foram então sugadas da placa com o auxílio de uma pipeta P1000 e cada colônia (em um total de 15) foi passada para um poço da placa de 24 poços que foi novamente incubada em estufa a 37 °C até que os poços estivessem confluentes. As células em cultivo foram expandidas para a placa de 6 poços e incubadas em estufa até que os poços atingissem a confluência próxima a 100%. As células foram então retiradas dos poços por tripsinização e o *pellet* foi preparado centrifugando-se a 500 *xg* durante 5 minutos. Foram adicionados 2 ml de meio RPMI completo sobre os poços da placa

que foi novamente incubada em estufa até que se atingisse a confluência. Esse procedimento foi repetido mais duas vezes até a obtenção da quantidade suficiente de células para a lise celular e análise da expressão de SRPK1 e SRPK2 nas células B16F10 SRPK1/2<sup>-</sup>. A lise celular e a análise da expressão das proteínas por *western blotting* estão descritas no item 4.1.5.

#### **4.1.5. Lise celular, quantificação de proteínas pelo método de Bradford e análise da expressão de SRPK1 e SRPK2 por *western blotting***

Os *pellets* de células B16F10 foram lisados em 40 µl de tampão de lise (20 mM de Tris pH 7,5, 150 mM de NaCl, 5 mM de EDTA, 1 % de NP40, 1 µg/ml dos inibidores de protease leupeptina, aprotinina e pepstatina A, 10 mM de ortovanadato de sódio e 5 mM de NaF) e deixados em gelo durante 30 minutos. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 8000 *xg* por 10 min a 4 °C e o sobrenadante (lisado total) foi coletado.

A quantificação de proteínas dos lisados foi realizada conforme metodologia adaptada de BRADFORD, 1976. Inicialmente foi construída uma curva padrão com soroalbumina bovina (BSA) (Sigma) que foi utilizada para os cálculos da concentração de proteína nas amostras. As soluções de BSA foram preparadas diluindo a BSA em tampão de lise: 14 mg/ml; 10 mg/ml; 7 mg/ml; 5 mg/ml; 2,5 mg/ml; e 1,25 mg/ml. Cada solução foi diluída 10 vezes em água destilada e utilizada na preparação da curva padrão utilizando 5 µl de cada solução de BSA e 95 µl do reagente de Bradford. A quantificação de proteínas das amostras foi realizada utilizando 95 µl de reagente de Bradford e 5 µl de amostra do lisado diluído 10 vezes em água. A leitura de absorvância foi feita a 595 nm.

A corrida eletroforética foi realizada em gel de poliacrilamida 12 % aplicando-se 40 µg de proteínas totais em cada canaleta. Posteriormente as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Biorad) a 250 mA por 2 h a 4 °C em tampão de transferência (39 mM de glicina, 48 mM de tris base e 20% de metanol). As membranas foram bloqueadas *overnight* em BSA 2% diluída em TBS-T (50 mM Tris-Cl, pH 7,6, 150 mM NaCl, 1% (v/v) Tween 20). Posteriormente, as membranas foram lavadas em TBS-T três vezes por 5 minutos cada e incubadas com os anticorpos primários por 1 h. Os anticorpos primários utilizados foram anti-SRPK1 (BD Biosciences, #611072) e anti-SRPK2 (BD Biosciences, #611118), ambos na diluição 1:1000 e anti-GAPDH (Invitrogen, #AM4300), na diluição 1:4000. As membranas foram lavadas em TBS-T três vezes durante 10 minutos cada e posteriormente foram incubadas por 1 h com o anticorpo secundário Anti-Mouse IgG (whole molecule)-

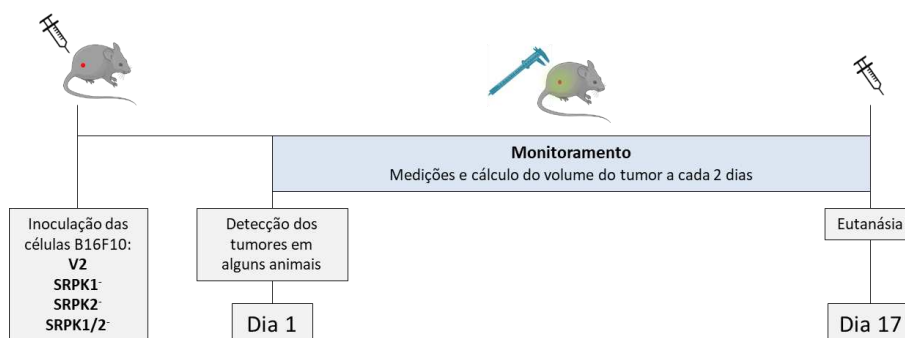
Peroxidase (Sigma, #A9044) na diluição 1:15000. Após a incubação com o anticorpo secundário as membranas foram lavadas em TBS-T três vezes de 10 minutos cada. As bandas proteicas foram visualizadas pela detecção de quimioluminescência utilizando o equipamento C-DiGit Blot Scanner (LI-COR), e como substrato, *Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare).

## 4.2. Ensaios *in vivo*

### 4.2.1. Efeito do silenciamento de SRPK no desenvolvimento do melanoma subcutâneo

Camundongos C57BL/6 machos (n=40, peso  $\cong$  23) oriundos do Biotério Central da UFV, foram mantidos no Biotério do Departamento de Biologia Geral (UFV) alojados em grupos de 5 animais em caixas de polipropileno (30 cm x 20 cm x 13 cm) e em condições controladas de temperatura ( $21 \pm 2$  °C), umidade relativa do ar (60-70%) e luminosidade (12-12 h claro/escuro). Os animais receberam comida e água *ad libitum*. Os procedimentos experimentais seguiram as normas propostas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, sendo o projeto aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFV, com número de registro 30/2019 (Anexo A).

Para a indução do crescimento tumoral subcutâneo, foi preparada uma suspensão de células de melanoma metastático murino, B16F10, silenciadas para SRPK1, SRPK2, SRPK1 e SRPK2 (simultaneamente) ou V2 (grupo controle). Cerca de 150  $\mu$ l de solução salina estéril contendo  $2 \times 10^5$  células foram inoculadas, por via subcutânea, no flanco direito dos camundongos. Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais. O esquema do experimento está representado na Figura 12.



**Figura 12. Esquema representativo do experimento *in vivo* (melanoma subcutâneo).** As células B16F10 SRPK1<sup>-</sup>, SRPK2<sup>-</sup> ou SRPK1/2<sup>-</sup> foram inoculadas no flanco direito dos animais, que foram observados ao longo dos dias. A partir da identificação dos primeiros animais com tumores, as medidas de largura e comprimento do tumor foram feitas a cada 2 dias e o seu volume foi calculado. A eutanásia dos animais foi feita no 17º dia do experimento.

A partir da identificação do aparecimento do tumor nos animais (considerado dia 1), o seu tamanho foi mensurado com um paquímetro a cada dois dias, sendo o volume calculado utilizando a fórmula  $\text{volume} = 0,52 \times D1^2 \times D2$ , em que D1 é o comprimento e D2 a largura do tumor (FIGUEIREDO et al., 2015).

No 17º dia do experimento, os animais foram anestesiados com cloridrato de xilazina (10 mg/kg/intraperitoneal) e cloridrato de quetamina (150 mg/kg/intraperitoneal). Posteriormente a anestesia foi aprofundada até a morte utilizando-se tiopental (30 mg/kg/ip).

#### **4.2.2. Análise histopatológica do tumor**

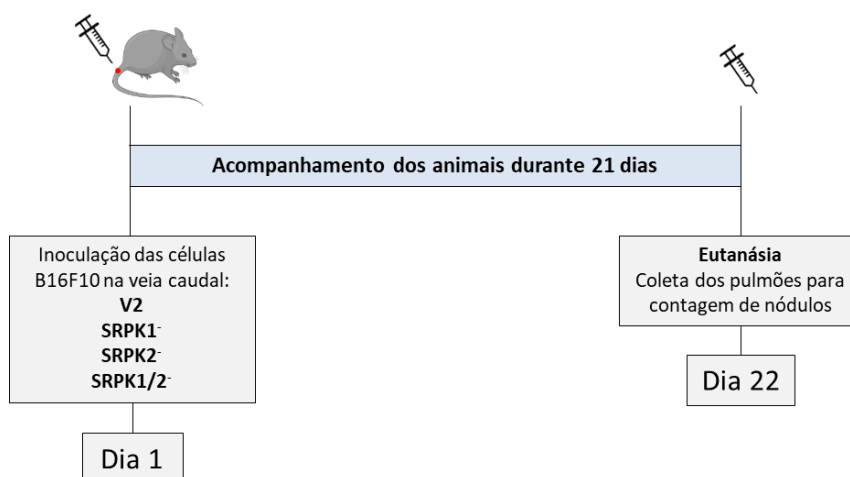
Os tumores crescidos no flanco direito dos animais foram removidos e imersos em solução fixadora de paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7,3 por 24 horas. Em seguida, os fragmentos foram desidratados em série etanólica crescente (70%, 80%, 90% e álcool absoluto), diafanizadas em xilol e incluídos em parafina. Cortes histológicos de 3 µm de espessura foram obtidos utilizando-se micrótomo rotativo (Leica, RM225) com navalhas de aço descartáveis. As lâminas contendo os cortes histológicos foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) para avaliação histopatológica geral. As lâminas foram analisadas nas objetivas de 10X e 20X e as imagens foram capturadas usando um microscópio de luz (Olympus CKX41).

#### **4.2.3. Efeito do silenciamento de SRPK na indução da formação de nódulos pulmonares**

Camundongos BALB/c machos (n=40, peso  $\cong$  23) oriundos do Biotério Central da UFV, foram mantidos no Biotério do Departamento de Biologia Geral (UFV) alojados em grupos de 5 animais em caixas de polipropileno (30 cm x 20 cm x 13 cm) e em condições controladas de temperatura ( $21 \pm 2$  °C), umidade relativa do ar (60-70%) e luminosidade (12 - 12h claro/escuro). Os animais receberam comida e água *ad libitum*. Os procedimentos experimentais seguiram as normas propostas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, sendo o projeto aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFV, com número de registro 30/2019 (Anexo A).

Para a indução da formação de nódulos pulmonares, uma suspensão de  $2 \times 10^5$  células B16F10 SRPK1<sup>-</sup>, SRPK2<sup>-</sup>, SRPK1/2<sup>-</sup> ou V2 (grupo controle) foi preparada em solução salina estéril. O volume de 200 µl contendo as células foi inoculado por via intravenosa (veia caudal) nos camundongos que foram divididos em quatro grupos experimentais (n=10/grupo). Os animais foram mantidos em observação por 21 dias. No 22º dia de experimento os animais foram sedados com xilazina (10 mg/kg/ip) e anestesiadas com cloridrato de quetamina (150

mg/kg/ip). Posteriormente a anestesia foi aprofundada até a morte utilizando-se tiopental (30 mg/kg/ip) (Figura 13). Após a eutanásia, os pulmões dos animais foram coletados e fixados em solução de paraformaldeído 4% durante 24 h. Posteriormente, os pulmões foram observados com o auxílio de uma lupa e os nódulos visíveis em sua superfície foram contados.



**Figura 13. Esquema representativo do experimento *in vivo* (indução de nódulos pulmonares).** As células B16F10 SRPK1<sup>-</sup>, SRPK2<sup>-</sup> ou SRPK1/2<sup>-</sup> foram inoculadas na veia caudal dos camundongos. Após 21 dias, os animais foram eutanasiados e os pulmões foram coletados para a contagem dos nódulos.

#### 4.2.4. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram feitas utilizando o *software* GraphPad Prism v. 6. Os resultados foram avaliados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados que apresentaram distribuição normal foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo suas médias comparadas pelo teste de Dunnett a 5% de significância. Já os resultados não paramétricos foram submetidos ao teste de Kruskal Wallis, sendo suas médias comparadas pelo teste de Dunn ( $P = 5\%$ ). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média.

### 4.3. Efeito do silenciamento de SRPK nas células B16F10 - ensaios *in vitro*

#### 4.3.1. Ensaio de migração “*wound healing*”

Neste ensaio, a análise da migração é feita por meio de um risco com uma ponteira no poço da placa de cultivo confluyente, desfazendo a monocamada de células. A porcentagem de fechamento desse risco, medido com auxílio de programas de tratamento de imagens, é um indicativo de migração celular.

Este ensaio foi realizado em triplicata utilizando as células B16F10 SRPK<sup>-</sup>. Foram plaqueadas  $8 \times 10^4$  células em cada poço da placa de 24 poços. Após 24 h do plaqueamento os riscos foram feitos nos poços da placa com o auxílio de uma ponteira, os poços foram lavados e o meio de cultivo foi substituído por meio RPMI com 2% de soro fetal bovino acrescido de EGF na concentração de 100 ng/ml (ZHOU et al., 2012). Imediatamente após o risco e o tratamento com EGF os poços foram fotografados no tempo zero e as placas foram incubadas a 37 °C em estufa. Após 24 h de incubação os riscos foram fotografados novamente e o comprimento da fenda foi medido utilizando o *software* ImageJ.

#### 4.3.2. Ensaio de proliferação

Este ensaio foi realizado por meio da marcação da proteína indicadora de proliferação celular, Ki67, por imunofluorescência. A proteína Ki67 está presente nas células durante todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e M) mas está ausente na fase G0 (GERDES et al., 1984). Essa característica faz com que a expressão de Ki67 esteja associada com a atividade proliferativa das células, sendo um marcador clinicamente importante, indicativo de agressividade de vários tipos de tumores (GERDES et al., 1987; DOWSETT et al., 2011; TU et al., 2011).

Cerca de  $2 \times 10^4$  células B16F10 SRPK<sup>-</sup> foram plaqueadas em placas de 24 poços contendo uma lamínula circular (13 mm de diâmetro) em cada poço. As placas foram incubadas em estufa durante 24 h ou 48 h a 37 °C, numa atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultivo dos poços foi descartado e as células foram lavadas com 1 ml de PBS pH 7,4 e fixadas com 250 µl de solução paraformaldeído 4 % (v/v) diluído em PBS por 15 minutos. Para a permeabilização e bloqueio, cada lamínula contendo as células foi incubada com 250 µl de solução Triton X-100 0,5 % (v/v) e 2 % (m/v) de BSA diluídos em PBS durante 1 h. As células foram lavadas com PBS duas vezes, 5 minutos cada lavagem e em seguida foi feita a marcação da proteína Ki67 nas células com o anti-Ki67 (Abcam, #ab16667) na diluição 1:100 durante 1 h. Após a marcação com o anticorpo primário, as células foram lavadas 5x com PBS e incubadas com o anticorpo secundário anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 (ThermoFisher Scientific, #A11008) na diluição 1:100 por 1 h. Em seguida as células foram novamente lavadas cinco vezes com PBS e as lâminas foram montadas utilizando Prolong Diamond® com DAPI (ThermoFisher Scientific). As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência EVOS® (Life Technologies) e utilizando os filtros DAPI LED CUBE e GFP LED CUBE.

As células que apresentaram fluorescência (indicando a expressão de Ki67) foram contadas utilizando o *software* GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc.) e os valores obtidos foram utilizados para calcular a proporção de células expressando Ki67 em relação ao número de células totais em cada imagem (contadas por meio da identificação do núcleo corado com DAPI). Cada lamínula foi fotografada em 5 campos diferentes.

#### **4.3.3. Ensaio de invasão em matrigel**

Para avaliar a influência do silenciamento de SRPK na capacidade de invasão das células B16F10, este experimento foi realizado utilizando insertos *transwell* com o tamanho do poro de 8  $\mu\text{m}$  (Corning Life Sciences). O volume de 35  $\mu\text{l}$  de Matrigel (BD Biosciences) foi diluído em meio isento de soro (1:12), adicionado à parte superior dos insertos *transwell* e deixado durante 2 h a 37 ° C para permitir a formação do gel.

Os insertos *transwell* cobertos com matrigel foram colocados sobre o poço da placa de 24 poços e sobre eles, foi adicionado o volume de 200  $\mu\text{l}$  contendo  $5 \times 10^4$  células diluídas em meio RPMI isento de soro. Os poços da placa foram preenchidos com 650  $\mu\text{l}$  de meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino que serviu como um quimioatratador para a invasão pelas células. As placas foram incubadas durante 24 h a 37 °C numa atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . Após esse tempo, as células na parte inferior dos insertos foram fixadas durante 30 minutos com metanol e as células contidas na parte superior da câmara foram removidas com uma haste flexível de algodão. As unidades *transwell* foram removidas das placas e coradas com azul de toluidina a 1% (Sigma) durante 15 min. Os insertos *transwell* foram fotografados em microscópio de luz (Leica) no aumento 20x em quatro campos diferentes e as células que passaram para o lado inferior da câmara foram contabilizadas utilizando o *software* ImageJ.

#### **4.3.4. Ensaio de formação de colônia**

Este ensaio de sobrevivência celular *in vitro* é baseado na capacidade de uma única célula se transformar em uma colônia, testando essencialmente a capacidade das células da população de sofrer divisão ilimitada (PUCK; MARCUS, 1956).

Em cada poço da placa de 6 poços foram semeadas  $1 \times 10^3$  células B16F10 com a expressão silenciada de SRPK, diluídas em 2 ml de meio de cultura RPMI com 2% de SFB. Após o período de 14 dias de experimento, as células foram fixadas com metanol e coradas com azul de toluidina 1% (Sigma). As colônias foram identificadas por meio de análise com microscópio óptico e contadas a olho nu. As imagens representativas das colônias foram obtidas através de fotografia macroscópica dos poços da placa de cultivo.

#### **4.3.5. Efeito do silenciamento de SRPK no citoesqueleto de Actina das células B16F10**

Foram plaqueadas  $2 \times 10^4$  células B16F10 SRPK<sup>-</sup> em placa de 24 poços contendo uma lamínula circular previamente autoclavada em cada poço. A placa foi incubada em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C, em atmosfera úmida. Após 24 h do plaqueamento, as células foram tratadas com EGF (100 ng/ml) por 1 h (ZHOU et al., 2012).

O meio de cultivo dos poços foi descartado e as células foram lavadas com 1 ml de PBS pH 7,4 e fixadas com 250 µl de solução paraformaldeído 4 % (v/v) diluído em PBS por 15 minutos. Para a permeabilização e bloqueio, foram adicionados 250 µl de solução Triton X-100 0,5 % (v/v) e 2 % (m/v) de BSA diluídos em PBS. Em seguida as células foram lavadas com PBS duas vezes, 5 minutos cada lavagem.

A marcação dos filamentos de Actina foi feita utilizando em cada poço 1,4 µl de Rhodamine Phalloidin (Thermo Scientific) (6,6 µM) diluída em 250 µl de PBS por 20 minutos. As células foram lavadas com PBS e as lâminas foram montadas utilizando Prolong Diamond® com DAPI (Molecular Probes). As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência EVOS® utilizando o filtro RED CUBE.

#### **4.4. RT-qPCR**

O RNA total das amostras foi extraído utilizando o TRI Reagent (Sigma) seguindo o protocolo do fabricante. A quantificação de RNA das amostras foi realizada por espectrofotometria (NanoDrop - Thermo Scientific) e analisado quanto à integridade em gel de agarose a 1,5%. O volume correspondente a 1600 ng de RNA extraído de cada amostra foi tratado com 1 µl de DNase (Invitrogen) durante 30 minutos a 37 °C em um volume total de 10 µl. Posteriormente a DNase foi inativada com 1 µl de EDTA 50 mM durante 10 minutos a 65 °C.

O RNA tratado com DNase foi utilizado para a síntese do DNA complementar (cDNA). Para a síntese de cDNA das amostras de células B16F10 foi utilizado o kit Platus Transcriber RNase H- cDNA First Strand (Sinapse Inc) conforme descrito no manual do produto. Para a síntese de cDNA a partir das amostras de tumores foi utilizado o kit High-capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems).

Para a realização da PCR quantitativa foi utilizado o kit comercial GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) e o termociclador Real Time PCR 7500 (Applied Biosystems). Cada reação individual foi composta de 20 ng de cDNA, 5 µl de GoTaq® qPCR Master Mix 2X,

300 nM do corante de referência (CXR), 0,5 µM de cada *primer* (*forward* ou *reverse*) (Tabela 2) e água *nuclease-free* completando o volume para 10 µl. A amplificação do cDNA foi executada nas seguintes condições: desnaturação das amostras de cDNA a 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 15 segundos, anelamento e extensão a 60 °C por 1 minuto. A curva de *melting* foi construída a partir da desnaturação a 95 °C por 15 segundos, anelamento a 60 °C por 1 minuto, 95 °C por 30 segundos e 60 °C por 15 segundos.

As curvas padrão para os genes em análise foram construídas fazendo a diluição seriada (fator 2) da amostra de cDNA do grupo controle (V2) e projetando-se os valores de Ct em função do logaritmo da concentração de cDNA (BUSTIN et al., 2009) (Apêndice D e Apêndice E). As amostras obtidas a partir do experimento *in vitro* foram analisadas em triplicata. As amostras obtidas a partir do experimento *in vivo* foram analisadas em duplicata e 6 replicatas biológicas.

**Tabela 2.** Sequência dos *primers* utilizados no RT-PCR quantitativo.

<i>Primers</i>	Sequência 5'→3'	Referência
GAPDH_F	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA	TAN et al., 2012
GAPDH_R	CCTGCTTCACCACCTTCTTGA	
IL6_F	TCCTTCCTACCCCAATTTCC	CHEN et al., 2016
IL6_R	GCCACTCCTTCTGTGACTCC	
IL8_F	CAAGGCTGGTCCATGCTCC	SUN et al., 2017
IL8_R	TGCTATCACTTCCTTTCTGTTGC	
TNFα_F	TATGGCTCAGGGTCCAACCTC	SAHA et al., 2010
TNFα_R	CCCATTTGAGTCCTTGATGG	
VIMENTIN_F	CGGAAAGTGGAATCCTTGCAGG	RONCA et al., 2013
VIMENTIN_R	AGCAGTGAGGTCAGGCTTGGAA	
NCAD_F	CCTTCTCAATGTGAAATTCAGC	TAN et al., 2012
NCAD_R	CCACCTTGAAATCTGCTGG	
ECAD_F	TCAGTCCGAGGTCTACAC	RONCA et al., 2013
ECAD_R	CTTCAAATCTCACTCTGCCC	
SNAIL_F	CCACTGCAACCGTGCTTTT	TAN et al., 2012
SNAIL_R	CACATCCGAGTGGGTTTGG	

## 4.5. Avaliação da interação entre SRPK2 e EFhd2

### 4.5.1. Ensaio de co-imunoprecipitação

#### 4.5.1.1. Cultivo celular

A linhagem de célula HEK293T (*Human Embryonic Kidney*) foi mantida em meio DMEM suplementados com 10 % de soro fetal bovino e penicilina 100 U/ml, incubada a 37 °C sob atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub>.

#### 4.5.1.2. Transfecção das células

A metodologia para transfecção de HEK293T foi adaptada de Longo et al. (2013). 5 x 10<sup>6</sup> células foram plaqueadas em cada garrafa (182 cm<sup>2</sup>) e incubadas por 24 h, a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultivo DMEM contido em cada garrafa, acrescido de 10% de soro fetal bovino, foi substituído por meio DMEM livre de soro após 24 h de incubação e imediatamente antes da transfecção.

As células foram transfectadas utilizando como agente de transfecção o polyethylenimine (PEI - Polysciences), na proporção de 1:2,5 (DNA:PEI). Os clones pcDNA5/FRT/TO/SRPK2 e pEGFP-C1/EFhd2 utilizados no ensaio de co-imunoprecipitação foram obtidos por SILVA (2017).

A mistura para transfecção foi preparada adicionando-se 20 µg de cada plasmídeo, 100 µl de PEI (1 µg/ml) e completando o volume para 700 µl com DMEM contendo penicilina, mas livre de soro.

**Tabela 3.** Combinações de plasmídeos, volume de PEI (polyethylenimine) e meio de cultivo DMEM utilizados para a transfecção de células HEK293T no ensaio de co-imunoprecipitação. FRT: *FLP Recombination Target site*.

	<b>Tubo 1 (controle)</b>	<b>Tubo 2</b>
<b>pEGFP-C1/vazio</b>	20 µg	-
<b>pcDNA5/FRT/TO/SRPK2</b>	20 µg	20 µg
<b>pEGFP-C1/EFhd2</b>	-	20 µg
<b>PEI (1 µg/ml)</b>	100 µl	100 µl
<b>DMEM</b>	Completar o volume para 700 µl	

O volume contido em cada tubo foi agitado em vortex em rotação mínima por 10 s e deixado em repouso à temperatura ambiente por 15 minutos. A mistura foi gotejada sobre o meio de cultivo contido em cada garrafa cuidadosamente e as garrafas foram novamente

incubadas a 37 °C por 3 h. Após esse tempo, o meio de cultivo das garrafas foi substituído por meio DMEM acrescido de 10 % de soro e as garrafas foram incubadas em estufa a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> durante 40 h. Posteriormente, os *pellets* das células transfectadas foram preparados centrifugando-se a 1800 rpm por 5 minutos.

#### 4.5.1.3. Co-imunoprecipitação de FLAG-SRPK2 e GFP-EFhd2

Cada *pellet* de células HEK293T transfectadas foi lisado em 800 µl de tampão de lise (item 4.1.5) e a quantificação de proteínas do lisado total de células HEK293T transfectadas foi realizada a partir da metodologia de Bradford (BRADFORD, M. M., 1976), item 4.1.5.

A resina de agarose proteína A (Sigma) foi utilizada no ensaio de co-imunoprecipitação. Inicialmente a resina foi equilibrada em tampão NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/NaCl (0,02 M de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,15 M de NaCl, pH 8,0) respeitando a proporção em volume 1:4 (resina:tampão).

Foi realizada uma etapa de clareamento das amostras adicionando-se 45 µl da suspensão de resina (50 % m/v) sobre 700 µl de cada lisado total e incubando a 4 °C por 30 minutos, sob agitação lenta. As amostras foram centrifugadas a 8000 *xg* por 1 minuto e o sobrenadante transferido para um novo tubo, contendo 90 µl de resina (50 % m/v) e 6 µg do anticorpo monoclonal anti-FLAG M2 produzido em camundongo (Sigma, #F1804). Os tubos foram incubados a 4 °C *overnight*, sob agitação. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 8000 *xg* por 1 minuto, removeu-se o sobrenadante e foram feitas quatro lavagens da resina com 360 µl de tampão de lise (20 mM de Tris pH 7,5, 150 mM de NaCl, 5 mM de EDTA, 1 % de NP40) e mais duas lavagens no tampão 20 mM de Tris pH 7,5, 150 mM de NaCl, 5 mM de EDTA, 0,1 % de NP40. Após cada lavagem, a resina foi centrifugada a 8000 *xg* por 1 minuto e o sobrenadante foi descartado.

Após a última lavagem, foram adicionados sobre a resina 55 µl de tampão de amostra 1X (50 mM de Tris-HCl pH 6,8, 100 mM de β-mercaptoetanol, 0,5 % SDS, 0,1 % de azul de bromofenol, 10% de glicerol). A mistura foi fervida a 95 °C por 5 minutos, centrifugada por 1 min a 10000 *xg* à temperatura ambiente e o sobrenadante foi recolhido.

As proteínas foram detectadas por *western blotting* conforme metodologia descrita no item 4.1.5. A corrida eletroforética foi realizada em gel de poliacrilamida 12 % aplicando-se 20 µl das amostras provenientes da co-imunoprecipitação e 50 µg de proteínas totais dos lisados de HEK293T transfectadas. A detecção de GFP-EFhd2 foi realizada utilizando anti-GFP-HRP (1:3000) produzido em camundongo (Miltenyi Biotec, #130-091-833). FLAG-

SRPK2 foi detectada com anti-SRPK2 (1:500) produzido em camundongo (BD Biosciences, #611118).

#### **4.5.2. GST-Pulldown**

##### **4.5.2.1. Expressão de GST-EFhd2 e GST em sistema procarioto e lise celular**

GST-EFhd2 ou GST foram expressas em *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL, conforme as metodologias previamente estabelecidas no laboratório. O clone pET28a/GST/TEV/EFhd2 foi obtido por SILVA, 2017.

*E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL foi transformada por choque térmico com pET28a/GST/TEV/EFhd2 ou pET28a/GST/TEV. Uma colônia transformada foi inoculada em 5 ml de meio LB contendo 50 µg/ml de canamicina e incubada *overnight* a 37 °C, 180 rpm. Esse pré-inóculo foi transferido para 500 ml de LB acrescido de 50 µg/ml de canamicina e incubado a 37 °C e 180 rpm até atingir a densidade ótica na faixa de 0,6-0,8. Para a indução de GST-EFhd2 foi adicionado 0,1 mM de IPTG à cultura e incubou-se por 2 h, 37°C e 180 rpm. Para a indução de GST foi adicionado 1 mM de IPTG à cultura e incubou-se por 4 h, 37°C e 180 rpm.

Após a indução, cada 100 ml de cultura foram centrifugados a 5000 rpm por 10 min a 4 °C. Cada *pellet* foi ressuspendido em 4 ml de tampão de lise (50 mM de Tris pH 7,4, 150 mM de NaCl, 2 mM de EDTA e 2 mM de DTT, 1 µg/ml de cada um dos inibidores de protease aprotinina, pepstatina A e leupeptina, e 300 µg/ml de lisozima). Os tubos foram incubados em gelo por 30 min e sonicados a uma amplitude de 20 nm por 4 min em intervalos de 10 segundos. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 8000 *xg* por 15 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram coletados (fração solúvel).

##### **4.5.2.2. Expressão de 6xHis-SRPK1 e 6xHis-SRPK2 em sistema procarioto e lise celular**

As SRPK foram expressas em *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL, conforme as metodologias previamente estabelecidas no laboratório (BARBOSA, 2013).

*E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL foi transformada via choque térmico com pET28a/SRPK1 ou pET28a/SRPK2. As condições de indução de 6xHis-SRPK1 foram 0,25 mM de IPTG, incubação por 20 h a 30 °C a 180 rpm. 6xhis-SRPK2 foi induzida utilizando-se

0,25 mM de IPTG, incubação a 37 °C por 2 h e 180 rpm. Alíquotas de 100 ml de cultura foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 min a 4 °C.

Cada *pellet* proveniente da indução de SRPK1 ou SRPK2 foi lisado em 2 ml de tampão. Para SRPK1 foi utilizado o tampão 20 mM de tampão fosfato pH 7,4, 500 mM de NaCl 20 mM de imidazol. Para SRPK2 foi utilizado o tampão 50 mM de HEPES pH 7,5, 500 mM de NaCl, 5 % de glicerol, 10 mM imidazol. Os tampões de lise foram acrescidos de 1 µg/ml de cada um dos dos inibidores de protease aprotinina, pepstatina A e leupeptina e 300 µg/ml de lisozima. Após a ressuspensão em tampão de lise as amostras foram incubadas em gelo por 30 minutos e sonicadas a 20 nm por 5 minutos em intervalos de 30 segundos. A seguir, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 8000 *xg*, 4 °C para a obtenção da fração solúvel.

#### **4.5.2.3. Purificação de 6xHis-SRPK1 ou 6xHis-SRPK2 por cromatografia de afinidade em FPLC**

Para a purificação de 6xHis-SRPK1 na fração solúvel foi utilizado o sistema FPLC em coluna carregada com resina de níquel HiTrap Chelating HP (GE Healthcare). Esta coluna é apropriada para a purificação de proteínas fusionadas à cauda de histidina devido à alta afinidade do níquel por estes resíduos. O tampão A consistia em 20 mM de fosfato de sódio, 500 mM de NaCl e 20 mM de imidazol e o tampão B consistia em 20 mM de fosfato de sódio, 500 mM de NaCl e 500 mM de imidazol. 6xHis-SRPK1 foi dialisada em tampão 20 mM de Tris base pH 7,4 e 300 mM de NaCl.

O mesmo sistema FPLC foi utilizado para a purificação de 6xHis-SRPK2 da fração solúvel, sendo o tampão A constituído de 50 mM HEPES pH 7,5, 500 mM NaCl, 10 mM imidazol e 5 % de glicerol e o tampão B, 50 mM HEPES pH 7,5, 500 mM NaCl, 300 mM imidazol e 5% de glicerol. 6xHis-SRPK2 foi dialisada em tampão 25 mM Tris base pH 7,4, 100 mM de NaCl e 2 mM de EDTA.

#### **4.5.2.4. Ligação das proteínas GST à resina de sepharose-glutationa**

Foi utilizada a resina de Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare). 40 µl (50 % m/v) da resina foram pré-equilibrados em 200 µl de PBS pH 7,3 (137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 10 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 2 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) seguidas da centrifugação a 500 g por 5 min e descarte do sobrenadante. A lavagem da resina com PBS foi repetida 3 vezes. A resina pré-equilibrada foi incubada por 1 h com 2 ml de fração solúvel do lisado de GST-Efhd2 ou GST

acrescido de 1% de triton X-100, à 4°C, sob leve agitação. GST livre foi utilizada como controle negativo do ensaio de interação.

#### 4.5.2.5. GST-Pulldown

GST-EFhd2 ou GST ligadas à resina de glutationa-sefarose foram incubadas com 1 ml de 6xHis-SRPK1 ou 6xHis-SRPK2 purificadas por cromatografia de afinidade em coluna de níquel, ambas na concentração de 0,4 mg/ml. A incubação foi feita à 4 °C, por 1 h.

Após a incubação, a resina foi lavada 3 vezes com 200 µl do tampão 50 mM de Tris-HCl pH 8,0, 1% NP40 e centrifugada a 500 g por 1 minuto. A eluição das proteínas ligadas à resina foi feita utilizando 40 µl do tampão de eluição (50 mM de Tris-HCl, 10 mM de glutationa reduzida, pH 8,0) à temperatura ambiente por 10 min sob agitação suave. Após a eluição centrifugou-se a 500 g por 1 minuto e o sobrenadante (contendo as proteínas eluídas) foi recuperado.

A detecção das proteínas foi feita por *western blotting* (item 4.1.5). A eletroforese em gel de poliácridamida foi realizada aplicando 15 µl do lisado total das proteínas fusionadas à GST, 15 µl das SRPKs purificadas e 15 µl das amostras provenientes do ensaio de *pulldown*. Os anticorpos primários utilizados foram: anti-GST (1:100) – proveniente de hibridoma de camundongo, gentilmente doado pelo pesquisador Dr. Jörg Kobarg/Unicamp - e anti-his (1:1000) produzido em camundongo (Sigma, #H1029). O anticorpo secundário utilizado foi anti-mouse IgG (whole molecule)-Peroxidase (Sigma, #A9044) na diluição de 1:5000. As bandas proteicas foram visualizadas utilizando os reagentes  $\gamma,\gamma'$ -Diaminobenzidine (Sigma) e peróxido de hidrogênio (Sigma).

#### 4.6. Ensaio de fosforilação *in vitro* utilizando ATP radioativo

Este ensaio foi realizado no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) em parceria com a pesquisadora Dra. Juliana Helena Costa Smetana.

O objetivo deste ensaio foi avaliar se o efeito da interação entre SRPK2 e EFhd2 ocorre pela relação enzima/substrato. Como substratos foram utilizados GST-EFhd2, GST-SF2/ASF (controle positivo) ou GST (controle negativo).

As reações foram realizadas em tampão 10X (Hepes 20 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM), ATP 0,25 mM e 1µCi de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP. Cada reação teve o volume total de 20 µl sendo 2 µl do tampão 10X, 5 µl de 6xHis-SRPK2 (0,4 mg/ml), 1,5 µl de ATP $\gamma$ <sup>32</sup> e 0,5 µl de ATP. O substrato utilizado em cada reação foi previamente ligado à resina de glutationa-

sefarose conforme metodologia descrita no item 4.5.2.4. Os volumes de substrato ligado à resina de glutationa-sefarose e de H<sub>2</sub>O utilizados em cada reação estão indicados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Composição de cada reação realizada no ensaio de fosforilação utilizando ATP radioativo. Foi mantido o volume fixo de 6xHis-SRPK2 e volumes crescentes de cada substrato GST-EFhd2 ou GST (controle negativo). Para a reação considerada controle positivo do ensaio (reação 1), GST-SF2/ASF foi utilizada em um volume fixo (10,0 µl).

	Reação						
	1	2	3	4	5	6	7
<b>H<sub>2</sub>O</b>	1,0 µl	8,5 µl	6,0 µl	1,0 µl	8,5 µl	6,0 µl	1,0 µl
<b>GST-SF2/ASF</b>	10,0 µl	-	-	-	-	-	-
<b>GST</b>	-	-	-	-	2,5 µl	5,0 µl	10,0 µl
<b>GST-EFhd2</b>	-	2,5 µl	5,0 µl	10,0 µl	-	-	-
<b>6xHis-SRPK2</b>	5,0 µl	5,0 µl	5,0 µl	5,0 µl	5,0 µl	5,0 µl	5,0 µl
<b>Tampão 10x</b>	2,0 µl	2,0 µl	2,0 µl	2,0 µl	2,0 µl	2,0 µl	2,0 µl
<b>ATP<sup>γ32</sup></b>	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl
<b>ATP</b>	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl

A reação de fosforilação foi incubada por 30 minutos a 30 °C. Posteriormente, as amostras foram fervidas em tampão de amostra 4X e analisadas por eletroforese em gel SDS-PAGE 10% de poliacrilamida. Após a corrida eletroforética o gel foi colocado em contato com o filme radiográfico durante 72 h para que fosse possível a identificação das bandas correspondentes às proteínas fosforiladas. Simultaneamente foi feito outro gel SDS-PAGE 10% com amostras da reação de fosforilação que continham apenas ATP e não ATP<sup>γ32</sup>.

#### 4.7. Ensaio de fosforilação *in vitro* e análise por espectrometria de massas

Este ensaio foi realizado no Instituto de Biologia Integrativa do Departamento de Bioquímica, da Universidade de Liverpool, em parceria com o professor Dr. Patrick Eyers. O objetivo do ensaio foi identificar o resíduo de aminoácido de EFhd2 que pode ser fosforilado por SRPK2.

##### 4.7.1. Expressão e purificação de 6xHis-SRPK2 e 6xHis-EFhd2 e preparo das reações de fosforilação

A indução da expressão das proteínas 6xHis-SRPK2 e 6xHis-EFhd2 foi feita em *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Novagen) utilizando 0,5 mM de IPTG por 18 h a 18 °C. As proteínas

foram purificadas por cromatografia de afinidade e cromatografia de exclusão molecular utilizando a coluna HiLoad 16/600 Superdex 200 (GE Healthcare) equilibrada em 50 mM Tris/HCl, pH 7,4, 100 mM NaCl, 1 mM DTT e 10 % (v/v) glicerol.

As reações de fosforilação foram preparadas utilizando 2 µg de cada proteína purificada (6xHis-EFhd2 ou 6xHis-SRPK2). As proteínas foram incubadas por 16 h na presença de 1 mM de ATP e 10 mM de MgCl<sub>2</sub>. O tampão utilizado foi 50 mM Tris/HCl, pH 7,4, 100 mM NaCl, and 1 mM DTT. Como controle, ambas as proteínas (6xHis-EFhd2 ou 6xHis-SRPK2) foram incubadas isoladamente nas mesmas condições experimentais descritas acima.

#### **4.7.2. Identificação do sítio de fosforilação em EFhd2 por espectrometria de massas**

As misturas das reações preparadas anteriormente foram analisadas por espectrometria de massas (MS). As ligações dissulfeto das proteínas foram reduzidas com DTT 3 mM e solução de bicarbonato de amônio 25 mM (AMBIC) durante 10 minutos, a 60 °C. Os resíduos de cisteína livres foram alquilados com iodoacetamida 14 mM durante 30 minutos à temperatura ambiente e protegidos da luz. A reação de alquilação foi parada adicionando DTT para a concentração final de 7 mM. As proteínas foram digeridas usando tripsina 2% (m/m) (PROMEGA) *overnight*, a 37 °C, sob agitação.

Para a dessalinização dos peptídeos, foram utilizadas ponteiras de 200 µl empacotadas com um disco de material C18 (Empore™ Octadecyl C18, 47 mm). As ponteiras foram equilibradas pela adição sequencial de 100 µl de metanol, 100 µl de acetonitrila com 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) e 100 µl de H<sub>2</sub>O. Em seguida, as ponteiras foram centrifugadas a 2000 *xg* durante 2 minutos para que o líquido passasse completamente. Posteriormente, a amostra contendo os peptídeos foi adicionada à ponteira que foi centrifugada a 2000 *xg* até que o líquido passasse completamente. As ponteiras foram então lavadas com 100 µl de TFA 0,1% e os peptídeos foram eluídos pela adição de 50 µl de acetonitrila 50% com TFA 0,1%. Os eluentes foram secos pela centrifugação à vácuo e ressuspensos em acetonitrila 3% com TFA 1%, antes das análises por LC-MS/MS.

A cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa foi realizada usando o sistema UltiMate 3000 nano (Dionex) acoplado de forma *in-line* com o espectrômetro de massas Thermo Q Exactive HF (Thermo Fisher Scientific).

Os peptídeos foram adicionados à coluna de captura (PepMap100, C18, 300 µm x 5 mm) com acetonitrila 2% (v/v), TFA 0,1% usando um *loop* de injeção em uma taxa de fluxo

de 9  $\mu\text{l}/\text{minuto}$  durante 7 minutos. Em seguida, para a separação dos peptídeos, foi utilizada uma coluna analítica (Easy-Spray C18 75  $\mu\text{m}$  x 500 mm, 2  $\mu\text{m}$  diâmetro da *bead* da coluna) em uma taxa de fluxo de 0,3  $\mu\text{l}/\text{minuto}$  usando um gradiente de 60 minutos a partir de 96,2% A (ácido fórmico 0,1 %): 3,8% B (acetonitrila 80% com ácido fórmico 0,1%) para 50% de B.

Os espectros MS1 foram adquiridos em um intervalo de 350-2000 m/z com resolução de 60K. Os dados dependentes de MS2 foram realizados em uma resolução de 30K e os 18 íons mais abundantes foram selecionados por fragmentação HCD (*Higher-energy collisional dissociation*) com uma energia de colisão normalizada de 30%.

#### 4.7.3. Análise dos dados de MS

Os dados brutos foram processados usando o *software* Thermo Proteome Discoverer (v. 1.4). Os espectros MS2 foram identificados pelo MASCOT e comparados com a sequência da proteína humana, EFhd2, no banco de dados Uniprot (baixado em 17.12.2018) considerando os parâmetros: tolerância de MS1 de 10 ppm, tolerância de massa de MS/MS de 0,01 Da, máximo de 2 clivagens perdidas, carbamidometilação da cisteína como uma modificação fixa, modificações variáveis da oxidação de metionina e fosforilação de serina/treonina.

### 4.8. Obtenção da proteína recombinante Destrin

#### 4.8.1. Clonagem de Destrin em vetor para expressão em sistema procarioto

O inserto de DNA que codifica para Destrin possui 447 pb e foi obtido a partir da biblioteca de cDNA Universal Humana (Clontech) clonada em vetor pGADT7. O inserto de DNA foi amplificado por PCR utilizando os *primers* apresentados na Tabela 5. O produto de PCR foi clonado no vetor pGEM-T easy (Promega). Destrin foi subclonada em vetor para expressão em bactéria, pET28a(+) (Novagen), entre os sítios das enzimas de restrição *EcoRI* e *Sall*.

**Tabela 5.** Sequência dos *primers* utilizados para clonagem de Destrin em pET28a.

<i>Primers</i>	Sequência 5'→3'
DSTN_ <i>EcoRI Forward</i>	GAATTCATGAAAGTTCGTAAATGCTCCACACCAGA
DSTN_ <i>Sall Reverse</i>	GTCGACCTACACAGGGCATCCTTCAAAGGCTAC

A clonagem de Destrin no vetor pET28a foi feita com o objetivo de obtermos a proteína recombinante fusionada a uma cauda de histidinas, e dessa forma facilitar a separação de

Dextrin de outras proteínas por meio da cromatografia por afinidade. A cauda de histidina foi adicionada ao domínio N-terminal de Dextrin (6xHis-Dextrin). Além disso, permite a detecção da proteína em ensaios de *imunoblotting*.

Os clones obtidos foram sequenciados no Centro de Pesquisa René Rachou em Belo Horizonte/MG e confirmados. A sequência de DNA clonada foi traduzida pela ferramenta Translate (<http://web.expasy.org/translate/>). A sequência de aminoácidos da proteína recombinante obtida foi então analisada pela ferramenta ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>).

#### **4.8.2. Expressão heteróloga de 6xHis-Dextrin em sistema procarioto**

A cepa bacteriana *Escherichia coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL foi transformada com pET28a/Dextrin por choque térmico e plaqueadas em meio LB sólido com canamicina (50 µg/ml). Uma colônia foi inoculada em 10 ml de meio LB acrescido de canamicina 50 µg/ml e os inóculos foram incubados *overnight* a 37 °C e 180 rpm. Após a incubação, este inóculo foi vertido em 500 ml de meio LB contendo canamicina (50 µg/ml) e deixado sob agitação a 37 °C e 180 rpm até que a densidade ótica (DO) bacteriana a 600 nm atingisse a faixa entre 0,6 – 0,8. Para a indução da expressão de 6xHis-Dextrin adicionou-se o indutor *Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside* (IPTG - Sigma) na concentração de 0,5 mM durante 16 h a 37°C, sob agitação de 180 rpm (CHIN et al., 2016). Alíquotas de 100 ml de indução foram coletadas após o término da indução da expressão e centrifugadas a 8000 *xg* por 10 minutos a 4 °C. Os *pellets* foram identificados e armazenados a -80 °C.

#### **4.8.3. Lise e purificação de 6xHis-Dextrin por cromatografia de afinidade em resina contendo níquel**

Para análise da expressão de 6xHis-Dextrin foi feita a lise dos *pellets* com o tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 50 mM, DTT 1 mM, 1 µg/ml de cada um dos inibidores de protease, aprotinina, pepstatina A e leupeptina, e 300 µg/ml de lisozima (CHIN et al., 2016). Para cada 100 ml de indução foram utilizados 4 ml do tampão de lise. Os tubos foram incubados em gelo por 30 min e o rompimento dos compartimentos celulares foi feito por sonicação (amplitude de 20 nm por 5 min em intervalos de 60 segundos). A seguir, as amostras foram primeiramente centrifugadas a 4 °C, 10000 rpm por 30 min, seguido de uma segunda centrifugação a 4 °C, 10000 *xg* por 15 min. A fração solúvel (sobrenadante) da lise bacteriana foi coletada, filtrada em membrana de nitrocelulose de 45 µm e guardada a -20 °C.

Para a purificação da proteína 6xHis-Dextrin foram utilizados 2 ml da resina *His-Select Nickel Affinity Gel* (Sigma). Esta resina é apropriada para a purificação dessa proteína que está fusionada à cauda de histidina devido à alta afinidade do níquel por estes resíduos. Primeiramente a resina foi equilibrada com 15 ml do tampão A (Tris base 20 mM pH 8,0, NaCl 50 mM, imidazol 10 mM e DTT 1 mM). Para a purificação da 6xHis-Dextrin foram aplicados 10 ml de fração solúvel à resina. Para lavagem da resina usou-se 35 ml do tampão A e para a eluição da 6xHis-Dextrin foram utilizados 10 ml do tampão B (Tris base 20 mM pH 8,0, NaCl 50 mM, imidazol 300 mM e DTT 1 mM).

#### **4.8.4. Análise da expressão e purificação de 6xHis-Dextrin por *western blotting***

A confirmação da expressão da proteína recombinante foi realizada por meio de SDS-PAGE e *western blotting*. Após a corrida eletroforética, o gel foi colocado em um sistema de transferência em contato com membrana de nitrocelulose (GE Healthcare), ambos entre papéis de filtro. O sistema foi embebido em tampão de transferência (glicina 39 mM, Tris-base 48 mM e metanol 20 % v/v) e colocado em uma cuba de transferência Trans-Blot (Bio-Rad), a 4 °C, submerso no mesmo tampão. A transferência foi realizada por 2 h, a 250 mA. Após este período, a membrana foi lavada em TBS-T (tampão TBS adicionado de 0,1% de Tween 20) e corada em solução de Ponceau S (0,1% de Ponceau S e ácido acético glacial 10 % v/v). Em seguida, a membrana foi incubada em solução de bloqueio contendo TBS-T e 5 % de leite em pó desnatado por 1 h. A etapa de imunodeteção consistiu em incubação da membrana em solução de TBS-T contendo anticorpo monoclonal primário anti-HisTag (Sigma, #H1029) produzido em camundongo, diluído na proporção 1:1000. Após este período, o anticorpo, que não se ligou à membrana, foi removido por três lavagens sucessivas de 5 min com TBS-T. Incubou-se a membrana por 2 h em TBS-T com o anticorpo secundário Anti-Mouse IgG (whole molecule)-Peroxidase (Sigma), diluído 1:50000. Em seguida, a solução contendo o anticorpo foi removida lavando-se a membrana em TBS-T por três vezes por 5 min. A revelação das bandas baseou-se na incubação da membrana com 10 mg do reagente *3,3-diaminobenzidina* (DAB – Sigma) diluído em 1 ml de Tris-HCl 50 mM pH 7,6, 1 ml de NiCl<sub>2</sub> 0,3 %, 8 ml de água destilada e 20 µl de peróxido de hidrogênio 30%.

#### **4.8.5. Lise e purificação de 6xHis-Destrin por cromatografia de troca catiônica em sistema FPLC**

A etapa de lise dos *pellets* de indução foi realizada como descrito no item 4.8.3, com o tampão Hepes 20 mM pH 8,0, NaCl 25 mM e DTT 1 mM, 1 µg/ml de cada um dos inibidores de protease, aprotinina, pepstatina A e leupeptina e 300 µg/ml de lisozima.

Para a purificação da proteína 6xHis-Destrin foi utilizado o sistema FPLC e a coluna de troca catiônica, Capto S (GE Healthcare). Foram utilizados 10 ml de fração solúvel e os tampões de purificação A (indicados pelo manual da resina) Hepes 20 mM pH 8,0, NaCl 25 mM e DTT 1 mM e B (Hepes 20 mM pH 8,0, NaCl 50 mM e DTT 1 mM). A expressão de 6xHis-Destrin na fração solúvel e a proteína purificada após a realização da cromatografia de troca catiônica foram analisadas pela eletroforese em gel de poliacrilamida 12%. A confirmação da expressão e da purificação da proteína 6xHis-Destrin foram feitas por *SDS-PAGE* e *western blotting* (item 4.8.4).

#### **4.8.6. Lise e purificação de 6xHis-Destrin por cromatografia de troca aniônica em FPLC**

A etapa de lise foi realizada como descrita no tópico 4.8.3, com o tampão de lise NaHCO<sub>3</sub> 20 mM pH 10,0, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 20 mM, NaCl 25 mM, DTT 1 mM, 1 µg/ml de cada um dos inibidores de protease, aprotinina, pepstatina A e leupeptina e 300 µg/ml de lisozima.

Para a purificação da proteína 6xHis-Destrin foi utilizado o sistema FPLC e a coluna de troca aniônica, Capto Q (GE Healthcare). Para a purificação, foram utilizados 10 ml de fração solúvel e os tampões de purificação A (NaHCO<sub>3</sub> 20 mM pH 10,0, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 20 mM, NaCl 25 mM, DTT 1 mM ) e B (NaHCO<sub>3</sub> 20 mM pH 10,0, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 20 mM, NaCl 50 mM, DTT 1 mM). A expressão de 6xHis-Destrin na fração solúvel e proteína purificada após a realização da cromatografia de troca aniônica foram analisadas pela eletroforese em gel de poliacrilamida 12%. A confirmação da expressão e da purificação da proteína 6xHis-Destrin foram feitas por *SDS-PAGE* e *western blotting* (item 4.8.4).

## 5. RESULTADOS

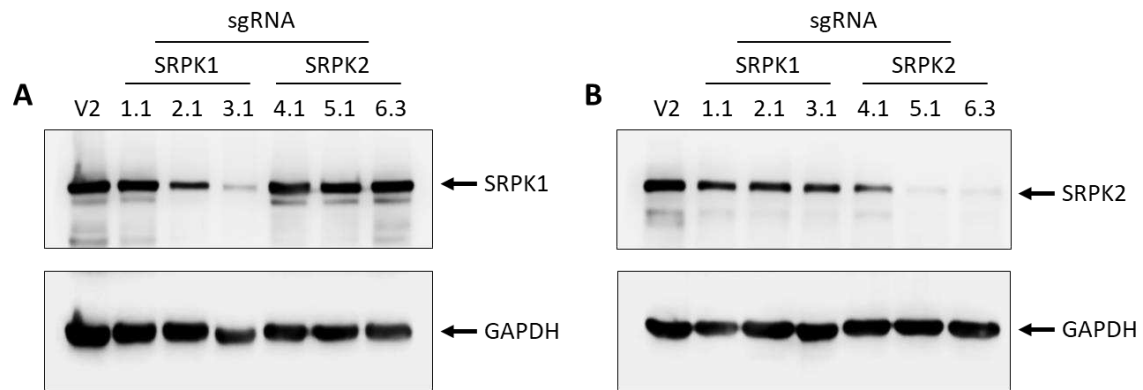
### 5.1. Realização do silenciamento gênico de *SRPK* nas populações de células B16F10

A tecnologia CRISPR/Cas9 permite a edição rápida e eficiente de um gene alvo em células de mamíferos. O sistema é composto pela nuclease Cas9 e por dois RNAs não codificantes, crRNA e tracrRNA, fusionados em um simples RNA guia (sgRNA). O complexo Cas9/sgRNA se liga ao DNA em uma região alvo complementar ao sgRNA e a clivagem da fita dupla por Cas9 ocorre em uma sequência específica logo após o motivo PAM (*protospacer adaptor motif*). O reparo da dupla-fita de DNA pode ser feito por duas vias distintas, NHEJ (*nonhomologous end joining*) ou HDR (*homology-directed repair*). A via NHEJ normalmente leva a inserção ou deleção (*indels*) próximas ao local da clivagem pela Cas9, enquanto a via HDR pode ser usada para introduzir sequências específicas no local de corte se um DNA *template* exógeno for fornecido (SANDER; JOUNG, 2014).

Para realizarmos o silenciamento de *SRPK* nas células B16F10, três sgRNAs diferentes foram testados a fim de determinarmos a sequência mais eficiente para cada gene, *SRPK1* ou *SRPK2*. O desenho das sequências foi baseado em um *software* de predição (RAN et al., 2013). Para *SRPK1*, os alvos dos três sgRNAs foram a região promotora proximal (19 pb a montante do exon 1) e exon 1, enquanto para *SRPK2* o sgRNA 4.1 tinha como alvo o exon 3 e os sgRNAs 5.1 e 6.3 tinham como alvo o exon 4.

A análise da expressão de *SRPK1* e *SRPK2* por *western blotting* em amostras do mix de células B16F10 transduzidas com o vetor lentiCRISPRV2 contendo a sequência do sgRNA e selecionadas com puromicina mostrou que para o silenciamento de *SRPK1*, a melhor sequência do sgRNA foi a 3.1, enquanto para o silenciamento de *SRPK2*, as sequências 5.1 e 6.3 apresentaram eficiência semelhante (Figura 14). A proteína GAPDH foi utilizada como controle endógeno do *western blotting*. Diante desses resultados, as células B16F10 transduzidas com o vetor contendo a sequência do sgRNA 3.1 (*SRPK1*) ou 5.1 (*SRPK2*), foram expandidas para serem utilizadas nos experimentos posteriores.

O silenciamento simultâneo de *SRPK1* e *SRPK2* nas células B16F10 foi realizado a partir da transdução das células B16F10 *SRPK2*<sup>-</sup> com o vetor contendo o sgRNA para *SRPK1* (sequência 3.1). A análise da expressão de *SRPK1* e *SRPK2* no lisado preparado a partir do mix de células mostrou que o silenciamento de *SRPK1* realizado dessa forma, não funcionou (Figura 15A e B). Provavelmente isso ocorreu devido às células B16F10 *SRPK2*<sup>-</sup> já serem resistentes à puromicina, não sendo possível fazer a seleção das células expressando o sgRNA para *SRPK1* com o mesmo antibiótico.

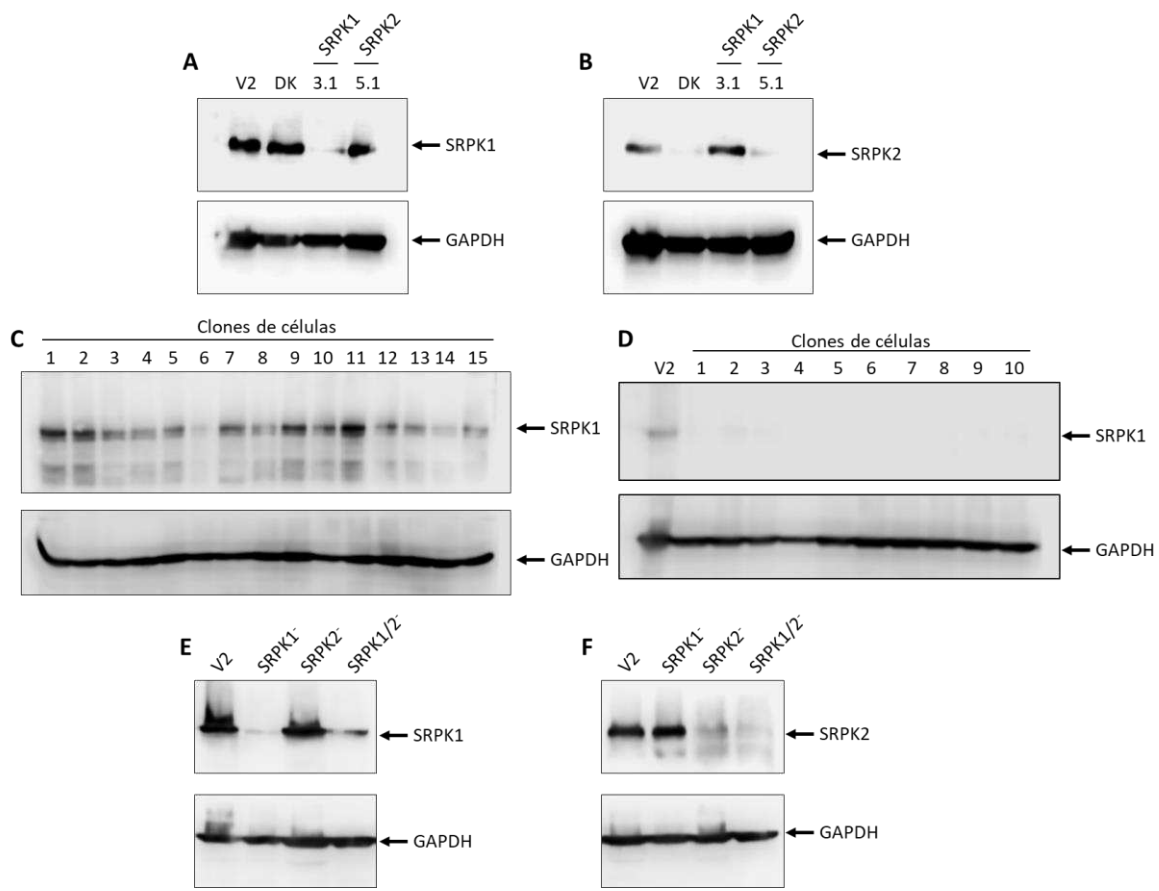


**Figura 14. Análise do silenciamento de SRPK1 (A) ou SRPK2 (B) em células B16F10.** As células B16F10 foram transduzidas com o plasmídeo lentiCRISPRV2 carregando diferentes sequências de sgRNAs e a seleção do mix de células expressando estavelmente cada sgRNA foi feita com puromicina. A análise por *western blotting* revelou a expressão de SRPK1 e SRPK2 comparada com as amostras de células controle (V2), transduzidas com o vetor lentiCRISPRV2 vazio. GAPDH foi utilizado como controle endógeno.

Assim, foi necessário fazer o isolamento dos clones de células a fim de determinarmos o clone com a menor expressão de SRPK1. Foram isolados 15 clones e dentre esses, o clone 6 apresentou a menor expressão de SRPK1 (Figura 15C). Este clone foi expandido para ser utilizado nos ensaios posteriores. Também foram isolados 10 clones de células B16F10 SRPK1<sup>-</sup> para identificarmos uma colônia que apresentasse a menor expressão de SRPK1. Dentre esses, o clone 5 foi escolhido e expandido (Figura 15D).

Na Figura 15E e Figura 15F temos a expressão de SRPK1 e SRPK2, respectivamente, nas células B16F10 com SRPK silenciadas, obtidas pelo sistema CRISPR/Cas9. A pequena expressão de SRPK1 e SRPK2, verificadas nas células B16F10 SRPK1<sup>-</sup> ou B16F10 SRPK2<sup>-</sup> pode ser explicada devido ao genoma complexo das células tumorais, poliploides, como é o caso da linhagem B16F10 (HERRERA et al., 2018; SCHARF et al., 2018). Para obtermos um *knockout* completo dos genes *SRPK1* ou *SRPK2* nessas células, todas as cópias do gene alvo deveriam ter sido editadas pelo sistema CRISPR/Cas9, o que não podemos garantir quando aplicamos esse sistema.

A estabilidade do silenciamento de SRPK nas células B16F10 foi avaliada 7 meses após a obtenção das células B16F10 SRPK<sup>-</sup>. Após esse tempo as células foram submetidas a uma nova análise de expressão de SRPK por *western blotting* e o resultado mostrou que o silenciamento de SRPK se manteve (Apêndice B).

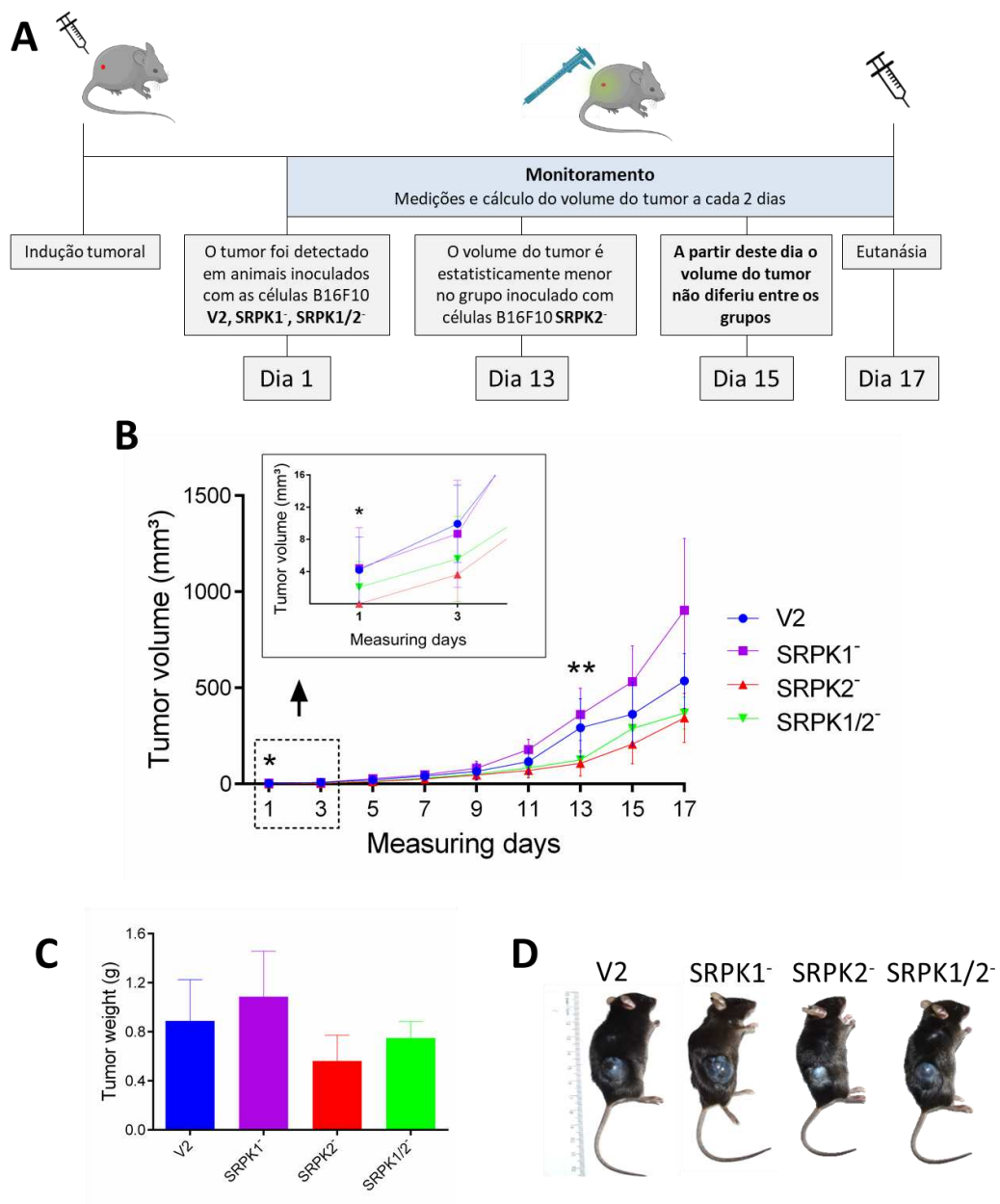


**Figura 15. Avaliação do silenciamento simultâneo de *SRPK1* e *SRPK2* em células B16F10.** (A) Primeira tentativa de geração do mix de células B16F10 *SRPK1/2*<sup>-</sup>. A análise por *western blotting* revelou a expressão de SRPK1 nas células B16F10 transduzidas com o vetor lentiCRISPRV2 carregando o sgRNA para SRPK1. (B) Expressão de SRPK2 no mix de células B16F10 *SRPK1/2*<sup>-</sup>. (C) As colônias das células B16F10 *SRPK1/2*<sup>-</sup> foram isoladas para a identificação do clone com a menor expressão de SRPK1. O clone 6 foi escolhido e expandido. (D) As colônias das células B16F10 *SRPK1* foram isoladas para a identificação do clone com a menor expressão de SRPK1. O clone 5 foi escolhido e expandido. (E) e (F) Análise da expressão de SRPK1 ou SRPK2 nas células B16F10 em foi realizado o silenciamento gênico de *SRPK1*, *SRPK2* ou ambas, em relação a B16F10 V2, em que as células foram transduzidas com o vetor lentiCRISPRV2 vazio.

## 5.2. Efeito do silenciamento de SRPK no desenvolvimento do tumor subcutâneo

Este ensaio foi realizado para avaliar o efeito do silenciamento de SRPK no crescimento e desenvolvimento do melanoma subcutâneo em modelo murino.

No segundo dia após a inoculação das células B16F10 *SRPK*<sup>-</sup> no flanco direito dos camundongos, o tumor foi identificado nos animais inoculados com as células B16F10 V2, B16F10 *SRPK1*<sup>-</sup> e B16F10 *SRPK1/2*<sup>-</sup>. Dois dias após a detecção dos tumores nos primeiros grupos, o tumor foi identificado nos animais do grupo inoculado com as células B16F10 *SRPK2*<sup>-</sup>, indicando um atraso no surgimento do tumor nos animais desse grupo (Figura 16A).



**Figura 16. O silenciamento de SRPK2 em células B16F10 afeta o desenvolvimento do melanoma subcutâneo em modelo murino.** (A) Esquema representativo do ensaio de indução do melanoma subcutâneo e as principais observações durante o período do experimento. As células B16F10 SRPK1<sup>-</sup>, SRPK2<sup>-</sup> ou SRPK1/2<sup>-</sup> foram inoculadas na região subcutânea do flanco direito dos camundongos C57BL/6 machos. O surgimento do tumor foi mais lento nos animais inoculados com B16F10 SRPK2<sup>-</sup>. A partir do 15º dia de experimento, o volume dos tumores não apresentou diferença significativa entre si. No 17º dia os animais foram pesados e eutanasiados. (B) Curva de crescimento tumoral. No 13º dia, o volume do tumor foi estatisticamente menor nos animais inoculados com as células B16F10 SRPK2<sup>-</sup> em relação ao grupo controle, V2, ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Dunn. A partir do 15º dia, o crescimento do tumor não diferiu entre os grupos. (C) A massa tumoral obtida no 17º dia do experimento não diferiu entre os grupos. (D) Imagens representativas dos tumores nos animais obtidas no 17º dia do experimento.

O gráfico que representa o volume tumoral ao longo do tempo de duração do experimento mostrou que no 13º dia, o volume dos tumores nos animais que receberam as células B16F10 SRPK2<sup>-</sup> foi estatisticamente menor em relação ao grupo controle, V2 (Figura 16B). O volume do tumor nos outros grupos não diferiu significativamente do volume do grupo inoculado com as células B16F10 V2. A partir do 15º dia, o volume dos tumores se igualou em todos os grupos e continuou a aumentar intensamente.

No 17º dia do experimento os animais foram eutanasiados e os tumores foram coletados e pesados. Não houve diferença significativa entre a massa dos tumores coletados (Figura 16C), confirmando os resultados sobre a medida do volume do tumor a partir do 15º dia, quando não houve diferença significativa entre os grupos. A Figura 16D mostra os animais eutanasiados evidenciando o tumor desenvolvido após 17 dias da inoculação das células B16F10 SRPK<sup>-</sup>.

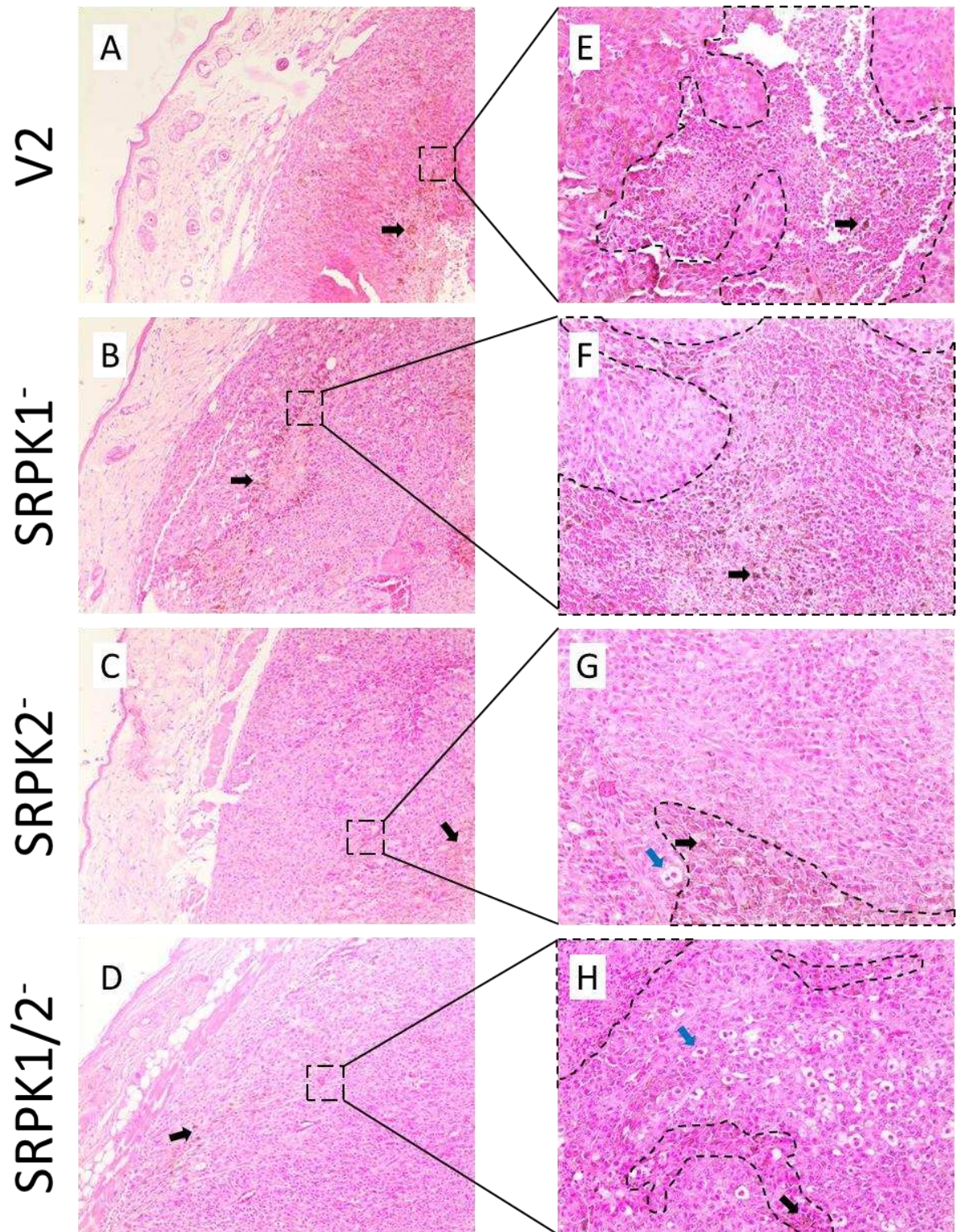
### **5.2.1. Análise histológica do tumor subcutâneo**

Os tumores coletados após a eutanásia, no 17º dia do experimento, foram utilizados para a preparação de lâminas histológicas. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (HE) para a investigação histopatológica.

Os cortes histológicos foram feitos na periferia do tumor, junto à pele. O melanoma é um tumor originado de melanócitos, altamente maligno. A porção central do tumor é espessa e bem pigmentada devido à produção de melanina pelas células neoplásicas (Figura 17). Entre as células tumorais, podemos observar a presença de melanócitos normais, bem evidentes por possuírem o citoplasma claro, apresentando pouca melanina (seta azul Figura 17G e H).

A homeostase fisiológica do tecido é mantida por um equilíbrio relativo entre proliferação celular e a disponibilidade de nutrientes. Em contraste, os tumores de melanoma cutâneo bem estabelecidos são caracterizados por células em alta taxa proliferativa e, em decorrência disso, baixa disponibilidade de nutrientes, porque nem todas as células dentro do tumor tem acesso aos nutrientes disponíveis de forma adequada. Portanto muitas regiões dentro do tumor apresentam altos níveis de morte celular.

De fato, a análise dos cortes histológicos dos tumores revelou extensas áreas em que houve morte celular, sendo que a maior área foi observada nos tumores dos animais inoculados com as células B16F10 SRPK1<sup>-</sup> (Figura 17F), enquanto a menor área correspondente a morte celular foi encontrada nos tumores dos animais inoculados com as células B16F10 SRPK2<sup>-</sup> (Figura 17G).



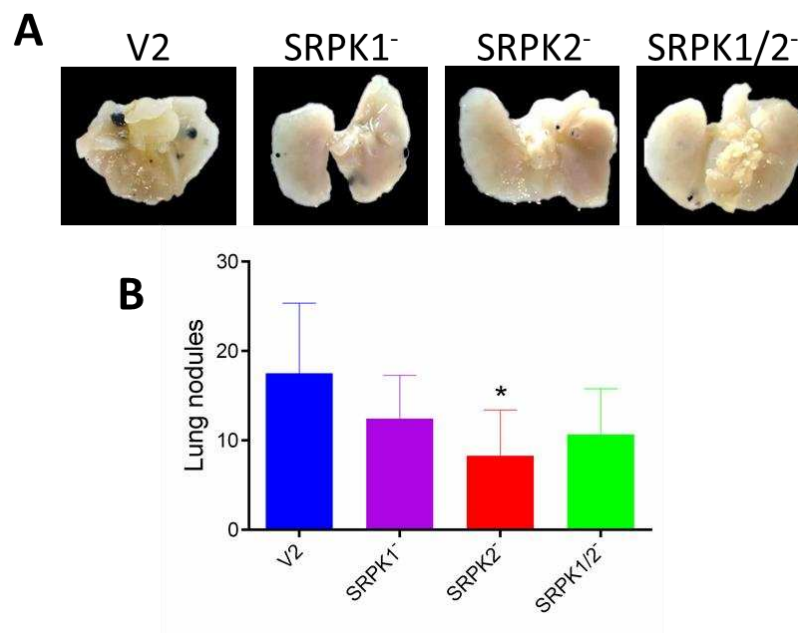
**Figura 17. Análise histológica da pele e tumor subcutâneo em camundongos C57BL/6 inoculados com células B16F10 SRPK.** Fotomicrografia analisada por microscopia de luz. As seções mostram a presença de melanina em marrom (indicado pela seta preta). Os melanócitos estão apontados pelas setas azuis. As áreas demarcadas pelo pontilhado mostram regiões onde houve intensa morte celular. As maiores áreas com morte celular foram encontradas em (E), (F), (H). A menor área com morte celular foi encontrada em (G). Coloração: H.E. (hematoxilina-eosina). Imagens A, B, C e D: aumento 10x. Imagens E, F, G e H: aumento 20x.

### 5.3. Efeito do silenciamento de SRPK na formação de nódulos pulmonares

A formação de metástase em órgãos distantes é uma das principais causas de morte relacionadas ao câncer. Esse processo complexo é controlado por remodelamentos na matriz extracelular e no citoesqueleto, bem como pela reorganização dinâmica da adesão entre células vizinhas e com os tecidos conectivos subjacentes (ROOSMALEN et al., 2015). A maioria da mortalidade no melanoma está associada ao processo metastático, que normalmente é identificado nas etapas mais avançadas do câncer (BRAEUER et al., 2013).

Realizamos este ensaio a fim de avaliarmos o efeito do silenciamento de SRPK na capacidade das células B16F10 formarem nódulos pulmonares quando injetadas na veia caudal dos camundongos.

Podemos observar que o silenciamento de SRPK2 nas células B16F10 reduziu significativamente a formação de nódulos no pulmão dos camundongos, enquanto o silenciamento de SRPK1 ou SRPK1/2 não apresentaram efeito significativo (Figura 18). A Figura 18A representa os pulmões dos animais contendo os nódulos. A maioria dos nódulos contados só foram visualizados com o auxílio de uma lupa devido ao seu tamanho reduzido.

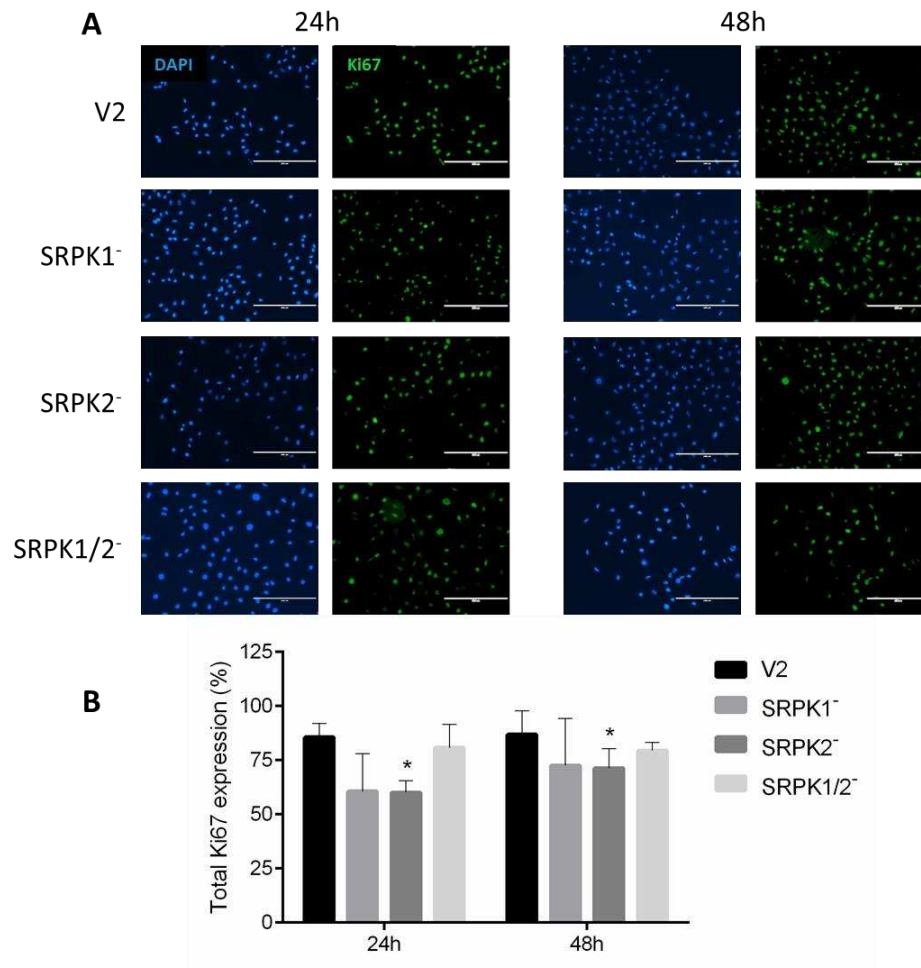


**Figura 18. O silenciamento de SRPK2 em células B16F10 afeta o desenvolvimento de nódulos pulmonares *in vivo*.** As células B16F10 SRPK<sup>-</sup> foram inoculadas na veia caudal dos camundongos e os pulmões foram excisados após 21 dias. Os pulmões foram fixados em solução apropriada por 24 h e o número de nódulos pulmonares na superfície foram contados. (A) Imagens representativas dos pulmões obtidas após 21 dias da inoculação das células B16F10 SRPK<sup>-</sup>. (B) O gráfico mostra o número de nódulos contados na superfície dos pulmões. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (one-way ANOVA seguido do teste Dunn, P<0,05). A comparação foi feita em relação ao grupo controle, V2.

#### 5.4. Efeito do silenciamento de SRPK em proliferação celular

A análise da expressão da proteína nuclear, Ki67, está fortemente associada com a proliferação das células tumorais e é amplamente utilizada em exames patológicos de rotina como um marcador de proliferação (KLÖPPEL et al., 2004). A proteína Ki67 está presente nas células durante todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e M), mas está ausente na fase G0 (GERDES et al., 1984).

Para avaliar o efeito do silenciamento de SRPK na proliferação das células B16F10, a proteína Ki67 foi marcada nessas células pelo ensaio de imunofluorescência. A análise da proliferação nos tempos de 24 h e 48 h mostrou que o silenciamento de SRPK2 diminuiu a proliferação celular, enquanto o silenciamento de SRPK1 ou o silenciamento simultâneo de SRPK1 e SRPK2 não afetaram esse fenótipo (Figura 19).

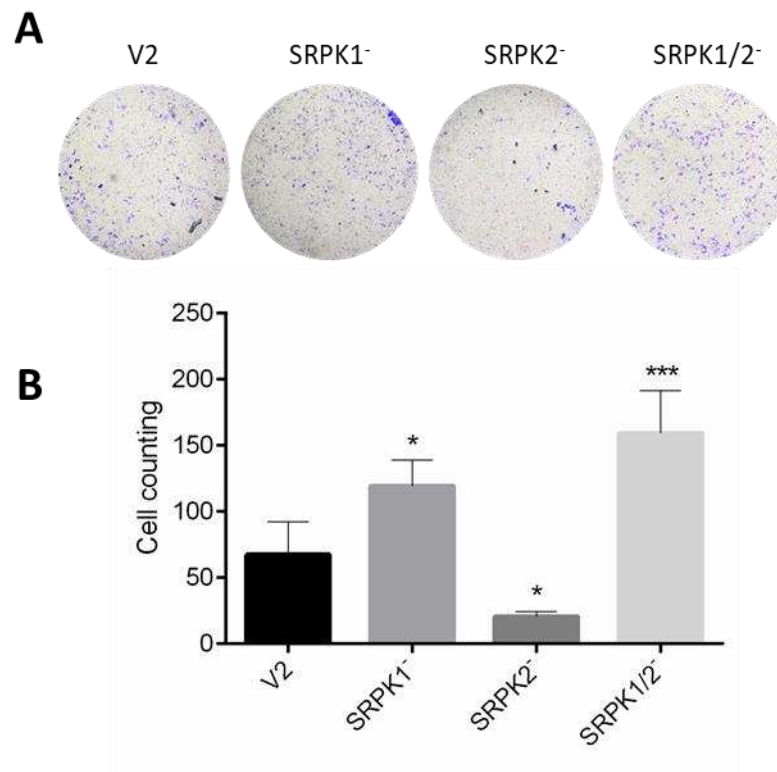


**Figura 19. Efeito do silenciamento de SRPK na proliferação de células B16F10.** (A) A proliferação celular de B16F10 SRPK<sup>-</sup> foi avaliada pela marcação de Ki67 por imunofluorescência nos tempos 24 e 48 horas. (B) Representação gráfica da proliferação das células B16F10 SRPK<sup>-</sup>. Foi calculada a porcentagem de células expressando Ki67 (fluorescência verde) em relação ao número de células totais coradas com DAPI (fluorescência azul). A contagem das células foi feita utilizando o *software* ImageJ e os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. A análise estatística foi feita pelo teste de Dunnet ( $P < 0,05$ ) considerando o grupo controle, V2.

### 5.5. Efeito do silenciamento de SRPK em invasão celular

A invasão dos tecidos vizinhos pelas células tumorais através da matriz extracelular é um passo importante para a formação de metástase do tumor. Este ensaio foi realizado para avaliar o efeito do silenciamento de SRPK na capacidade invasiva das células B16F10. Para simular os componentes da membrana basal, o matrigel foi adicionado à parte superior dos insertos *transwell* e as células B16F10 SRPK<sup>-</sup> foram colocadas sobre o matrigel. Após o período de incubação, as células que passaram para a parte inferior dos insertos (células que apresentaram a capacidade e invadir o inserto *transwell* revestido com matrigel) foram fixadas, coradas e contadas.

Quando comparado às células controle, V2, podemos observar que o silenciamento de SRPK2 diminui a invasão das células B16F10, enquanto o silenciamento de SRPK1 ou o silenciamento simultâneo de SRPK1 e SRPK2 aumentaram a capacidade de invasão dessas células (Figura 20).



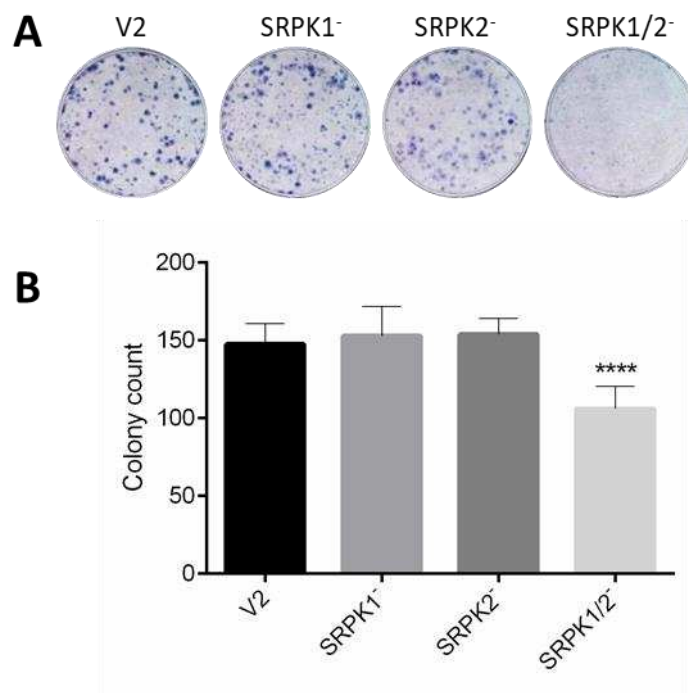
**Figura 20. Efeito do silenciamento de SRPK na capacidade de invasão das células B16F10.** (A) A capacidade de invasão das células foi avaliada por meio da contagem das células que atravessaram os insertos *transwell* revestidos com matrigel. (B) Representação gráfica da invasão de células B16F10 SRPK<sup>-</sup>. A análise estatística foi feita pelo teste de Dunnet ( $P < 0,05$ ) considerando o grupo controle, V2. O resultado foi expresso como média  $\pm$  desvio padrão.

### 5.6. Efeito do silenciamento de SRPK na capacidade de formação de colônias das células B16F10

Este ensaio é um método amplamente utilizado para avaliar a capacidade das células formarem colônias de forma independente de ancoragem a um substrato (PUCK et al., 1956).

Nessa técnica, as células são dispersas em uma placa de cultivo contendo o meio suplementado com os fatores de crescimento necessários. As células normais são impedidas de crescer de forma independente de ancoragem devido ao tipo de morte apoptótica chamada *anoikis*, que ocorre em células dependentes de ancoragem quando elas se separam da matriz extracelular circundante (TADDEI et al., 2012). No entanto, as células transformadas tem a capacidade de crescer e se dividir sem a necessidade de se ligar a um substrato.

Ao avaliarmos a capacidade de formação de colônia das células B16F10 SRPK<sup>-</sup>, notamos que o silenciamento simultâneo de SRPK1 e SRPK2 reduziu a quantidade de colônias formadas (Figura 21). O silenciamento de SRPK1 ou SRPK2, isoladamente, não afetou a capacidade de formação de colônias.



**Figura 21. Efeito do silenciamento de SRPK na capacidade de formação de colônias das células B16F10.** (A) Fotomicrografias representativas das colônias formadas pelas células B16F10 SRPK<sup>-</sup> após 14 dias de experimento. As colônias foram coradas com azul de toluidina para permitir a visualização e contagem. (B) Representação gráfica da contagem das colônias formadas pelas células B16F10 SRPK<sup>-</sup>. A análise estatística foi feita pelo teste de Dunnet ( $P < 0,05$ ) considerando o grupo controle, V2. O resultado foi expresso como média  $\pm$  desvio padrão.

### 5.7. Efeito do silenciamento de SRPK na polimerização de Actina

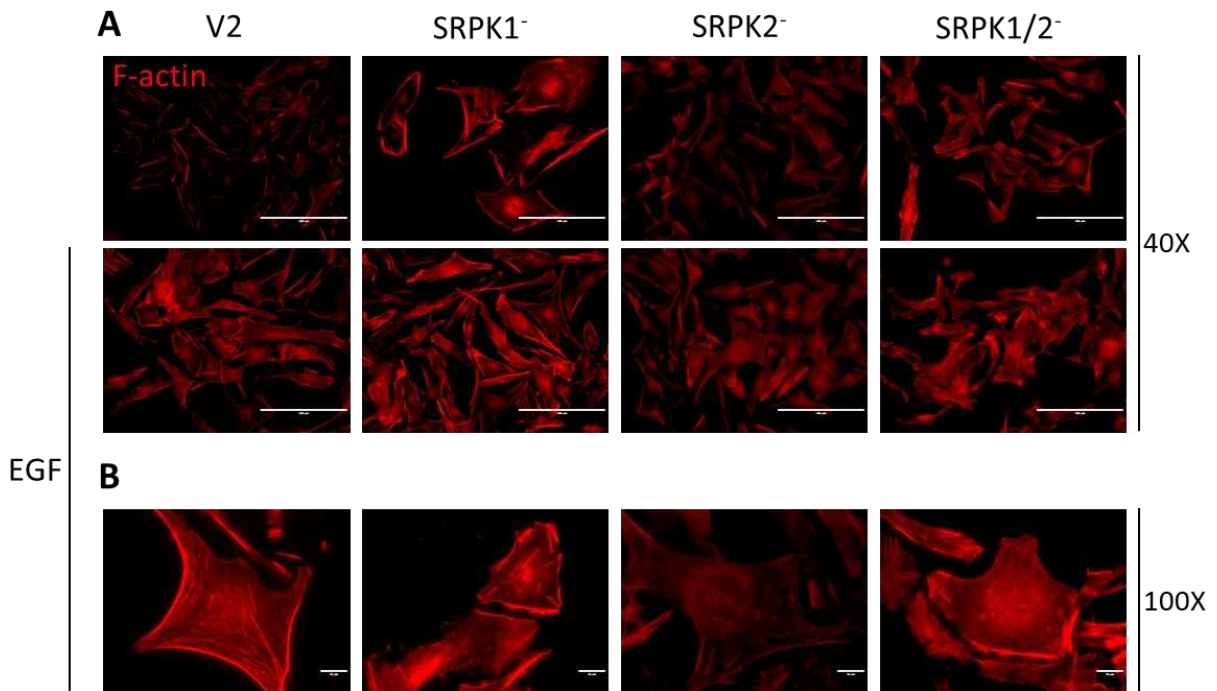
O citoesqueleto de Actina é importante para a função celular normal, mas também pode favorecer o desenvolvimento das células tumorais durante todas as etapas da formação de metástase. A migração celular é facilitada pela formação de protrusões de membranas dependentes da polimerização dos filamentos de Actina como filopodia, lamelipodia e invadopodia, importantes para a ruptura de membranas basais, invasão de tecidos, vasos sanguíneos e linfáticos (MACHESKY, 2008; NICHOLSON-DYKSTRA et al., 2005; FAIX; ROTTNER, 2006; BUCCIONE et al., 2004; CONDEELIS; SEGALL, 2003).

Neste mesmo trabalho nós observamos que o silenciamento de SRPK2 em células B16F10 prejudicou o desenvolvimento do melanoma subcutâneo e a formação de nódulos pulmonares quando essas células foram inoculadas em camundongos (Figura 16 e Figura 18). Considerando a importância das alterações no citoesqueleto de Actina para o desenvolvimento da metástase, nós decidimos avaliar se o silenciamento de SRPK afetaria a organização do citoesqueleto de Actina nas células B16F10.

Considerando que EGF é capaz de estimular a polimerização de Actina (RIJKEN et al., 1991) e que SRPK atua na via de sinalização iniciada por EGF (ZHOU et al., 2012), neste ensaio as células foram tratadas com EGF (100 ng/ml) durante 1 h e F-Actina foi marcada com *Rodhamine Phalloidin* (Thermo Scientific). A *Phalloidin* tem a capacidade de se ligar firmemente e especificamente à Actina polimerizada, e não à G-Actina (ESTES et al., 1981). Os resultados foram visualizados por microscopia de fluorescência.

Analisando os resultados, percebemos que nas células B16F10 V2 (controle), o tratamento com EGF durante 1 h estimula a polimerização de Actina para a forma F-Actina, pois a intensidade da fluorescência das células tratadas com EGF está mais forte (Figura 22A). Nas células B16F10 SRPK1<sup>-</sup> ou B16F10 SRPK1/2<sup>-</sup> parece não haver diferença na intensidade da fluorescência, indicando que o silenciamento de SRPK1 ou silenciamento simultâneo de SRPK1 e SRPK2 não afetaram a polimerização da Actina. Entretanto, nas células B16F10 SRPK2<sup>-</sup> foi observada uma menor intensidade de fluorescência, indicando que o silenciamento de SRPK2 prejudicou a formação de F-Actina. Esse resultado foi independente do tratamento com EGF, pois na presença ou ausência de EGF as células apresentaram fluorescência menos intensa (Figura 22A). Os detalhes sobre o citoesqueleto de Actina nas células B16F10 SRPK<sup>-</sup> tratadas com EGF podem ser visualizados em maior aumento na Figura 22B. Nas células B16F10 SRPK2<sup>-</sup>, a forma F-Actina está em menor

quantidade, pois a baixa intensidade de fluorescência indica que menos F-Actina foi detectada por *Phalloidin*.



**Figura 22. O silenciamento de SRPK2 afeta a polimerização de Actina em células B16F10.** (A) As células foram tratadas com EGF (100 ng/ml) por 1 h e posteriormente fixadas. A detecção de F-Actina foi feita por microscopia de fluorescência utilizando Rhodamine Phalloidin (Thermo Scientific). As imagens foram obtidas em ampliação 40x e a barra horizontal branca indica o comprimento de 100  $\mu\text{m}$ . (B) Imagens obtidas em maior aumento evidenciam a baixa intensidade de fluorescência nas células B16F10 SRPK2<sup>-</sup>, indicando a menor quantidade de F-Actina nessas células. Ampliação 100x. A barra horizontal branca indica o comprimento de 10  $\mu\text{m}$ .

### 5.8. Confirmação da interação entre SRPK2 e EFhd2

Neste trabalho, os primeiros resultados observados nos experimentos utilizando as células B16F10 com SRPK silenciadas indicaram que SRPK2 parece estar envolvida na regulação da dinâmica de polimerização do citoesqueleto de Actina e atuando em processos relacionados à capacidade de formação de metástase das células B16F10, avaliados *in vitro* e *in vivo*. Adicionalmente, o nosso grupo de pesquisa já havia realizado dois ensaios de duplo-híbrido em leveduras que identificaram a possível interação entre a região espaçadora de SRPK2 (MELLO, 2014) ou SRPK2 inteira (SILVA, 2017) e proteínas envolvidas na regulação do citoesqueleto de Actina.

Somando essas informações com outras obtidas a partir da literatura, concluímos que seria fundamental estudar mais profundamente a interação entre SRPK2 e uma das proteínas reguladoras da dinâmica de Actina identificada pelo duplo-híbrido, a EFhd2 (MELLO, 2014).

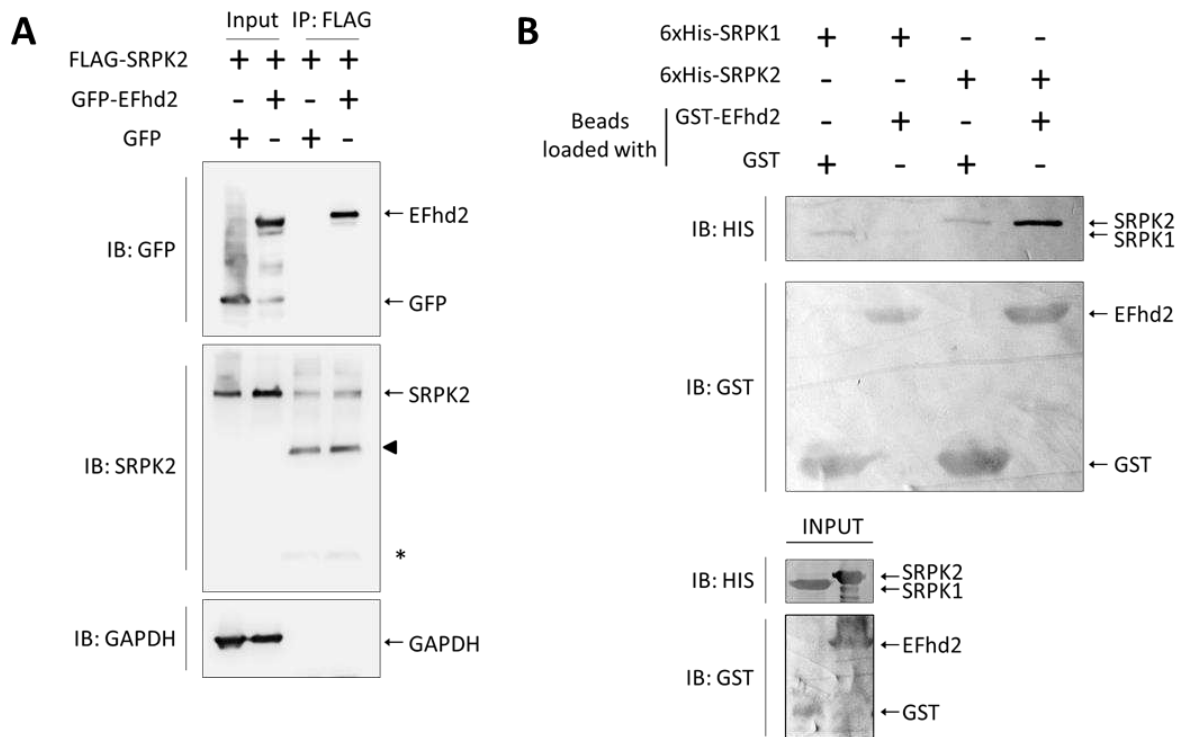
O maior entendimento sobre a interação entre SRPK2 e EFhd2 possivelmente nos permitirá compreender melhor o papel de SRPK2 na regulação da dinâmica de Actina.

Para avaliar a interação entre SRPK2 e EFhd2, inicialmente foi realizado o ensaio de co-imunoprecipitação utilizando lisado de células HEK293T superexpressando FLAG-SRPK2 e GFP-EFhd2. Com a realização desse ensaio, concluímos que as proteínas interagem (Figura 23A). Na canaleta em que foi aplicada as amostras provenientes da imunoprecipitação, no qual as duas proteínas estavam superexpressas, observa-se a banda referente a GFP-EFhd2, indicando que GFP-EFhd2 interagiu com FLAG-SRPK2, imobilizada na resina por meio do anticorpo anti-FLAG. FLAG-SRPK2 foi detectada para mostrar que essa proteína estava presente no lisado total e que se ligou ao anticorpo anti-FLAG imobilizado na resina de agarose proteína A. Na canaleta em que estava presente a amostra obtida a partir da imunoprecipitação em que apenas GFP e FLAG-SRPK2 estavam superexpressas, não é possível a visualização da banda correspondente à GFP, indicando que essa proteína não interage com FLAG-SRPK2.

Algum tempo após a realização deste ensaio de co-imunoprecipitação foi identificada uma mutação na sequência de nucleotídeos de EFhd2 clonada no vetor pEGFPC1 por Silva (2017). Essa mutação altera o resíduo de aminoácido na posição 66 de Asn para Asp (Apêndice C), o que poderia influenciar na interação identificada. No entanto, o mesmo resultado sobre a interação entre SRPK2 e EFhd2 foi obtido com o ensaio de *pulldown* utilizando as proteínas purificadas expressas em sistema procarioto (descrito a seguir), confirmando o resultado da co-imunoprecipitação e indicando que a mutação pontual verificada tem pouco ou nenhum efeito sobre a interação entre as proteínas.

O ensaio de *pulldown* foi realizado com a finalidade de avaliar a interação *in vitro* entre as proteínas recombinantes 6xhis-SRPK1, 6xhis-SRPK2 e GST-EFhd2. As proteínas GST ou GST-EFhd2 foram fusionadas à membrada de sepharose glutationa e incubadas com 6xHis-SRPK1 ou 6xHis-SRPK2 purificadas. Observa-se que há interação de GST-EFhd2 com 6xhis-SRPK2 nas condições avaliadas, mas GST-EFhd2 não interage com 6xhis-SRPK1 (Figura 23B).

Observamos uma pequena interação inespecífica entre GST e SRPK1 ou GST e SRPK2, porém a intensidade das bandas correspondentes foi muito menor em relação à intensidade da banda que indica a interação entre EFhd2 e SRPK2.



**Figura 23. Confirmação da interação entre SRPK2 e EFhd2.** (A) Co-imunoprecipitação de FLAG-SRPK2 e GFP-EFhd2. Células HEK293T foram transfectadas com pEGFP-C1/EFhd2 e pcDNA5/FRT/TO/SRPK2 para expressar GFP-EFhd2 e FLAG-SRPK2, respectivamente. Como controle negativo, as células foram transfectadas com pEGFP-C1/vazio e pcDNA5/FRT/TO/SRPK2. Os lisados foram imunoprecipitados com anti-FLAG e o *western blotting* foi realizado com anti-GFP ou anti-FLAG. A seta e o asterisco apontam, respectivamente, a cadeia pesada e leve do anti-FLAG usado na imunoprecipitação. (B) Avaliação da interação de 6xHis-SRPK1 ou 6xHis-SRPK2 com GST-Efhd2 por *pull-down*. GST-EFhd2 ou GST (controle negativo) foram ligadas à resina de *Glutathione Sepharose 4B* e posteriormente incubadas com 6xHis-SRPK1 ou 6xHis-SRPK2 purificadas. A interação das proteínas foi verificada por *western blotting* utilizando anti-GST para detectar GST-EFhd2 ou GST livre e anti-His para detectar 6xHis-SRPK1 ou 6xHis-SRPK2.

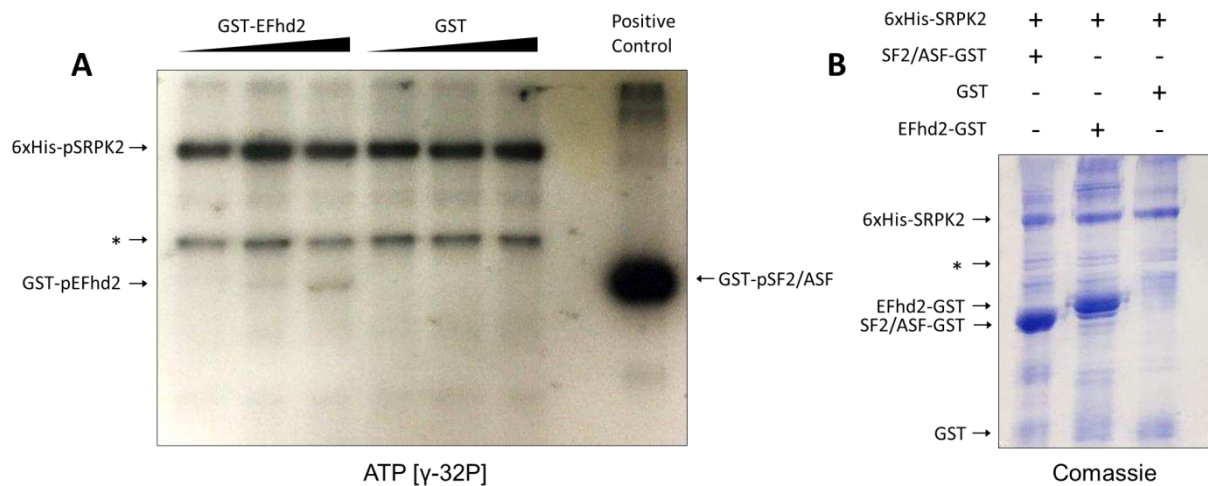
### 5.9. Ensaios de fosforilação *in vitro* utilizando ATP radioativo

Para avaliar se EFhd2 pode ser um substrato para SRPK2 ou se EFhd2 é capaz de induzir a autofosforilação de SRPK2 foi realizado o ensaio de fosforilação *in vitro* utilizando ATP marcado radioativamente.

Neste ensaio foram utilizadas as proteínas recombinantes produzidas em bactéria 6xHis-SRPK2, GST-EFhd2, GST-SF2/ASF (controle positivo) ou GST (controle negativo). Como mostrado na Figura 24A, a intensidade da banda referente à proteína GST-SF2/ASF fosforilada indica que 6xHis-SRPK2 estava fortemente ativa durante a reação de fosforilação. Foi observado que 6xHis-SRPK2 é capaz de se autofosforilar independentemente da presença de GST-EFhd2, pois a mesma intensidade de autofosforilação foi verificada quando apenas GST estava presente na reação. Além disso, a quantidade crescente de substrato parece não

influenciar na autofosforilação de 6xHis-SRPK2 pois a intensidade dessa banda permaneceu constante à medida em que aumentamos a quantidade de substrato na reação de fosforilação.

A presença de uma banda de intensidade fraca foi verificada na região do filme em que estavam presentes as amostras contendo GST-EFhd2 como substrato, sendo que o aumento da intensidade ocorreu de forma proporcional ao aumento da concentração de GST-EFhd2 na reação de fosforilação. O mesmo não foi observado quando apenas GST estava presente. Este resultado indica que EFhd2 pode ser um substrato para SRPK2. A diferença na intensidade da banda quando GST-EFhd2 ou GST-SF2/ASF atuam como substrato na reação de fosforilação pode ser explicada pelo número de sítios de fosforilação presente nessas proteínas. GST-SF2/ASF é uma proteína SR que pode ser hiperfosforilada na presença de SRPK2, justificando o tamanho e a intensidade da banda. O mesmo não ocorre quando GST-EFhd2 atua como substrato, pois em sua estrutura há poucos sítios passíveis de fosforilação.



**Figura 24. Ensaio de fosforilação com ATP radioativo.** Foi utilizada 6xHis-SRPK2 purificada por afinidade em coluna carregada com resina de níquel e como substrato GST-EFhd2, GST-SF2/ASF (controle positivo) ou GST (controle negativo). (A) As reações contendo 6xHis-SRPK2, ATP [ $\gamma$ - $^{32}$ P] e cada substrato foram realizadas por 30 minutos a 30 °C e posteriormente o gel foi exposto ao filme durante 72 h permitindo a detecção de fosforilação. (B) A mistura da reação contendo ATP frio foi separada em gel SDS-PAGE 10% e corada com Coomassie blue para visualização das bandas de proteínas. \*A banda indicada pelo asterisco ainda não foi identificada.

Foi observada a presença de uma banda indicada pelo asterisco na Figura 24A que ainda não foi identificada pelo nosso grupo de pesquisa. Possivelmente essa banda pode corresponder a uma forma truncada de 6xHis-SRPK2 expressa em bactéria que permaneceu em solução ainda que 6xHis-SRPK2 tenha sido purificada por cromatografia de afinidade em

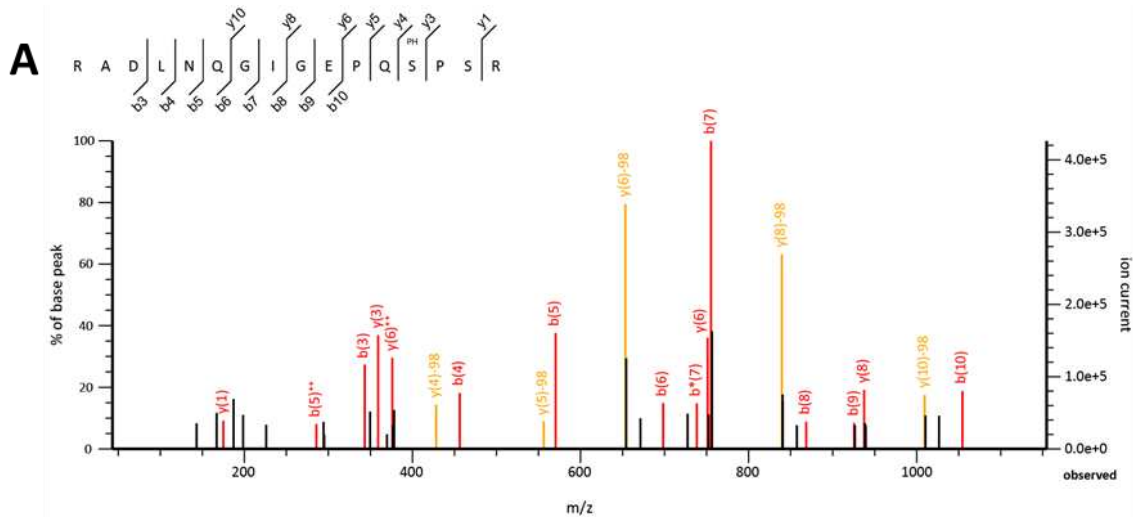
coluna carregada com resina de níquel. Essa forma truncada pode estar se autofosforilando ou pode estar sendo fosforilada por 6xHis-SRPK2 inteira presente na reação de fosforilação.

A Figura 24B corresponde ao gel de poliacrilamida corado com Coomassie blue em que foram aplicadas as amostras provenientes do ensaio de fosforilação em que ATP frio (não radioativo) foi utilizado. Verificamos a presença de bandas correspondentes às proteínas envolvidas na reação de fosforilação.

### **5.10. Ensaio de fosforilação - espectrometria de massas**

Este ensaio foi realizado para confirmar a fosforilação de EFhd2 por SRPK2 e também para identificar o resíduo de aminoácido fosforilado em EFhd2. As reações de fosforilação foram preparadas com as proteínas purificadas 6xHis-EFhd2 e 6xHis-SRPK2 e analisadas por espectrometria de massas.

A análise inicial do sítio de fosforilação foi realizada usando um espectrômetro de massas quadrupolo orbitrap (Q Exactive HF). A fragmentação do peptídeo por MS/MS produziu um espectro permitindo a identificação das séries de íons b e y, e a busca do resultado no Mascot identificou a sequência RADLNQGIGEPQpSPSR. O sítio de fosforilação identificado corresponde ao resíduo de Serina em EFhd2, na posição 74 (Figura 25). Na Figura 25B está representada a sequência completa de resíduos de aminoácidos de EFhd2, onde está evidenciado (em vermelho) o resíduo Ser74 que pode ser fosforilado por SRPK2.



**B** >NP\_077305.2 EF-hand domain-containing protein D2 [Homo sapiens]  
 MATDELATKLSRRLQMEGEGGGGETPEQPGLNGAAAAAAGAPDEAAEALGSADCELSAKLLRRAD  
 LNQGIGEPQSPSRRVFNPYTEFKEFSRKQIKDMEKMFQYDAGRDFIDLMEKLMMEKLGAPQT  
 HLGLKNMIKEVDEDFDSKLSFRELLIFRKAAGELQEDSGLCVLARLSEIDVSSEGVKGAKSFFFEAKV  
 QAINVSSRFEEIKAQEERKKQAEEMKQRKAAFKELQSTFK

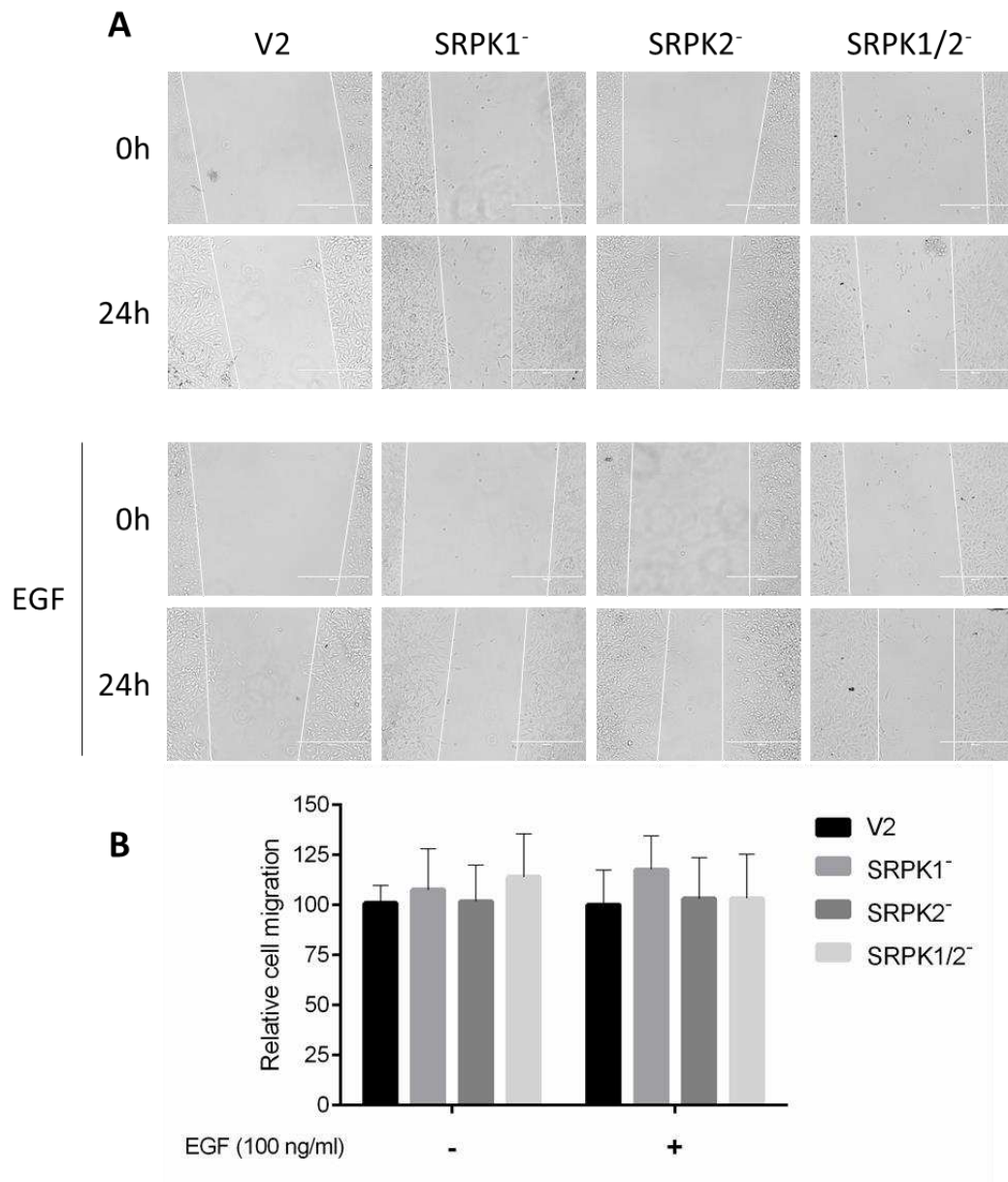
**Figura 25. Identificação do sítio de fosforilação em EFhd2 por SRPK2.** (A) Após a realização do ensaio de fosforilação, as proteínas foram digeridas com tripsina e os peptídeos resultantes foram analisados por LC-MS/MS. Cada espectro MS/MS é uma coleção de íons produzidos por dissociação induzida por colisão a partir do peptídeo intacto. A fragmentação ocorre preferencialmente nas ligações peptídicas gerando fragmentos N-terminais (íons b) e C-terminais (íons y) em taxas m/z e intensidades que proporcionam informações a respeito da sequência do peptídeo e sítios de modificações (indicado pelas linhas verticais entre os resíduos de aminoácidos da sequência do peptídeo). O espectro MS/MS ilustra os fragmentos resultantes dos íons das séries b e y, usados para determinar a sequência correspondente ao fosfopeptídeo RADLNQGIGEPQpSPSR. EFhd2 é fosforilada por SRPK2 no resíduo de Serina 74. (B) Sequência dos resíduos de aminoácidos de EFhd2. Em vermelho está evidenciado o resíduo Ser74.

## 6. RESULTADOS COMPLEMENTARES

### 6.1. Efeito do silenciamento de SRPK em migração celular

Para o desenvolvimento da metástase, é necessário que as células tumorais adquiram a capacidade de migrar e invadir os tecidos adjacentes e extravasar aos vasos sanguíneos ou linfáticos. O ensaio de migração “*wound healing*” foi realizado utilizando as células B16F10 SRPK<sup>-</sup>. Nós já conhecíamos o fenótipo migratório dessas células (MOREIRA et al., 2018), e por isso realizamos este ensaio com o objetivo de avaliar se o silenciamento de SRPK afeta a capacidade migratória das células B16F10.

O resultado mostra que, nas condições avaliadas, o silenciamento de SRPK parece não afetar a migração dessas células (Figura 26).



**Figura 26. Efeito do silenciamento de SRPK na migração de células B16F10 pelo ensaio “wound healing”.** (A) A migração celular foi monitorada por observação ao microscópio nos tempos de 0 e 24 h após o risco na placa contendo as células tratadas ou não com EGF (100 ng/ml). O ensaio foi realizado em triplicata. (B) Representação gráfica da migração celular de B16F10 SRPK<sup>-</sup> na presença ou ausência de EGF. As imagens foram analisadas pelo *software* ImageJ. Foram realizadas três medidas do tamanho da fenda (parte superior, central e inferior) em cada imagem. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste de Dunnet ( $P < 0,05$ ) e expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Para plotagem do gráfico, o tamanho médio da fenda nos poços controle (B16F10 V2) foi definido como 100% e o comprimento nos demais poços foi calculado proporcionalmente ao controle.

Entretanto, nota-se que após 24 h de incubação, o risco não se fechou em nenhum dos poços, nem mesmo no poço controle, V2. O resultado obtido neste trabalho difere um pouco do que já foi observado para as células B16F10 *wild type*, em que o tempo de 24 h é suficiente

para o fechamento completo do risco (MOREIRA et al., 2018). Essa discrepância indica que a transdução das células com o vetor lentiviral, ainda que não contenha a sequência do sgRNA, parece afetar a capacidade de migração das células B16F10.

Com o resultado obtido, concluímos que o ensaio de migração pelo método “*wound healing*” não está adequado para avaliar a interferência do silenciamento de SRPK na capacidade de migração das células B16F10.

## **6.2. Efeito do silenciamento de SRPK na regulação da via NFκB e na expressão de genes relacionados à EMT**

O melanoma utiliza a via de NFκB para regular sua sobrevivência, proliferação e resistência à apoptose e metástase. Essa via pode ser considerada o principal fator antiapoptótico celular por induzir a expressão de importantes proteínas antiapoptóticas e por restringir a atividade da família de caspases, central na maioria dos processos apoptóticos. NFκB também promove o crescimento celular pela indução da expressão de ciclina D1, um importante regulador da progressão do ciclo celular (MADONNA et al., 2012). A via de NFκB também é capaz de induzir a transição epitelial-mesenquimal por meio da regulação da expressão de vários genes envolvidos em EMT (PIRES et al., 2017).

Apesar dos papéis oncogênicos de NFκB, essa via também já foi encontrada atuando na supressão do tumor, demonstrando a sua complexidade de atuação e regulação no desenvolvimento do tumor ou em terapias (JING; LEE, 2014).

A senescência celular é um programa antiproliferativo que limita a propagação de células neoplásicas e pode ser induzida por danos ao DNA (sobretudo aqueles produzidos por agentes quimioterápicos citotóxicos), radiação ionizante, estresse oxidativo, entre outros fatores. As células em senescência secretam fatores pró-inflamatórios e devido a isso essa condição tem sido chamada de fenótipo secretor associado a senescência (SASP, *senescence-associated secretory phenotype*). A principal característica da SASP é a indução irreversível da parada do ciclo celular, sendo, portanto um potente mecanismo de supressão de tumor. A principal via de sinalização indutora da SASP é a via de NFκB, e como consequência, as células secretam uma variedade de citocinas inflamatórias e outros moduladores imunes, como as interleucinas IL1, IL6, IL8, TGF-β e TNFα (SALMINEN et al., 2012; KULILMAN et al., 2008; PRATTICHIZZO et al., 2016).

Em câncer de mama, já foi observada a relação entre SRPK1 e a via de NFκB. O *knockdown* de SRPK1 inibiu a migração das células tumorais, sendo que o efeito observado

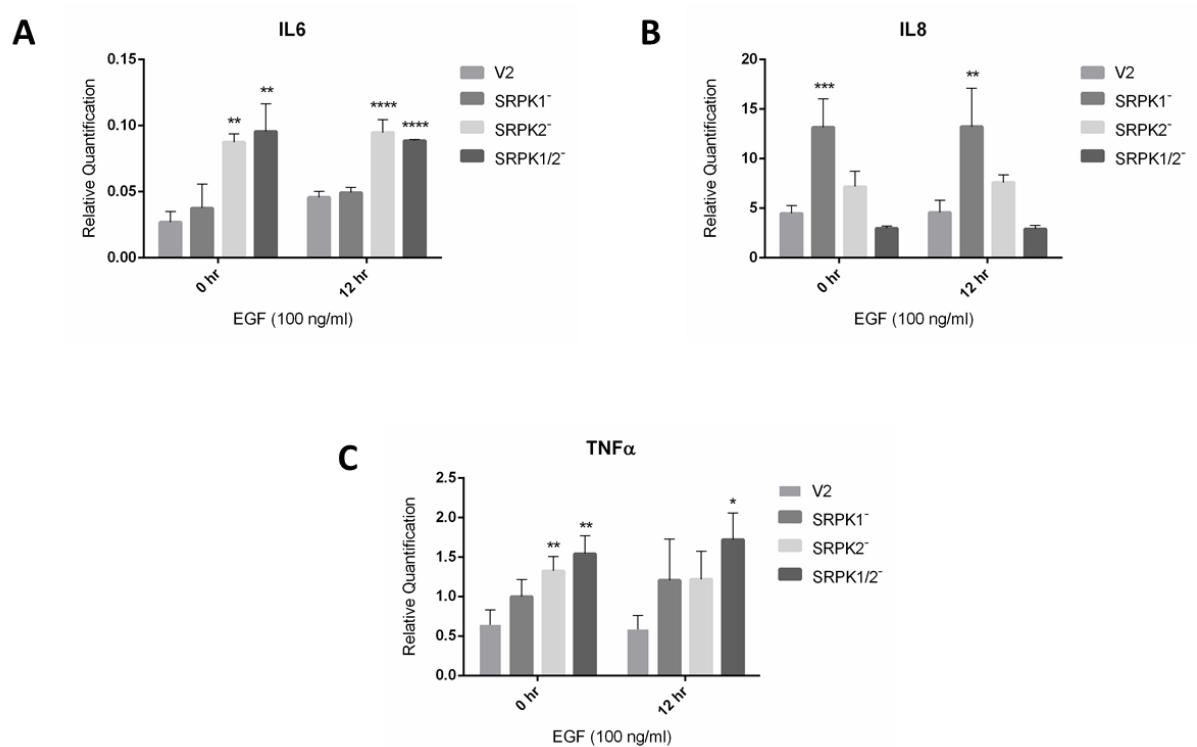
foi mediado pela modulação da expressão de genes envolvidos nas vias canônicas e não-canônicas de NFκB (ROOSMALEN et al., 2015). Em câncer de cólon, SRPK1 contribui para a regulação do *splicing* alternativo de Rac1b, uma pequena GTPase que promove progressão do ciclo celular e sobrevivência via sinalização de NFκB (MATOS et al., 2016).

Uma relação indireta entre SRPK2 e a via de NFκB foi observada em câncer de cólon, no qual a atuação de SRPK2 levou ao aumento da expressão de TWIST1 e outros genes capazes de induzir a transição epitelial-mesenquimal (YANG et al., 2018). TWIST1 é um dos principais fatores de transcrição envolvidos em EMT, sendo que sua expressão pode ser regulada por NFκB (PIRES et al., 2017).

A fim de avaliarmos de forma mais direta se há relação entre a ação de SRPK2 e a modulação da via de NFκB, assim como a relação entre SRPK2 e a indução de EMT em melanoma, avaliamos a expressão de genes sob o controle do promotor de NFκB e a expressão de genes envolvidos em EMT por meio de PCR *real time* quantitativo.

Dois experimentos diferentes foram realizados. No primeiro, a análise da expressão dos genes em estudo foi feita em células B16F10 SRPK<sup>-</sup> tratadas com EGF (100 ng/ml) durante 12 h. Após o período de incubação com EGF, o RNA dessas células foi extraído. O segundo experimento está descrito no item 4.2.1, em que as células B16F10 SRPK<sup>-</sup> foram inoculadas no flanco direito dos camundongos e os tumores desenvolvidos nos animais foram utilizados para a extração do RNA e análises posteriores.

A análise da expressão dos genes regulados por NFκB, IL6, IL8 e TNFα em células B16F10 SRPK<sup>-</sup> tratadas com EGF, mostrou que o silenciamento de SRPK parece afetar essa via (Figura 27). Observamos que o silenciamento de SRPK2 ou o silenciamento simultâneo de SRPK1 e SRPK2 aumentaram a expressão de IL6 (Figura 27A) e TNFα (Figura 27C) e o silenciamento de SRPK1 aumentou a expressão de IL8 (Figura 27B).



**Figura 27. RT-qPCR foi realizado para avaliar a expressão de genes sob controle do promotor de NF $\kappa$ B (A, B, C) em células B16F10 SRPK<sup>-</sup>.** Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. A análise estatística foi feita pelo teste de Dunnet ( $P < 0,05$ ), considerando o grupo controle, V2, em cada tempo analisado.

Muitos estudos tem demonstrado que a inflamação crônica está ligada ao desenvolvimento do câncer (GRIVENNIKOV et al., 2010). Entretanto, certos tipos de inflamação também apresentam um efeito de supressão tumoral (HAABETH et al., 2012).

As citocinas pró-inflamatórias IL6, IL8 e TNF $\alpha$  já foram relatadas com expressão alterada em muitos tipos de câncer. O aumento da concentração de IL6 no soro de pacientes já foi correlacionado à sua curta sobrevivência em casos de mieloma múltiplo, linfoma, câncer de ovário, próstata, carcinoma renal, mama e melanoma. As funções de IL6 no tumor são relacionadas à inibição de apoptose e indução da angiogênese (HOEJBERGA et al., 2012). Inversamente, já foi observado que IL6 também pode apresentar funções de supressão de tumor. Células B16F10 transfectadas com um vetor para superexpressar IL6 se tornaram menos tumorigênicas quando inoculadas em camundongos, assim como os tumores tratados com IL6 recombinante apresentaram um volume menor. O mecanismo que parece explicar esses eventos observados são a diminuição da angiogênese, apesar desse resultado não ser esperado devido à função de IL6 como um mediador de inflamação (SUN et al., 1992).

IL8 apresenta a função de recrutar leucócitos aos sítios de infecção, promovendo degranulação de neutrófilos. A sinalização iniciada por IL8 em células endoteliais induz angiogênese (LI et al., 2003). O papel de IL8 em tumores está relacionado à alteração da composição das células imunes no microambiente tumoral, indução de angiogênese, invasão e resistência ao tratamento (LONG et al., 2016).

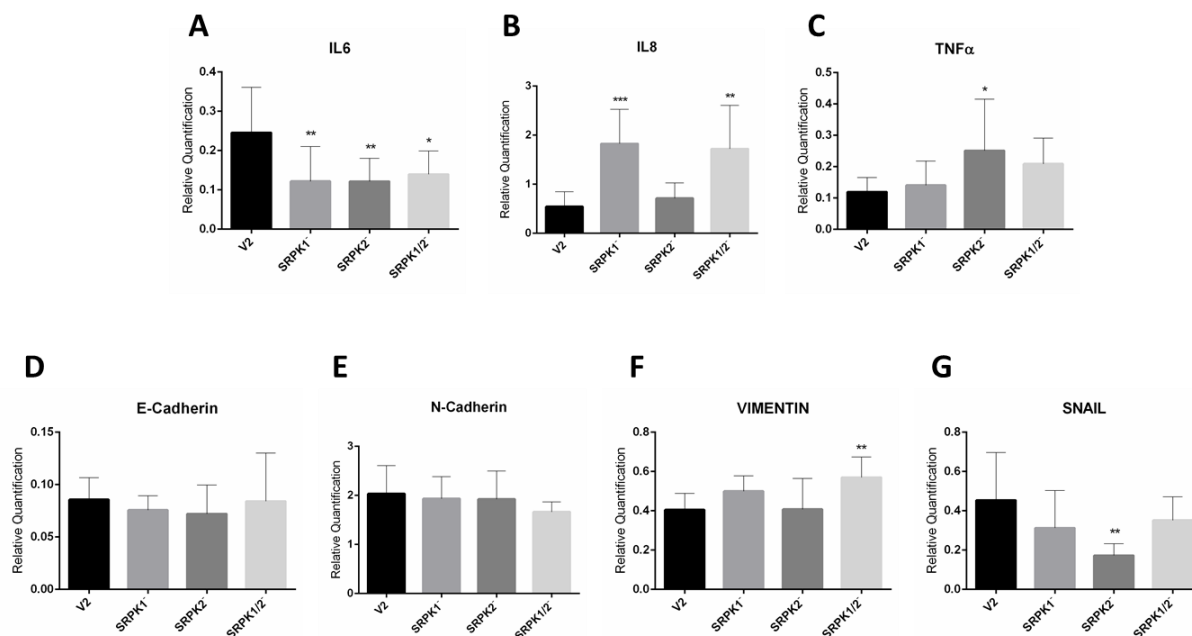
TNF $\alpha$  é uma citocina produzida por macrófagos ativados e outras células relacionado ao desenvolvimento de processos inflamatórios. Em câncer, TNF $\alpha$  apresenta um papel dual, podendo atuar como um sinal de regressão ou sobrevivência para as células cancerígenas, pois pode promover necrose tumoral, mas também migração e invasão, além de regular a infiltração de macrófagos promotores de tumor no microambiente tumoral (MONTFORT et al., 2019). Sendo assim, a atuação de TNF $\alpha$  é bastante complexa em câncer, e o desequilíbrio do seu nível apresenta efeitos opostos nesse contexto.

Os resultados encontrados aqui nos dão indícios de que as SRPKs pode estar afetando a via de NF $\kappa$ B, entretanto essa análise foi realizada utilizando as células B16F10 *in vitro*, fora de um contexto tumoral. A fim de tentarmos entender mais profundamente o papel de cada citocina, nós também avaliamos a sua expressão nos tumores extraídos dos camundongos após a realização do experimento *in vivo* (item 4.2.1), pois o tumor está inserido em um microambiente complexo onde há a interação entre as células tumorais e as células do sistema imune.

Alguns resultados sobre o nível de expressão das proteínas em análise foram semelhantes entre as amostras dos experimentos *in vitro* e *in vivo*. A expressão de IL8 permaneceu aumentada nos animais inoculados com as células B16F10 SRPK1<sup>-</sup> e SRPK1/2<sup>-</sup> (Figura 28B). A expressão de TNF $\alpha$  também permaneceu alta nos tumores de animais inoculados com as células B16F10 SRPK2<sup>-</sup> (Figura 28C). Já a expressão de IL6 apresentou grande alteração no padrão de expressão quando comparado ao que foi visto nas amostras de células cultivadas *in vitro*. Nos tumores, houve diminuição da expressão de IL6 em todas as amostras avaliadas (Figura 28A).

A análise dos genes relacionados à EMT nos tumores não permitiu uma análise muito precisa sobre o desenvolvimento deste processo devido à expressão das proteínas avaliadas ter diferido pouco entre os grupos (Figura 28D a F). O marcador mesenquimal, Vimentin, teve sua expressão aumentada nos tumores desenvolvidos a partir da inoculação das células B16F10 SRPK1/2<sup>-</sup>. SNAIL é um dos fatores de transcrição responsáveis por ativar EMT em células epiteliais (PIRES et al., 2017), e a sua expressão foi diminuída nos tumores dos

animais inoculados com as células B16F10 SRPK2<sup>-</sup>. O resultado encontrado neste estudo nos dá um indício da relação entre a atividade de SRPK2 e o desenvolvimento de EMT em melanoma metastático (Figura 28G).



**Figura 28. RT-qPCR foi realizado para avaliar a expressão de genes sob controle do promotor de NF $\kappa$ B (A, B, C) e genes envolvidos em EMT (D, E, F, G) nos tumores de camundongos gerados a partir da inoculação subcutânea das células B16F10 SRPK<sup>-</sup>. A análise estatística foi feita pelo teste de Dunnet ( $P < 0,05$ ) considerando o grupo controle, V2.**

A análise dos genes relacionados à EMT nos tumores não permitiu uma análise muito precisa sobre o desenvolvimento deste processo devido à expressão das proteínas avaliadas ter diferido pouco entre os grupos (Figura 28D a F). O marcador mesenquimal, Vimentin, teve sua expressão aumentada nos tumores desenvolvidos a partir da inoculação das células B16F10 SRPK1/2<sup>-</sup>. SNAIL é um dos fatores de transcrição responsáveis por ativar EMT em células epiteliais (PIRES et al., 2017), e a sua expressão foi diminuída nos tumores dos animais inoculados com as células B16F10 SRPK2<sup>-</sup>. O resultado encontrado neste estudo nos dá um indício da relação entre a atividade de SRPK2 e o desenvolvimento de EMT em melanoma metastático (Figura 28G).

As análises da expressão relativa dos genes em estudo nos tumores devem ser consideradas cuidadosamente, pois ao relacionarmos os dados de expressão obtidos com o resultado das medidas de volume do tumor ao longo do experimento (Figura 16B) percebemos que o volume tumoral só foi estatisticamente diferente entre os grupos no 13<sup>o</sup> dia do experimento. Entretanto, os tumores utilizados nas análises de RT-qPCR foram coletados

no 17º dia, quando o volume ou a massa tumoral já não diferiam entre os grupos (Figura 16C).

A verificação do padrão de expressão das proteínas em análise seria mais confiável se os tumores tivessem sido coletados mais próximos ao 13º dia de experimento, quando o seu crescimento estava estatisticamente diferente entre os grupos. Nós já conhecíamos o padrão de crescimento do tumor gerado a partir da inoculação de células B16F10 *wild type* em camundongos durante o período de 14 dias (MOREIRA et al., 2018). Ao compararmos o volume dos tumores nos animais inoculados com as células B16F10 SRPK<sup>-</sup> em relação aos tumores nos animais inoculados com as células B16F10 *wild type*, verificamos que o crescimento do tumor ocorreu de forma diferente. O tumor cresceu mais devagar nos animais inoculados com as células B16F10 SRPK<sup>-</sup>, até mesmo no grupo controle, V2. Com isso, no trabalho atual decidimos estender o período das medições de largura e comprimento dos tumores além dos 14 dias, o que não surtiu efeito significativo nas análises. Pelo contrário, após este período o volume dos tumores não diferiu mais entre os grupos e todos continuaram aumentando intensamente (Figura 16B).

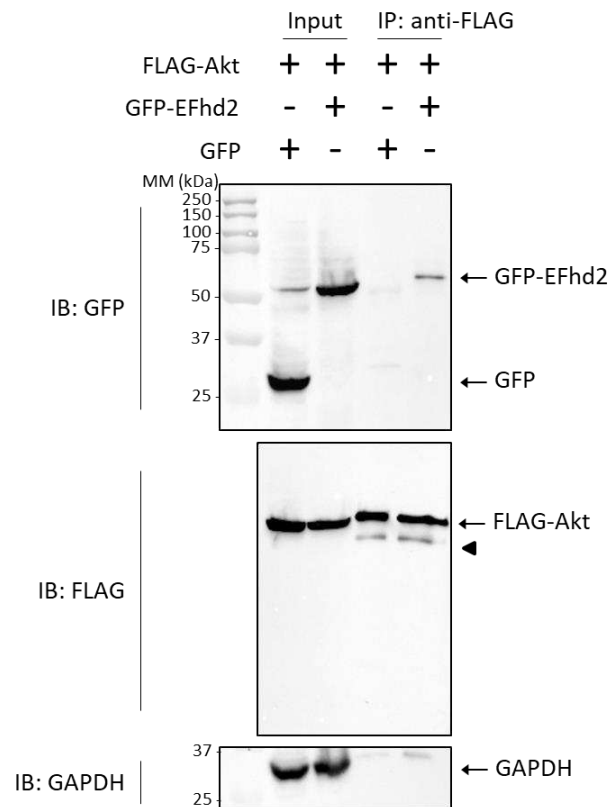
Os resultados encontrados nos dão um indício de que SRPK pode estar atuando na regulação da via NFκB e desenvolvimento de EMT, no entanto outros experimentos ainda precisam ser realizados para a confirmação dessa hipótese.

### 6.3. Avaliação da interação entre Akt e EFhd2

Considerando que SRPK2 e EFhd2 estão envolvidas na via de sinalização iniciada por EGF e que Akt é uma proteína importante na mediação dessa via conhecida por ativar SRPK (HUH et al., 2013; ZHOU et al., 2012), inicialmente formulamos a hipótese de que as proteínas EFhd2 e Akt poderiam estar atuando em complexo, induzindo a ativação de SRPK2. Por isso, avaliamos a interação entre EFhd2 e Akt, por co-imunoprecipitação.

O clone pcDNA5/FRT/TO/Akt foi doado gentilmente pela pesquisadora Dra. Juliana Helena Costa Smetana, do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM). O clone pEGFP-C1/EFhd2 foi obtido por Silva (2017). Detalhes da metodologia estão descritos no item 4.5.1.

A análise mostrou que FLAG-Akt e GFP-EFhd2 interagem (Figura 29), pois GFP-EFhd2 foi identificada na canaleta em que foi aplicada a amostra obtida a partir da co-imunoprecipitação de FLAG-Akt. A proteína GFP (controle negativo) não foi identificada, indicando que essa proteína não interage com FLAG-Akt.



**Figura 29. Confirmação da interação entre Akt e EFhd2.** Co-imunoprecipitação de FLAG-Akt e GFP-EFhd2. Células HEK293T foram transfectadas com pEGFP-C1/EFhd2 e pcDNA5/FRT/TO/Akt para expressar GFP-EFhd2 e FLAG-Akt, respectivamente. Como controle negativo, as células foram transfectadas com pEGFP-C1/vazio e pcDNA5/FRT/TO/Akt. FLAG-Akt foi imunoprecipitada com anti-FLAG e o *western blotting* foi realizado com anti-GFP ou anti-FLAG. A seta aponta a cadeia pesada anti-FLAG usado na imunoprecipitação.

#### 6.4. Expressão heteróloga de 6xHis-Destrin em sistema procarioto

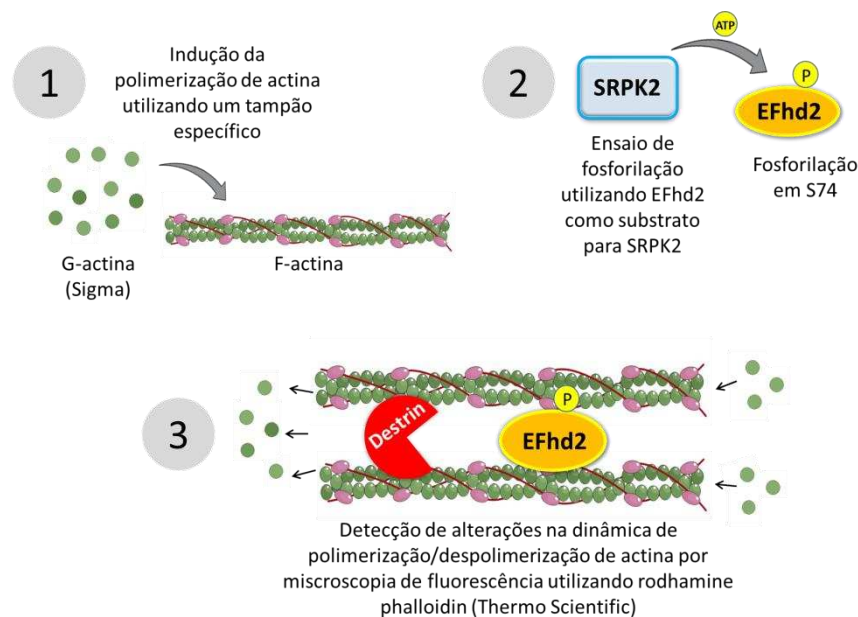
Destrin é uma proteína despolimerizante do filamento de actina pertencente à família ADF/Cofilin (YEOH, et al., 2002). A obtenção de 6xHis-Destrin a partir da clonagem, expressão e padronização dos métodos de purificação foi necessária para a realização de um ensaio que nos permitisse avaliar a influência de SRPK2 sobre a atividade de EFhd2 em regular o acesso de cofilina à Actina e a dinâmica de polimerização/despolimerização dos filamentos de Actina, *in vitro* (HUH et al., 2013).

Para realizar o ensaio planejado, o nosso grupo de pesquisa já havia padronizado a expressão e a purificação de 6xHis-SRPK2 e GST-EFhd2, e já possuíamos a G-Actina comercial (Sigma). Precisávamos de uma proteína com função despolimerizante de F-Actina. Destrin, também conhecida como ADF (*Actin-Depolymerizing Factor*) é uma proteína

reguladora de Actina com função despolimerizante dos filamentos, pertencente à família ADF/Cofilina (CHEN et al., 2000). A sequência codificante de Destrin foi retirada do vetor de levedura, pGADT7 (Clontech), isolado da biblioteca de cDNA universal humana (SILVA, 2017) e clonada em vetor pET28a para a expressão em sistema procarioto.

A análise do resultado deste ensaio seria realizada utilizando Rodhamine Phalloidin (Thermo Scientific), capaz de se ligar à Actina apenas no estado de filamento, permitindo a detecção de F-Actina por microscopia de fluorescência (ESTES et al., 1981). Considerando que o papel de EFhd2 na dinâmica de actina é se ligar ao filamento impedindo sua despolimerização, então a presença da proteína despolimerizante de Actina, 6xHis-Destrin, seria indispensável no experimento. Isso porque o resultado só seria visualizado caso houvesse alguma alteração na dinâmica de polimerização/despolimerização de Actina, o que não seria possível se apenas EFhd2 estivesse ligada ao filamento.

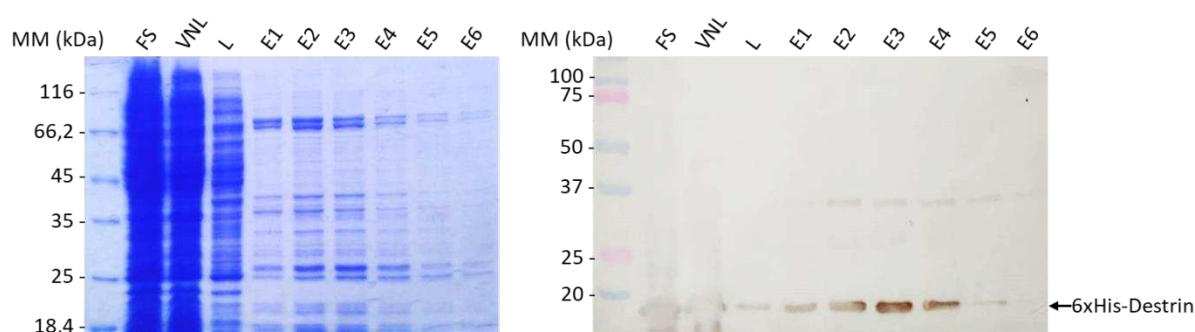
O desenho experimental está ilustrado na Figura 30. Para a realização deste ensaio, a G-actina seria incubada com um tampão específico para a indução da formação de F-actina (etapa 1) e a reação de fosforilação seria realizada entre SRPK2 e o seu substrato, EFhd2 (etapa 2).



**Figura 30. Esquema representativo do ensaio de polimerização/despolimerização de Actina.** Este experimento seria realizado para avaliar o efeito da fosforilação de EFhd2 por SRPK2 em S74 no controle da dinâmica da polimerização/despolimerização da Actina. O ensaio seria realizado em três etapas. 1: Indução da formação de F-Actina a partir de G-Actina utilizando um tampão específico para esse fim (HUH et al., 2013). 2: Ensaio de fosforilação utilizando 6xHis-SRPK2 e GST-EFhd2 purificadas. 3: Avaliação de alterações da dinâmica de polimerização/despolimerização da Actina.

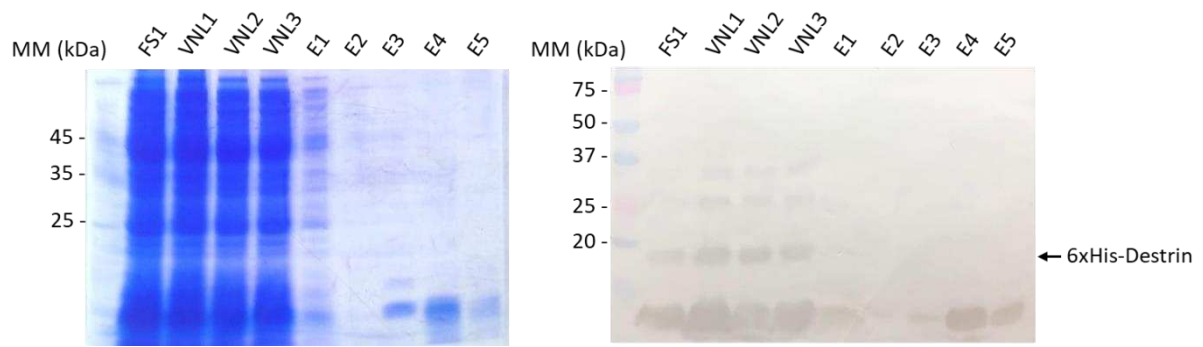
Posteriormente, EFhd2 fosforilada seria incubada com Destrin e F-actina a fim de verificarmos o efeito da fosforilação em EFhd2 na dinâmica de polimerização/despolimerização da Actina (etapa 3). A função de Destrin seria despolimerizar a Actina causando alterações nos níveis de fluorescência, pois a detecção de F-actina seria feita por Rodhamine Phalloidin e o ensaio seria revelado por microscopia de fluorescência.

Os resultados das tentativas de purificação de 6xHis-Destrin estão descritos a seguir. O gel de poliacrilamida 12% e o *western blotting*, referentes à cromatografia de afinidade utilizando resina de níquel podem ser observados na Figura 31. A proteína 6xHis-Destrin apresenta massa molecular predita de aproximadamente 20 kDa (TOKURAKU et al., 2001). A análise da purificação de 6xHis-Destrin eluída da coluna mostrou que a proteína não foi purificada de forma eficiente, pois essas eluições apresentavam outras proteínas contaminantes.



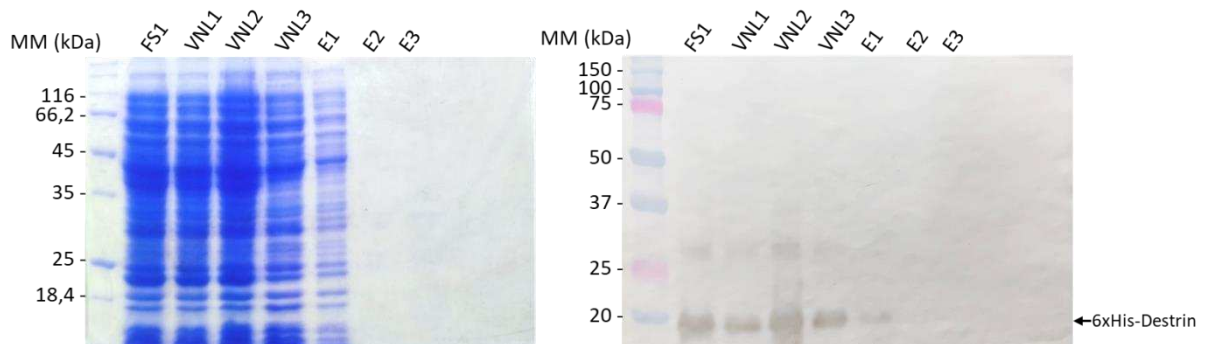
**Figura 31. Perfil da purificação de 6xHis-Destrin em coluna carregada com níquel.** 6xHis-Destrin foi purificada utilizando a resina His-Select Nickel Affinity Gel e aproximadamente 100 µg de proteína foram aplicados no gel de poliacrilamida. A seta aponta a banda referente a 6xHis-Destrin (massa molecular predita de 20,4 kDa) parcialmente purificada em seis eluições. MM: Padrão de peso molecular (em kDa); FS: fração solúvel; VNL: volume não ligado; L: lavagem; E1 a E6: eluições 1 a 6. Gel de poliacrilamida 12%.

A fim de tentar melhorar a purificação de 6xHis-Destrin, foi realizada a cromatografia de troca catiônica em sistema FPLC utilizando a coluna Capto S (GE Healthcare). Podemos verificar que a purificação de 6xHis-Destrin pela cromatografia de troca catiônica não foi eficiente, uma vez que não foi observada a presença de 6xHis-Destrin em nenhuma das eluições (Figura 32). Isso indica que a interação entre a proteína e a coluna não foi forte o suficiente e a proteína saiu em grande quantidade no volume não ligado. Sendo assim, o método de purificação catiônica também não foi eficiente para purificar 6xHis-Destrin.



**Figura 32. Perfil da purificação de 6xHis-Dextrin em coluna de troca catiônica.** 6xHis-Dextrin foi purificada utilizando a coluna Cpto S (GE Healthcare) e aproximadamente 100  $\mu$ g de proteína foram aplicados no gel de poliacrilamida. A seta aponta a banda referente a 6xHis-Dextrin (massa molecular predita de 20,4 kDa). MM: Padrão de peso molecular (em kDa); FS1 e FS2: fração solúvel; VNL1, VNL2 e VNL3: alíquotas do volume não ligado coletadas em tempos diferentes; E1 a E5: eluições 1 a 5. Gel de poliacrilamida 12%.

Como os métodos anteriores não foram satisfatórios para a purificação de 6xHis-Dextrin, foi realizada a tentativa de purificação aniônica utilizando a resina Cpto Q. Observamos que este método também não foi satisfatório visto que a maioria da quantidade de 6xHis-Dextrin saiu no volume não ligado e a pequena quantidade presente na primeira eluição está muito contaminada com outras proteínas (Figura 33).



**Figura 33. Perfil da purificação de 6xHis-Dextrin em coluna de troca aniônica.** 6xHis-Dextrin foi purificada utilizando a coluna Cpto Q (GE Healthcare) e aproximadamente 100  $\mu$ g de proteína foram aplicados no gel de poliacrilamida. A seta aponta a banda referente a 6xHis-Dextrin (massa molecular predita de 20,4 kDa). MM: Padrão de peso molecular (em kDa); FS1 e FS2: fração solúvel; VNL1, VNL2 e VNL3: alíquotas do volume não ligado coletadas em tempos diferentes; E1 a E3: eluições 1 a 3. Gel de poliacrilamida 12%.

As tentativas de purificação de 6xHis-Dextrin não foram eficientes. Novas condições ou métodos de purificação deveriam ter sido testados, entretanto, optamos por encerrar os testes devido à falta de tempo hábil para realizar o experimento planejado.

## 7. DISCUSSÃO

Há quase 10 anos, Hanahan e Weinberg (2011) acreditaram que a complexidade do câncer poderia ser reduzida a um pequeno número de propriedades que ditam o seu crescimento maligno: autossuficiência em fatores de crescimento; insensibilidade aos inibidores de crescimento; evasão da apoptose; potencial replicativo ilimitado; angiogênese; reprogramação do metabolismo energético; evasão da destruição pelo sistema imune; invasão e metástase tecidual (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Com o desenvolvimento desse trabalho, investigamos o efeito do silenciamento de SRPK em processos importantes que fazem com que a linhagem de células de melanoma, B16F10, seja tão agressiva e avaliamos *in vivo* o efeito da supressão da expressão de SRPK no desenvolvimento do melanoma metastático.

O silenciamento da expressão de SRPK nas células B16F10 foi realizado pelo sistema CRISPR/Cas9. Neste sistema, a via NHEJ é o mecanismo de reparo predominante em células de mamíferos após a quebra da dupla fita pela Cas9. Essa via repara quebras na dupla fita independentemente de um *template* homólogo. O sistema de reparo NHEJ trabalha de maneira randômica em relação à inserção e deleção de nucleotídeos, o que o torna mais suscetível a erros, originando estruturas alteradas sem inativação de genes ao longo dos eventos de reparo. Assim podem ser gerados eventos de *knockout* incompleto que ainda apresentam alelos codificantes de proteínas funcionais ou com funcionalidade alterada (MAO et al., 2008; SCHARF et al., 2018).

O desenvolvimento do sistema CRISPR/Cas9 permitiu avanços extraordinários em diversos campos da ciência. Entretanto, a aplicação desse sistema em modelos de células de câncer hiperdiploides ainda é desafiador. Scharf et al., (2018) mostraram que a edição genômica em linhagens celulares de hepatoma multi-alélico ocorreu de forma incompleta, pois após a edição genômica para gerar o *knockout* da proteína Axl nessas células, um clone de células ainda manteve uma pequena expressão dessa proteína. Nesse estudo, a interferência da supressão da expressão da proteína Axl nos fenótipos analisados foi diretamente proporcional à eficiência do *knockout* dessa proteína nas células de hepatoma (SCHARF et al., 2018).

Com isso, concluímos que o sistema CRISPR/Cas9 pode causar eventos de edição genômica incompletos em linhagens de células cancerígenas, visto que o número de cópias dos genes varia com base na heterogeneidade genômica dessas células.

Em nosso modelo, B16F10, não foi possível obter uma população de células apresentando a eliminação completa dos genes *SRPK1* e *SRPK2*. Entretanto, a expressão dessas proteínas após a edição genômica pelo sistema CRISPR/Cas9 diminuiu consideravelmente, permitindo-nos avaliar o efeito da supressão da expressão de *SRPK1* e *SRPK2* nos ensaios realizados com essa linhagem de células de melanoma.

O silenciamento de *SRPK2* nas células B16F10 prejudicou o desenvolvimento do tumor subcutâneo e a formação de nódulos pulmonares em camundongos. As análises *in vitro* mostraram que a expressão reduzida de *SRPK2* nas células B16F10 diminuiu a proliferação e invasão celular. O silenciamento simultâneo de *SRPK1* e *SRPK2* nas células B16F10 diminuiu a sua capacidade de formar colônias. O papel de *SRPK2* no desenvolvimento do melanoma parece estar relacionado, pelo menos parcialmente, à sua atuação na dinâmica de polimerização do citoesqueleto de actina, pois o silenciamento de *SRPK2* diminuiu a formação de F-actina nas células B16F10.

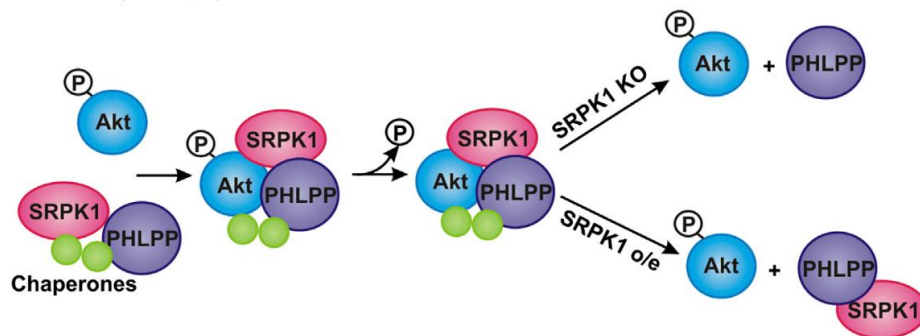
O efeito de *SRPK2* em proliferação celular foi visto pela primeira vez em células de leucemia. Nessas células, *SRPK2* favoreceu a proliferação celular por se ligar e fosforilar Acinus, uma proteína SR reguladora de *splicing*, estimulando a progressão do ciclo celular na fase G2/M (JANG et al., 2008). *SRPK2* também já foi identificada superexpressa em câncer de próstata e em células não-pequenas do pulmão promovendo proliferação (ZHUO et al., 2018; LI et al., 2019). Os nossos resultados mostraram que há relação entre *SRPK2* e a proliferação celular da linhagem de melanoma B16F10, pois o silenciamento de *SRPK2* parece diminuir a proliferação nos tempos analisados, 24 h e 48 h. O *knockdown* de *SRPK1* em células de câncer de ovário reduziu a progressão do ciclo celular e a proliferação das células (ODUNSI et al., 2012), entretanto o silenciamento de *SRPK1* em células B16F10 não afetou a proliferação celular.

A atuação de *SRPK* em invasão celular, sua relação com o estágio de desenvolvimento do tumor bem como sua capacidade de formação de metástase já foi investigada em alguns tipos de câncer. O aumento da expressão de *SRPK1* em câncer de células não-pequenas do pulmão promove o crescimento celular, migração e invasão (WU et al., 2017). O aumento da expressão de *SRPK2* foi identificado em câncer de próstata e correlacionado com o estágio avançado da doença e formação de metástase. A investigação sobre o efeito de *SRPK2* em linhagens de células de câncer de próstata mostrou que o aumento da expressão de *SRPK2* pode promover proliferação, migração, invasão e progressão do ciclo celular, além de suprimir apoptose (ZHUO et al., 2018). Também, a inibição farmacológica de *SRPK* em

células B16F10 com o inibidor SRPIN340 e compostos com estrutura análoga ao SRPIN340 mostrou efeitos significativos na diminuição da capacidade invasiva dessas células *in vitro*, além de afetar a formação de nódulos pulmonares *in vivo* (MOREIRA et al., 2018).

No presente trabalho, observamos que o silenciamento de SRPK2 diminuiu a capacidade invasiva das células B16F10, enquanto o silenciamento de SRPK1 ou o silenciamento simultâneo de SRPK1 e SRPK2 aumentaram de forma significativa a invasão celular. Estes resultados são interessantes, mas não são surpreendentes, visto que tanto o aumento quanto a diminuição da expressão de SRPK1 podem afetar a regulação da atividade de Akt e, conseqüentemente, promover câncer (WANG et al., 2014).

Wang et al. (2014) propuseram um mecanismo para explicar o efeito dual de SRPK1 em câncer (Figura 34). A atividade de Akt nas células pode ser regulada por ciclos de fosforilação e desfosforilação. Na sua forma ativa, Akt pode ser fosforilada por mTORC2 e posteriormente por PDK-1 (OH et al., 2012). A inativação de Akt através da desfosforilação é dependente da ação de fosfatases, entre elas, PHLPP. Foi mostrado que SRPK1 é requerida para o recrutamento de PHLPP juntamente com chaperonas. Por isso, quando a expressão de SRPK1 é baixa, a fosfatase PHLPP não é recrutada de forma eficiente e conseqüentemente os níveis de Akt fosforilada e ativa permanecem elevados. Por outro lado, o aumento da expressão de SRPK1 provoca o “sequestro” de PHLPP impedindo sua atuação sobre Akt, que permanece fosforilada e ativa (WANG et al., 2014). Dessa forma, SRPK1 pode servir como reguladora da atividade de Akt nas células de mamíferos.



**Figura 34. Modelo proposto para a ativação constitutiva de Akt em resposta à baixa ou alta expressão de SRPK1.** Juntamente com chaperonas, SRPK1 é requerida para o recrutamento da fosfatase específica para Akt, PHLPP. Quando a expressão de SRPK1 é baixa, a fosfatase PHLPP não é recrutada de forma eficiente para desfosforilar e inativar Akt. Quando a expressão de SRPK1 está alta, ocorre o “sequestro” de PHLPP impedindo sua atuação sobre Akt, que também permanece fosforilada e ativa (retirada de WANG et al., 2014).

O silenciamento de SRPK2 na linhagem B16F10 prejudicou o desenvolvimento do tumor subcutâneo e a formação de nódulos tumorais no pulmão dos camundongos, enquanto o silenciamento de SRPK1 ou o silenciamento simultâneo de SRPK1 e SRPK2 não afetaram o crescimento do tumor. Um trabalho recente do nosso grupo de pesquisa mostrou o efeito do tratamento com compostos de estrutura análoga ao SRPIN340 sobre camundongos que receberam as células B16F10 de forma intravenosa. Nesses animais, houve a diminuição da contagem de nódulos pulmonares (MOREIRA et al., 2018). A novidade em nosso trabalho atual é que apenas a supressão da expressão de SRPK2 foi relevante para dificultar o desenvolvimento do tumor. Assim concluímos que estratégias terapêuticas direcionadas à inibição específica de SRPK2 podem ser mais eficientes no tratamento do melanoma.

O mecanismo proposto por Wang et al., 2014 sobre o papel de SRPK1 na regulação da atividade de Akt também pode ser uma possível explicação para os resultados observados em nossos experimentos *in vivo*. Observamos que o silenciamento de SRPK1 não afetou de forma significativa o desenvolvimento do tumor nos animais. Similarmente, os tumores dos animais que receberam as células com SRPK1 e SRPK2 silenciadas simultaneamente, parecem ter comportamento semelhante aos tumores gerados nos animais que receberam as células com a expressão de SRPK1 silenciada. É provável que nesses grupos a atividade aumentada de Akt, em decorrência das falhas nos mecanismos de inativação por desfosforilação, contribuiu para que o tumor se desenvolvesse de forma semelhante aos tumores do grupo controle, V2.

O ensaio de formação de colônias avalia a sobrevivência celular, *in vitro*, com base na capacidade de uma única célula se transformar em uma colônia. O ensaio testa essencialmente a capacidade de cada célula da população sofrer divisão "ilimitada" (FRANKEN et al., 2006). Nossos resultados mostraram que o silenciamento de SRPK1 e SRPK2, simultaneamente, nas células B16F10 diminuiu significativamente a sua capacidade de formar colônias, enquanto o silenciamento de cada proteína isoladamente não afetou este fenótipo. A atuação de SRPK na capacidade das células formarem colônias já foi observada em alguns tipos de câncer. O silenciamento de SRPK1 em células de câncer de ovário comprometeu a sua capacidade de formar colônias (ODUNSI et al., 2012). Já o silenciamento de SRPK2 diminuiu a formação de colônias em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (RADHAKRISHNAN et al., 2016) e cólon (WANG et al., 2016). A inibição farmacológica de SRPK com SRPIN340 (capaz de inibir SRPK1 e em menor extensão, SRPK2) mostrou que somente em grande concentração este inibidor prejudicou significativamente a capacidade de formação de colônias das células B16F10 (MOREIRA et al., 2018). Esse dado indica que quando

consideramos a inibição de SRPK como uma estratégia para interferir na formação de colônias *in vitro*, o tratamento deve ser mais drástico, e isso talvez explique porque só observamos a diminuição da formação de colônias nas células B16F10 que foram submetidas ao silenciamento simultâneo de SRPK1 e SRPK2.

Quando tomados em conjunto, nossos resultados indicam que SRPK2 apresenta um papel importante na regulação do potencial oncogênico das células B16F10.

A atuação de SRPK em câncer está classicamente relacionada à sua função de regulação do *splicing* pela fosforilação de proteínas SR (WANG et al., 1998), no entanto não podemos descartar o papel dessas cinases em outros mecanismos celulares essenciais para o desenvolvimento do tumor, ainda não investigados. Surpreendentemente, este trabalho mostrou pela primeira vez que o *knockout* de SRPK2 em células B16F10 afetou a polimerização dos filamentos de Actina no sentido de diminuir a formação de F-Actina, além de impactar os fenótipos relacionados à habilidade de formação de metástase das células B16F10, como proliferação e invasão celular.

Os resultados obtidos estão intimamente relacionados entre si, pois a Actina apresenta papel fundamental durante todas as etapas da formação de metástase. A migração celular é facilitada pela formação das protrusões de membranas especializadas como invadopodia, lamelipodia e filopodia, dependentes da polimerização dos filamentos de Actina, para romper membranas basais, invadir tecidos, vasos sanguíneos e linfáticos (MACHESKY, 2008; NICHOLSON-DYKSTRA et al., 2005; FAIX; ROTTNER, 2006; BUCCIONE et al., 2004).

Durante a transição epitelial-mesenquimal, ou EMT, as células epiteliais perdem sua polaridade e junções com células vizinhas, adquirem características de fenótipo mesenquimal, aumentam o potencial migratório e invasividade (GREENBURG; HAY, 1982; KALLURI; WEINBERG, 2009). A organização cortical dos filamentos de actina é característica de células epiteliais, enquanto em EMT, ocorre o aumento da contratibilidade celular e formação de fibras de estresse de Actina (TESFAMARIAM; 2016). O remodelamento do citoesqueleto de actina é mediado por Rho GTPases e representa um mecanismo crítico para a migração celular durante o processo de formação de metástase (SHANKAR; NABI, 2015).

Acreditava-se que a hipóxia em grandes tumores sólidos promovia EMT e consequentemente, metástase. Entretanto, em carcinoma hepatocelular, foi observado que somente a hipóxia não foi suficiente para desencadear EMT, a não ser que o remodelamento do citoesqueleto de actina fosse provocado simultaneamente (PENG et al., 2018). Esses

resultados mostraram a importância do remodelamento do citoesqueleto de Actina no desenvolvimento de EMT.

Em células de câncer de mama, MCF-7, a despolimerização dos filamentos de actina é capaz de induzir a expressão de E-caderina de forma dependente da inativação de RhoA, sugerindo que o remodelamento do citoesqueleto de actina, *upstream* à sinalização por RhoA, possui papel importante em EMT (SHANKAR; NABI, 2015).

As informações encontradas até o momento sobre a relação entre actina e EMT são de extrema relevância porque permite-nos tomar como alvo a sinalização que ativa o remodelamento do citoesqueleto de actina para traçarmos estratégias terapêuticas a fim de suprimir EMT, servindo como prevenção ou tratamento para os tumores metastáticos.

O processo de montagem e desmontagem dos microfilamentos de Actina só é possível devido ao controle feito pelas proteínas de ligação à Actina (ABPs), que atuam em resposta às cascatas de sinalização intracelulares (IZDEBSKA et al., 2018).

Interessantemente, um ensaio de duplo híbrido em leveduras realizado pelo nosso grupo de pesquisa identificou a interação entre SRPK2 e algumas proteínas reguladoras do citoesqueleto de actina. Dentre elas, EFhd2 é uma proteína capaz de regular a dinâmica de polimerização dos filamentos de actina ao se ligar aos filamentos e agrupá-los, favorecendo a formação de estruturas que promovem a migração celular (MELLO, 2014; HUH et al., 2015).

EFhd2 promove o agrupamento de F-actina na presença de íons  $Ca^{2+}$  e dependente de sua dimerização através dos motivos *EF-hand* e do domínio *coiled-coil* (KWON et al., 2013). Interações diretas entre EFhd2 e F-actina promovem a formação de protrusões móveis como lamelipodia e filopodia (HUH et al., 2013), assim como também aumentam a migração e invasão de células de melanoma murino, B16F10 (HUH et al., 2015).

Neste trabalho nós confirmamos a interação entre SRPK2 e EFhd2. Adicionalmente, o ensaio de *GST-pulldown*, realizado com as proteínas recombinantes purificadas, mostrou que a interação entre elas parece ocorrer de forma direta.

A nossa hipótese sobre a função da interação entre SRPK2 e EFhd2 em melanoma baseia-se em evidências obtidas a partir da literatura sobre a função de cada proteína. Inicialmente notamos que ambas estão superexpressas em alguns tipos de tumores com alto potencial metastático como melanoma, câncer de cólon e pulmão (HUH et al., 2015; FAN et al., 2017; WANG et al., 2016; GOUT et al., 2012), além de estarem envolvidas em processos comuns que beneficiam o desenvolvimento de células tumorais como migração celular, EMT

e formação de metástase (HUH et al., 2015; WANG et al., 2016; YANG et al., 2018; FAN et al., 2017).

Em melanoma, a superexpressão de EFhd2 está relacionada ao aumento da invasividade celular e formação de metástase devido ao seu papel de estimular a atividade de Rho GTPases, como Rac1 (HUH et al., 2015). A inibição farmacológica de SRPK com compostos de estrutura análoga ao SRPIN340 mostrou efeitos positivos no combate ao melanoma metastático, pois houve a diminuição do número de nódulos pulmonares em camundongos inoculados de forma intravenosa com as células de melanoma (MOREIRA et al., 2018). Esses resultados mostraram a importância da inibição de SRPK em melanoma metastático, apesar da função específica de SRPK2 em melanoma ainda não ter sido descrita. O papel de SRPK1 em melanoma já foi relacionado à regulação do *splicing* de VEGF aumentando a expressão da isoforma pró-angiogênica e promovendo a angiogênese em benefício do tumor (GAMMONS et al., 2014).

Além disso, tanto SRPK2 quanto EFhd2 respondem ao sinal de EGF. SRPK2 está envolvida na regulação do *splicing* alternativo pela via Akt-SRPK-SR iniciada por EGF (ZHOU et al., 2012). EGF induz o aumento da expressão de EFhd2 assim como induz a fosforilação de EFhd2 no resíduo Ser183, regulando a sua atividade e consequentemente controlando a dinâmica de polimerização de Actina para que haja a formação de lamelipódios e migração celular (HUH et al., 2015; HUH et al., 2013).

A partir das informações encontradas na literatura e considerando que as duas proteínas em estudo atuam no sentido de promoverem o desenvolvimento do tumor, inicialmente pensamos que a interação entre SRPK2 e EFhd2 poderia ocorrer por meio da relação enzima/substrato. Para avaliar essa hipótese, realizamos o ensaio de fosforilação *in vitro*, com as proteínas recombinantes purificadas. Os dados obtidos pelos ensaios de fosforilação mostraram que SRPK2 é capaz de fosforilar EFhd2 em seu resíduo Ser74. A fosforilação de EFhd2 no resíduo Ser74 pela cinase Cdk5 já foi observada em tecido cerebral *postmortem* de doença de Alzheimer e também em tecidos cerebrais normais envelhecidos. A abundância de EFhd2 fosforilada em Ser74 em cérebros normais envelhecidos em relação aos cérebros em doença de Alzheimer sugere que essa fosforilação pode ter efeito na função fisiológica normal de EFhd2. A fosforilação desse resíduo parece estar relacionada à sinalização por íons  $Ca^{2+}$  nas células, pois como consequência, ocorre a redução da capacidade de ligação dos íons  $Ca^{2+}$  aos domínios EF-hand de EFhd2. Entretanto, ainda não foi determinada a relevância biológica

da fosforilação de EFhd2 em Ser74 relacionada à regulação da ligação de íons  $\text{Ca}^{2+}$  a EFhd2 (VAZQUEZ-ROSA et al., 2014).

A expressão de EFhd2 é abundante no sistema nervoso central, apesar dos seus papéis fisiológicos e patológicos nesse contexto ainda não serem bem entendidos. EFhd2 já foi considerada uma proteína amiloide encontrada co-agregada com a proteína Tau em cérebros de camundongos e pacientes com doença de Alzheimer, onde Cdk5 e SRPK2 também já foram mostradas superexpressas (FERRER-ACOSTA et al., 2013; HONG et al., 2012).

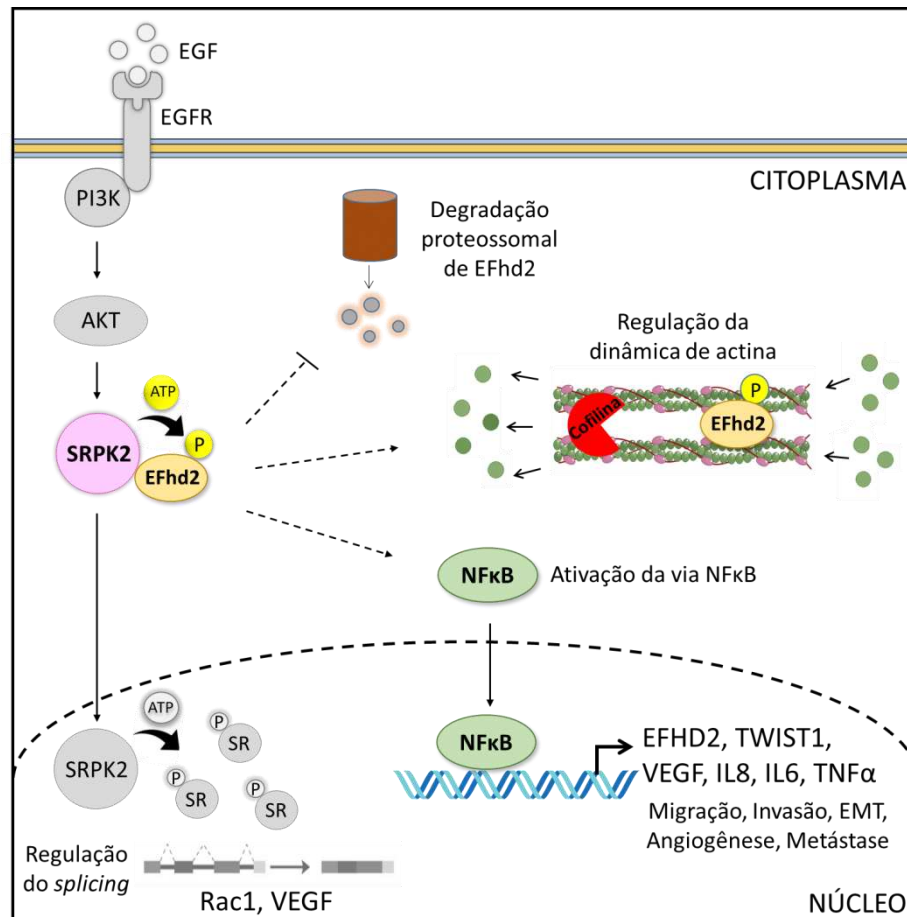
A atividade aumentada de SRPK2 já foi identificada em doenças neurodegenerativas, como Alzheimer (HONG et al., 2012). SRPK1 e SRPK2 interagem com a proteína Tau, uma das proteínas que participa da remodelação da rede de microtúbulos, particularmente nos neurônios. SRPK2 é capaz de fosforilar Tau no resíduo de Ser214 localizado em um domínio rico em prolina comprometendo sua função de promover a montagem dos filamentos de tubulina (HONG et al., 2012). A interação entre SRPK2 e Tau ocorre por meio da região espaçadora de SRPK2, sendo que o resíduo Ser214 fosforilado em Tau por SRPK2 está localizado após um resíduo de prolina, e não está próximo de repetições do tipo SRSR, consideradas sequências consenso de reconhecimento e fosforilação para SRPK. Isso indica que SRPK2 pode fosforilar sítios não convencionais, como “PSLP” em Tau (HONG et al., 2012).

O resíduo Ser74, fosforilado em EFhd2 por SRPK2, encontra-se em um contexto “SXSXSR” que remete ao encontrado em proteínas SR (LIN e FU, 2007). No entanto, os fatores de *splicing* apresentam múltiplos sítios SR, explicando a processividade do mecanismo de fosforilação de SRPK (AUBOL et al., 2003).

Análises de proteoma e fosfoproteoma do tipo *high-throughput* utilizando amostras de melanoma de camundongo já haviam identificado a fosforilação de EFhd2 no resíduo de Ser74 (ZANIVAN et al., 2008). Tomando os nossos dados juntamente com aqueles obtidos da literatura, concluimos que novas informações estão surgindo e contribuindo para o melhor entendimento da função de SRPK2 e EFhd2 em tumores, sobretudo no melanoma metastático. O desafio, agora, é investigar o efeito fisiológico da fosforilação do resíduo Ser74 em EFhd2 por SRPK2.

As nossas hipóteses sobre o efeito biológico da fosforilação de EFhd2 no resíduo Ser74 baseiam-se em informações obtidas da literatura até o presente momento. A fosforilação de uma proteína pode promover ou inibir a sua ubiquitinação, levando (ou não) à degradação proteossomal (HUNTER, 2007). A fosforilação de EFhd2 poderia ocorrer de forma a

estabilizá-la da degradação pela via ubiquitina-proteassoma (Figura 35). Esse mecanismo de inibição da degradação de EFhd2 pelo proteassoma poderia explicar pelo menos em parte a expressão aumentada de EFhd2 induzida pela presença de EGF (HUH et al., 2015).



**Figura 35. Hipóteses sobre o papel da interação entre SRPK2 e EFhd2 e as vias de sinalização que medeiam sua função no contexto do melanoma metastático.** Em resposta ao sinal de EGF ocorre a regulação do *splicing* alternativo pela via Akt-SRPK-SR (em cinza) (ZHOU et al., 2012). A regulação do *splicing* no contexto tumoral pode induzir a expressão de isoformas que beneficiem o desenvolvimento do tumor, como Rac1 e VEGF. Possivelmente, o efeito da atuação de EFhd2 em melanoma pode ser dependente da sua interação com SRPK2. Quando EGF está presente, há o aumento da expressão de EFhd2 e ocorre a despolimerização dos filamentos de Actina mediando a formação de lamelipódios (HUH et al., 2013). A fosforilação de EFhd2 por SRPK2 em Ser74, possivelmente em resposta ao sinal de EGF, poderia resultar na estabilização de EFhd2 impedindo a sua degradação pela via ubiquitina-proteassoma. Como EFhd2 está envolvida na regulação da polimerização/despolimerização do citoesqueleto de Actina e formação de metástase em melanoma (HUH et al., 2015), a fosforilação de EFhd2 por SRPK2 no resíduo Ser74 poderia atuar na regulação da atividade de EFhd2 em regular a dinâmica de Actina. Em mastócitos EFhd2 é capaz de estimular a degradação de IκBα, liberando NFκB para o núcleo e aumentando a expressão de genes regulados por NFκB (THYLUR et al., 2009). Em células T, NFκB é capaz de induzir a expressão de EFhd2 (KIM et al., 2013). A ação de SRPK2 e EFhd2, até então independentemente, levam ao aumento da expressão de TWIST1 em câncer de cólon e pulmão, respectivamente, e indução de EMT (YANG et al., 2018; FAN et al., 2017). Possivelmente, a interação entre SRPK2 e EFhd2 tem como consequência a ativação da via de NFκB levando ao aumento da expressão de TWIST1 e outros genes relacionados a migração, invasão, EMT e metástase.

Os resultados obtidos com o desenvolvimento deste trabalho mostraram que o silenciamento de SRPK2 em células B16F10 perturbou a polimerização de Actina, revelando pela primeira vez a relação entre SRPK2 e a dinâmica de polimerização do citoesqueleto de Actina. EFhd2 está envolvida na regulação da polimerização/despolimerização do citoesqueleto de Actina e formação de metástase em melanoma por meio da regulação da formação de protruções de membrana como os lamelipódios (KWON et al., 2013; HUH et al., 2015). Possivelmente, a fosforilação no resíduo Ser74 de EFhd2 feita por SRPK2 poderia afetar a atividade de EFhd2 na regulação da dinâmica de Actina (Figura 35).

A via de NFκB controla a expressão de genes envolvidos em muitos processos fisiológicos como resposta inflamatória, proliferação, diferenciação, adesão celular, apoptose e câncer (XIA et al., 2014). Em câncer, a via de NFκB também é capaz de induzir a transição epitelial-mesenquimal por meio da regulação da expressão de vários genes envolvidos em EMT (PIRES et al., 2017).

EFhd2 influencia a ativação da via de NFκB em mastócitos uma vez que induz a degradação de IκBα, liberando NFκB para o núcleo e aumentando a expressão de genes regulados por essa via (THYLUR et al., 2009). Em células T, a via de NFκB é capaz de induzir a expressão de EFhd2 (KIM et al., 2013). Esses resultados indicam que pode haver alguma relação entre a ação de EFhd2 e a ativação da via de NFκB, aparentemente por um mecanismo de *feedback* positivo.

A relação entre SRPK e a via de NFκB foi observada em câncer de mama, em que o *knockdown* de SRPK1 inibiu a migração das células tumorais, sendo que o efeito observado foi mediado pela modulação da expressão de genes envolvidos nas vias canônicas e não-canônicas de NFκB (ROOSMALEN et al., 2015). Em câncer de cólon, SRPK1 contribuiu para a regulação do *splicing* alternativo de Rac1b, uma pequena GTPase que promove progressão do ciclo celular e sobrevivência via sinalização de NFκB (MATOS et al., 2016).

A relação direta entre SRPK2 e a via de NFκB ainda não foi observada na literatura. Dois estudos independentes mostraram que a atuação de SRPK2 e EFhd2 em câncer de cólon e pulmão, respectivamente, levam ao aumento da expressão de TWIST1 e outros genes capazes de induzir a transição epitelial-mesenquimal (YANG et al., 2018; FAN et al., 2017). TWIST1 é um dos principais fatores de transcrição envolvidos em EMT, sendo que sua expressão pode ser regulada por NFκB (PIRES et al., 2017).

Considerando a relação entre EFhd2, SRPK2 e a ativação da via NFκB em células imunitárias e câncer, podemos propor um mecanismo de regulação da via de NFκB

dependente da fosforilação de EFhd2 por SRPK2 no resíduo Ser74. Como consequência, a ativação da via de NF $\kappa$ B poderia induzir a expressão de TWIST1, EFhd2 e outros genes envolvidos no processo de transição epitelial-mesenquimal, considerados chave para o aumento da migração celular, invasão e formação de metástases (Figura 35).

Esperamos que o entendimento da relevância biológica da interação entre SRPK2 e EFhd2 em melanoma metastático nos permita entender melhor os papéis dessas proteínas e as vias de sinalização que medeiam o desenvolvimento do tumor e a formação de metástase. A compreensão destes mecanismos é essencial, pois permitirá a identificação de novos alvos para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas contra o câncer.

## 8. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Com os resultados obtidos até o momento, pudemos entender alguns efeitos do silenciamento de SRPK em células B16F10 *in vitro* e *in vivo*. Descobrimos que o silenciamento de SRPK2 diminuiu a proliferação, a capacidade de invasão das células B16F10 e o desenvolvimento do melanoma *in vivo*. O mecanismo que parece explicar os efeitos decorrentes da supressão da expressão de SRPK2 em B16F10 é a atuação de SRPK2 na regulação da polimerização do citoesqueleto de Actina para formar F-actina, pois o remodelamento do citoesqueleto já foi essencialmente relacionado aos eventos de iniciação, desenvolvimento do tumor e formação de metástase. Nós também comprovamos a interação entre SRPK2 e EFhd2 e descobrimos que SRPK2 é capaz de fosforilar EFhd2.

Como perspectiva, deverá ser investigada a relação entre SRPK2 e EFhd2 *in vivo* buscando aprofundar o entendimento sobre a função dessa interação no desenvolvimento do câncer.

Com o desenvolvimento deste trabalho esperamos contribuir para a descoberta de novos papéis para SRPK2 e EFhd2 que nos possibilite entender melhor a função da interação entre essas proteínas e a sua importância no contexto do melanoma metastático.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANSIEAU, S.; BASTID, J.; DOREAU, A.; MOREL, A. P.; BOUCHET, B. P.; THOMAS, C.; FAUVET, F.; PUISIEUX, I.; DOGLIONI, C.; PICCININ, S.; MAESTRO, R.; VOELTZEL, T.; SELMI, A.; VALSESIA-WITTMANN, S.; CARON DE FROMENTEL, C.; PUISIEUX, A. Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence. **Cancer Cell**, v. 14, p. 79-89, 2008.
- AUBOL, B. E.; CHAKRABARTI, S.; NGO, J.; SHAFFER, J.; NOLEN, B.; FU, X. D.; GHOSH, G.; ADAMS, J. A. Processive phosphorylation of alternative splicing factor/splicing factor 2. **PNAS**, v. 100, n. 22, p. 12601–12606, 2003.
- AVRAMIDOU, A.; KROCZEK, C.; LANG, C.; SCHUH, W.; JACK, H. M.; MIELENZ, D. The novel adaptor protein EFhd2 enhances BCR signals and contributes to BCR-induced apoptosis. **Cell death and differentiation**, v. 14, n. 11, p. 1936-1947, 2007.
- BARTIS, D.; MISE, N.; MAHIDA, R. Y.; EICKELBERG, O.; THICKETT, D. R. Epithelial–mesenchymal transition in lung development and disease: does it exist and is it important? **Thorax**, v. 69, p. 760–765, 2014.
- BORGER, E.; HERRMANN, A.; MANN, D. A.; SPIRES-JONES, T.; DPHIL; GUNN-MOORE, F. The Calcium-Binding Protein EFhd2 Modulates Synapse Formation In Vitro and Is Linked to Human Dementia. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 73, n. 12, p. 1166–1182, 2014.
- BOUREUX, A.; VIGNAL, E.; FAURE, S.; FORT, P. Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 203–216, 2007.
- BOYLE, W. J.; SIMONET, W.S.; LACEY, D. L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature**, v. 423, p. 337–342, 2003.
- BRACHS, S.; TURQUETI-NEVES, A.; STEIN, M.; REIMER, D.; BRACHVOGEL, B.; BOSL, M.; WINKLER, T.; VOEHRINGER, D.; JACK, H. M.; MIELENZ, D. EFhd2/EFhd2 limits germinal center responses and humoral type 2 immunity. **European journal of immunology**, v. 44, n. 11, p. 3206-3219, 2014.
- BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248 – 254, 1976.
- BRAEUER, R. R.; WATSON, I. R.; WU, C.; MOBLEY, A. K.; KAMIYA, T.; SHOSHAN, E.; BAR, M. Why is melanoma so metastatic? **Pigment Cell & Melanoma**, v. 27, n. 1, p. 19–36, 2013.
- BRINKMAN, B. M. N. Splice variants as cancer biomarkers. **Clinical Biochemistry**, v. 37, n. 7, p. 584–594, 2004.
- BROGNARD, J.; SIERECKI, E.; GAO, T.; NEWTON, A.C. PHLPP and a second isoform, PHLPP2, differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms. **Molecular Cell**, v. 25, p. 917–931, 2007.

BUCCIONE, R.; ORTH, J. D.; MCNIVEN, M. A. Foot and mouth: podosomes, invadopodia and circular dorsal ruffles. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, p. 647–657, 2004.

BULLOCK, N.; OLTEAN, S. The many faces of SRPK1. **Journal of Pathology**, v. 241, p. 437–440, 2017.

BULLOCK, N.; POTTS, J.; SIMPKIN, A. J.; KOUPPARIS, A.; HARPER, S. J.; OXLEY, J.; OLTEAN, S. Serine-arginine protein kinase 1 (SRPK1), a determinant of angiogenesis, is upregulated in prostate cancer and correlates with disease stage and invasion. **Journal of Clinical Pathology**, v. 69, p.171–175, 2016.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C. T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.

CARRACEDO, A.; PANDOLFI, P. P. The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and crosstalks. **Oncogene**, v. 27, p. 5527–5541, 2008.

CHANG, Y.; WU, Q.; TIAN, T.; LI, L.; GUO, X.; FENG, Z.; ZHOU, J.; ZHANG, L.; ZHOU, S.; FENG, G.; HAN, F.; YANG, J.; HUANG, F. The influence of SRPK1 on glioma apoptosis, metastasis, and angiogenesis through the PI3K/Akt signaling pathway under normoxia. **Tumour Biology**, v. 36, p. 6083–6093, 2015.

CHECINSKA, A.; GIACCONE, G.; RODRIGUEZ, J. A.; KRUYT, F. A.; JIMENEZ, C. R. Comparative proteomics analysis of caspase-9-protein complexes in untreated and cytochrome c/dATP stimulated lysates of NSCLC cells. **Journal of Proteomics**, v. 72, n. 4, p. 575–585, 2009.

CHEN, G. L.; LUO, Y.; ERIKSSON, D.; MENG, X.; QIAN, C.; BÄUERLE, T.; CHEN, X. X.; SCHETT, G.; BOZEC, A. High fat diet increases melanoma cell growth in the bone marrow by inducing osteopontin and interleukin 6. **Oncotarget**, v. 7, n. 18, p. 26653–26669, 2016.

CHEN, H.; BERNSTEIN, B. W.; BAMBURG, J. R. Regulating actin-filament dynamics in vivo. **Trends in Biochemical Sciences**, v.25, p.19–23., 2000.

CHIN, S. M.; JANSEN, S.; GOODE, B. L. TIRF microscopy analysis of human Cof1, Cof2, and ADF effects on actin filament severing and turnover. **Journal of molecular biology**, v. 428, n. 8, p. 1604–1616, 2016.

COLALUCA, I. N.; TOSONI, D.; NUCIFORO, P.; SENIC-MATUGLIA, F.; GALIMBERTI, V.; VIALE, G.; PECE, S.; DI-FIORE, P. P. NUMB controls p53 tumour suppressor activity. **Nature**, v. 451, p. 76–80, 2008.

CONDEELIS, J.; SEGALL, J. E. Intravital imaging of cell movement in tumours. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, p. 921–930, 2003.

DIBBLE, C. C.; MANNING, B. D. Signal integration by mTORC1 coordinates nutrient input with biosynthetic output. **Nature Cell Biology**, v. 15, n.6, p. 555–564, 2013.

DING, J. H.; ZHONG, X. Y.; HAGOPIAN, J. C.; CRUZ, M. M.; GHOSH, G.; FERAMISCO, J.; ADAMS, J. A.; FU, X. D. Regulated cellular partitioning of SR protein-specific kinases in mammalian cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 17, p. 876–885, 2006.

DOWSETT, M.; NIELSEN, T. O.; A'HERN, R.; BARTLETT, J.; COOMBES, R. C.; CUZICK, J.; ELLIS, M.; HENRY, N. L.; HUGH, J. C.; LIVELY, T.; MCSHANE, L.; PAIK, S.; PENAULT-LLORCA, F.; PRUDKIN, L.; REGAN, M.; SALTER, J.; SOTIRIOU, C.; SMITH, I. E.; VIALE, G.; ZUJEWSKI, J. A.; HAYES, D. F. Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Recommendations from the international Ki67 in breast cancer working Group. **Journal of the National Cancer Institute**. V. 103, p. 1656– 1664, 2011.

ERARD, F.; WILD, M. T.; GARCIA-SANZ, J. A.; LE, GROS, G. Switch of CD8 T cells to noncytolytic CD8-CD4- cells that make TH2 cytokines and help B cells. **Science**, v. 260, n. 5115, p. 1802–1805, 1993.

ESTES, J. E.; SELDEN, L. A.; GERSHMAN, L. C. Mechanism of Action of Phalloidin on the Polymerization of Muscle Actin. **Biochemistry**, v. 20, p. 708-712, 1981.

FAIX, J., ROTTNER, K. The making of filopodia. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 18, n. 1, p.18–25, 2006.

FAN, C. C.; CHENG, W. C.; HUANG, Y. C.; SHER, Y. P.; LIOU, N. J.; CHIEN, Y. C.; LIN, P. S.; LIN, P. S.; CHEN, C. H.; CHANG, W. C. EFHD2 promotes epithelial-to-mesenchymal transition and correlates with postsurgical recurrence of stage I lung adenocarcinoma. **Scientific Reports - Nature**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2017.

FERRER-ACOSTA, Y.; RODRÍGUEZ-CRUZ, E. N.; ORANGE, F.; JESÚS-CORTÉS, H.; MADERA, B.; VAQUER-ALICEA, J.; BALLESTER, J.; GUINEL, M. J. F.; BLOOM, G. S.; VEGA, I. E. EFhd2 is a novel amyloid protein associated with pathological tau in Alzheimer's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 125, n. 6, p. 921–931, 2013.

FIEGEN, D.; HAEUSLER, L. C.; BLUMENSTEIN, L.; HERBRAND, U.; DVORSKY, R.; VETTER, I. R.; AHMADIAN, M. R. Alternative splicing of Rac1 generates Rac1b, a self-activating GTPase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 4743-4749, 2004.

FIFE, C. M.; MCCARROLL, J. A.; KAVALLARIS, M. Movers and shakers: cell cytoskeleton in cancer metastasis. *British Journal of Pharmacology*, v. 171, p. 5507–5523, 2014. DOI:10.1111/bph.12704.

FIGUEIREDO, C. R.; MATSUO, A. L.; AZEVEDO, R. A.; MASSAOKA, M. H.; GIROLA, N.; POLONELLI, L.; TRAVASSOS, R. L. A novel microtubule destabilizing complementarity-determining region C36L1 peptide displays antitumor activity against melanoma in vitro and in vivo. **Scientific Reports - Nature**, v. 5, 14310, 2015.

FRANKEN, N. A. P.; RODERMOND, H. M.; STAP, J.; HAVEMAN, J.; BREE, C. V. Clonogenic assay of cells in *vitro*. **Nature Protocols**, v. 1, p. 2315–2319, 2006.

FU, X. D. The superfamily of arginine-serine-rich splicing factors. **RNA**, v. 1, p. 663–680, 1995.

GAMMONS, M. V.; FEDOROV, O.; IVISON, D.; DU, C.; CLARK, T.; HOPKINS, C.; HAGIWARA, M.; DICK, A. D.; COX, R.; HARPER, S. J.; HANCOX, J. C.; KNAPP, S.; BATES, D. O. Topical antiangiogenic SRPK1 inhibitors reduce choroidal neovascularization in rodent models of exudative AMD. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 54, n. 9, p. 6052-6062, 2013.

GAMMONS, M. V.; LUCAS, R.; DEAN, R.; COUPLAND, S. E.; OLTEAN, S.; BATES, D. O. Targeting SRPK1 to control VEGF-mediated tumour angiogenesis in metastatic melanoma. **British Journal of Cancer**, v. 111, p. 477–485, 2014.

GAO, T.; FURNARI, F.; NEWTON, A. C. PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. **Molecular Cell**, v. 18, p. 13–24, 2005.

GERDES, J.; LEMKE, H.; BAISCH, H.; WACKER, H. H.; SCHWAB, U.; STEIN, H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. **Journal of Immunology**, V. 133, p. 1710–1715, 1984.

GERDES, J.; STEIN, H.; PILERI, S.; RIVANO, M. T.; GOBBI, M.; RALFKIAER, E.; NIELSEN, K. M.; PALLESEN, G.; BARTELS, H.; PALESTRO, G.; DELSOL, G. Prognostic relevance of tumour-cell growth fraction in malignant nonHodgkin's lymphomas. **The Lancet**, V. 2, p. 448–449, 1987.

GHIGNA, C.; GIORDANO, S.; SHEN, H.; BENVENUTO, F.; CASTIGLIONI, F.; COMOGLIO, P. M.; GREEN, M. R.; RIVA, S.; BIAMONTI, G. Cell motility is controlled by SF2/ASF through alternative splicing of the ron protooncogene. **Molecular Cell**, v. 20, p. 881–890, 2005.

GHOSH, G.; ADAMS, J. A. Phosphorylation Mechanism and Structure of Serine-Arginine Protein Kinases. **The FEBS Journal**, v. 278, n. 4, p. 587-97, 2011.

GIANNAKOUROS, T.; NIKOLAKAKI, E.; MYLONIS, I.; GEORGATSOU, E. Serine-arginine protein kinases: a small protein kinase family with a large cellular presence. **The FEBS Journal**, v. 278, p. 570–586, 2011.

GONÇALVES, V.; HENRIQUES, A. F.; PEREIRA, J. F.; NEVES COSTA, A.; MOYER, M. P.; MOITA, L. F.; GAMA-CARVALHO, M.; MATOS, P.; JORDAN, P. Phosphorylation of SRSF1 by SRPK1 regulates alternative splicing of tumor related Rac1b in colorectal cells. **RNA**, v. 20, n. 4, p. 474-482, 2014.

GONG, L.; SONG, J.; LIN, X.; WEI, F.; ZHANG, C.; WANG, Z.; ZHU, J.; WU, S.; CHEN, Y.; LIANG, J.; FU, X.; LU, J.; ZHOU, C.; SONG, L. Serine-arginine protein kinase 1 promotes a cancer stem cell-like phenotype through activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signalling in NSCLC. **Journal of Pathology**, v. 240, p. 184–196, 2016.

GOUT, S.; BRAMBILLA, E.; BOUDRIA, A. DRISSI, R.; LANTUEJOUL, S.; GAZZERI, S.; EYMIN, B. Abnormal Expression of the Pre-mRNA Splicing Regulators SRSF1, SRSF2, SRPK1 and SRPK2 in Non Small Cell Lung Carcinoma. **Plos One**, v. 7, n. 46539, 2012.

GREENBURG, G.; HAY, E. D. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. **The Journal of Cell Biology**, v. 95, n. 1, p. 333–339, 1982.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, p. 883-899, 2010.

HAABETH, O. A. W.; BOGEN, B.; CORTHAY, A. A model for cancer-suppressive inflammation. **OncoImmunology**, v. 1, n. 7, p. 1146-1155, 2012.

HAGEN, S.; BRACHSA, S.; KROCZEKA, C.; FÜRNRORHB, B. G.; LANGA, C.; MIELENZ, D. The B cell receptor-induced calcium flux involves a calcium mediated positive feedback loop. **Cell Calcium**, v. 51, p. 411–417, 2012.

HANAHAHAN D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, p. 646-674, 2011.

HARRIS, N.; GAUSE, W. C. To B or not to B: B cells and the Th2-type immune response to helminths. **Trends in Immunology**, v. 32, n. 2, p. 80–88, 2011.

HATCHER, J. M.; WU, G.; ZENG, C.; ZHU, J.; MENG, F.; PATEL, S.; WANG, W.; FICARRO, S. B.; LEGGETT, A. L.; POWELL, C. E.; MARTO, J. A.; ZHANG, K.; KI, N. J. C.; FU, X. D.; ZHANG, T.; GRAY, N. S. SRPKIN-1: A Covalent SRPK1/2 Inhibitor that Potently Converts VEGF from Pro-angiogenic to Anti-angiogenic Isoform. **Cell Chemical Biological**, v. 25, n. 4, p. 460-470.e6, 2018.

HAYES, G. M.; CARRIGAN, P. E.; MILLER, L. J. Serine-arginine protein kinase 1 overexpression is associated with tumorigenic imbalance in mitogen-activated protein kinase pathways in breast, colonic, and pancreatic carcinomas. **Cancer Research**, v.67, p. 2072-2080, 2007.

HERRERA, M. D. C. V.; WEYDEN1, L. V. D.; NSENGIMANA, J.; SPEAK, A. O.; SJOBERG, M. K.; BISHOP, D. T.; JONSSON, G.; BISHOP, G. N.; ADAMS, D. J. Comparative genomics reveals that loss of lunatic fringe (LFNG) promotes melanoma metastasis. **Molecular Oncology**, v. 12, p. 239–255, 2018.

HOEJBERGA, L.; BASTHOLTA, L.; SCHMIDTC, H. Interleukin-6 and melanoma. **Melanoma Research**, v. 22, n. 5, p. 327-332, 2012.

HONG, Y.; CHAN, C. B.; KWON, I. S.; LI, X.; SONG, M.; LEE, H. P.; LIU, X.; SOMPOL, P.; JIN, P.; LEE, H. G.; YU, S. P.; YE, K. SRPK2 phosphorylates tau and mediates the cognitive defects in Alzheimer's disease. **Journal of Neuroscience**, v. 32 , p. 17262–17272, 2012.

HSU, P. D.; SCOTT, D. A.; WEINSTEIN, J. A.; RAN, F. A.; KONERMANN, S.; AGARWALA, V.; LI, Y.; FINE, E. J.; WU, X.; SHALEM, O.; CRADICK, T. J.; MARRAFFINI, L. A.; BAO, G.; ZHANG, F. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. **Nature Biotechnology**, n. 31, v. 9, p. 827–832, 2013.

HUH, Y. H.; KIM, S. H.; CHUNG, K.; OH, S.; KWON, M.; CHOI, H. RHEE, S.; RYU, J.; PARK, Z. Y.; JUN, C.; SONG, W. K. Swiprosin-1 modulates actin dynamics by regulating the F-Actina accessibility to cofilin. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, p. 4841-4854, 2013.

HUH, Y. H.; OH, S.; YEO, Y. R.; CHAE, I. H.; KIM, S. H.; LEE, J. S.; SONG, W. K. EFhd2 stimulates cancer invasion and metastasis by increasing the Rho family of GTPase signaling. **Oncotarget**, v. 6, p. 13060-13071, 2015.

HUNTER, T. The Age of Crosstalk: Phosphorylation, Ubiquitination, and Beyond. **Molecular Cell**, v. 28, p. 730-738, 2007.

HURWITZ, H.; FEHRENBACHER, L.; NOVOTNY, W.; CARTWRIGHT, T.; HAINSWORTH, J.; HEIM, W.; BERLIN, J.; BARON, A.; GRIFFING, S.; HOLMGREN, E.; FERRARA, N.; FYFE, G.; ROGERS, B.; ROSS, R.; KABBINAVAR, F. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 350, p. 2335–2342, 2004.

IZDEBSKA, M.; ZIELINSKA, W.; GRZANKA, D.; GAGAT, M. The Role of Actin Dynamics and Actin-Binding Proteins Expression in Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Its Association with Cancer Progression and Evaluation of Possible Therapeutic Targets. **BioMed Research International**, p. 1-12, 2018.

JANG, S. W.; YANG, S. J.; EHLÉN, A.; DONG, S.; KHOURY, H.; CHEN, J.; PERSSON, J. L.; YE, K. Serine/arginine protein-specific kinase 2 promotes leukemia cell proliferation by phosphorylating acinus and regulating cyclin A1. **Cancer Research**, v. 68, n. 12, p. 4559-4570, 2008.

JANG, S.W.; LIU, X.; FU, H.; REES, H.; YEPES, M.; LEVEY, A.; YE, K. Interaction of Akt-phosphorylated SRPK2 with 14-3-3 mediates cell cycle and cell death in neurons. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, p. 24512–24525, 2009.

JING, H.; LEE, S. NF- $\kappa$ B in Cellular Senescence and Cancer Treatment. **Molecules and Cells**, v. 37, n. 3, p. 189-195, 2014.

JURICA M. S.; MOORE, M. J. Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. **Molecular Cell**, v. 12, p. 5–14, 2003.

KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 6, p. 1420-1428, 2009.

KALSOTRA, A.; COOPER, T. A. Functional consequences of developmentally regulated alternative splicing. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, p. 715–729, 2011.

KIM, R. H.; FLANDERS, K. C.; REFFEY, S. B.; ANDERSON, L. A.; DUCKETT, C. S.; PERKINS, N. D.; ROBERTS, A. B. SNIP1 inhibits NF-kappa B signaling by competing for its binding to the C/H1 domain of CBP/p300 transcriptional coactivators. **Journal of Biology Chemistry**, v. 276, n. 49, p. 46297–46304, 2001.

KIM, Y. D.; KWON, M. S.; NA, B. R., KIM, H. R.; LEE, H. S.; JUN, C. D. EFhd2 Expression Is Up-Regulated through Protein Kinase C-theta and NFkappaB Pathway in T Cells. **Immune network**, v. 13, n. 2, p. 55-62, 2013.

KLEVETA, G.; BORZECKA, K.; ZDIORUK, M.; CZERKIES, M.; KUBERCZYK, H.; SYBIRNA, N.; SOBOTA, A.; KWIATKOWSKA, K. LPS induces phosphorylation of actin-regulatory proteins leading to actin reassembly and macrophage motility. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 113, n. 1, p. 80–92, 2012.

KLÖPPEL, G.; PERREN, A.; HEITZ, P. U. The gastroenteropancreatic neuroendocrine cell system and its tumors: the WHO classification. **Annals of the New York Academy of Sciences**, n. 1014, p. 13-27, 2004.

KROCZEK, C.; LANG, C.; BRACHS, S.; GROHMANN, M.; DÜTTING, S.; SCHWEIZER, A.; NITSCHKE, L.; FELLER, S. M.; JÄCK, H. M.; MIELENZ, D. EFhd2/EFhd2 controls B cell receptor signaling through the assembly of the B cell receptor, Syk, and phospholipase C gamma2 in membrane rafts. **The Journal of Immunology**. v. 184, p. 3665–3676, 2010.

KUO, Y. C.; HUANG, K. Y.; YANG, C. H.; YANG, Y. S.; LEE, W. Y.; CHIANG, C.W. Regulation of phosphorylation of Thr-308 of Akt, cell proliferation, and survival by the B55 alpha regulatory subunit targeting of the protein phosphatase 2A holoenzyme to Akt. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 1882–1892, 2008.

KUROYANAGI, H.; KIMURA, T.; WADA, K.; HISAMOTO, N.; MATSUMOTO, K.; HAGIWARA, M. SPK-1, a *C. elegans* SR protein kinase homologue, is essential for embryogenesis and required for germline development. **Mechanisms of Development**, v. 99, p. 51–64, 2000.

KWOK, W. K.; LING, M. T.; LEE, T. W.; LAU, T. C.; ZHOU, C.; ZHANG, X.; CHUA, C. W.; CHAN, K. W.; CHAN, F. L.; GLACKIN, C.; WONG, Y. C.; WANG, X. Up-regulation of TWIST in prostate cancer and its implication as a therapeutic target. **Cancer Research**, v. 65, p. 5153-5162, 2005.

KWON, M-S.; PARK, K. R.; KIM, Y-D.; NA, B-R.; KIM, H-R.; CHOI, H-J.; PIRAGYTE, I.; JEON, H.; CHUNG, K. H.; SONG, W. K.; EOM, S. H.; JUN, CD. EFhd2 Is a Novel Actin Bundling Protein That Regulates Cell Spreading and Migration. **PloS One**, v. 8, e71626, 2013.

LAWRENCE, T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 1, n. 6, p. 1-10, 2009.

LEE, G.; ZHENG, Y.; CHO, S.; JANG, C.; ENGLAND, C.; DEMPSEY, J. M.; YU, Y.; LIU, X.; HE, L.; CAVALIERE, P. M.; CHAVEZ, A.; ZHANG, E.; ISIK, M.; COUVILLON, A.; DEPHOURE, N. E.; BLACKWELL, T. K.; YU, J. J.; RABINOWITZ, J. D.; CANTLEY, L. C.; BLENIS, J. Post-transcriptional Regulation of De Novo Lipogenesis by mTORC1-S6K1-SRPK2 Signaling. **Cell**, v. 171, n. 7, p. 1545-1558, 2017.

LEVAYER, R.; LECUIT, T. Breaking down EMT. **Nature Cell Biology**, v. 10, p. 757-759, 2008.

- LI, A.; DUBEY, S.; VARNEY, M. L.; DAVE, B. J.; SINGH, R. K. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. **Journal of Immunology**, v. 170, p. 3369–3376, 2003.
- LI, X.; YANG, S.; ZHANG, M.; XIE, S.; XIE, Z. Downregulation of SRPK2 promotes cell cycle arrest through E2F1 in non-small cell lung cancer. **European Journal of Histochemistry**, v. 63, n. 3067, p. 229–239, 2019.
- LIN, S.; FU, X.D. SR proteins and related factors in alternative splicing. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 623, p. 107–122, 2007.
- LIU, H.; HU, X.; ZHU, Y.; JIANG, G.; CHEN, S. Up-regulation of SRPK1 in non-small cell lung cancer promotes the growth and migration of cancer cells. **Tumor Biology**, v. 37, p. 7287–7293, 2016.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.
- LOH, B. J.; CULLEN, C. F.; VOGT, N.; OHKURA, H. The conserved kinase SRPK regulates karyosome formation and spindle microtubule assembly in *Drosophila* oocytes. **Journal of Cell Science**, v. 125, p. 4457–4462, 2012.
- LONG, X.; YE, Y.; ZHANG, L.; LIU, P.; YU, W.; WEI, F.; REN, X.; YU, J. IL-8, a novel messenger to cross-link inflammation and tumor EMT via autocrine and paracrine pathways. **International Journal of Oncology**, v. 48, p. 5–12, 2016.
- LU, Y.; XU, W.; JI, J.; FENG, D.; SOURBIER, C.; YANG, Y.; QU, J.; ZENG, Z.; WANG, C.; CHANG, X.; CHEN, Y.; MISHRA, A.; XU, M.; LEE, M. J.; LEE, S.; TREPEL, J.; LINEHAN, W. M.; WANG, X.; YANG, Y.; NECKERS, L. Alternative splicing of the cell fate determinant Numb in hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v. 62, p. 1122–1131, 2015.
- MACHESKY, L. M. Lamellipodia and filopodia in metastasis and invasion. **FEBS Letters**, v. 582, n. 14, p. 2102–2111, 2008.
- MADONNA, G.; ULLMAN, C. D.; GENTILCORE, G.; PALMIERI, G.; ASCIERTO, P. A. NF- $\kappa$ B as potential target in the treatment of melanoma. *Journal of Translational Medicine* 2012, v. 10, n. 53, p. 1–8, 2012.
- MAEHAMA, T.; DIXON, J. E. PTEN: a tumour suppressor that functions as a phospholipid phosphatase. **Trends in Cell Biology**, v. 9, p. 125–128, 1999.
- MAESTRO, R.; DEI TOS, A. P.; HAMAMORI, Y.; KRASNOKUTSKY, S.; SARTORELLI, V.; KEDES, L.; DOGLIONI, C.; BEACH, D. H.; HANNON, G. J. Twist is a potential oncogene that inhibits apoptosis. **Genes & Development**, v. 13, p. 2207–2217, 1999.
- MANNING, B. D.; CANTLEY, L. C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. **Cell**, v. 129, p. 1261–1274, 2007.

MAO, Z.; BOZZELLA, M.; SELUANOV, A.; GORBUNOVA, V. DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells. **Cell Cycle**, v. 7, p. 2902–2906, 2008.

MATOS, P.; GONÇALVES, V.; JORDAN, P. Targeting the serrated pathway of colorectal cancer with mutation in BRAF. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1866, n. 1, p. 51-63, 2016.

MATOS, P.; JORDAN, P. Expression of Rac1b stimulates NF- $\kappa$ B-mediated cell survival and G1/S progression. **Experimental Cell Research**, v. 305, p. 292 – 299, 2005.

MATOS, P.; SKAUG, J.; MARQUES, B.; BECK, S.; VERÍSSIMO, F.; GESPACH, C.; BOAVIDA, M. G.; SCHERER, S. W.; JORDAN, P. Small GTPase Rac1: structure, localization, and expression of the human gene. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 277, p. 741–751, 2000.

MAVROU, A.; BRAKSPEAR, K.; HAMDOLLAH-ZADEH, M.; DAMODARAN, G.; BABAEI-JADIDI, R.; OXLEY, J.; GILLATT, D. A.; LADOMERY, M. R.; HARPER, S. J.; BATES, D. O.; OLTEAN, S. Serine-arginine protein kinase 1 (SRPK1) inhibition as a potential novel targeted therapeutic strategy in prostate cancer. **Oncogene**, v. 34, n. 33, p. 4311-4319, 2015.

MELLO, A. O. **Identificação de novos parceiros de interação para a cinase reguladora de splicing SRPK2**. 2014. 91p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2014.

MENENDEZ, J. A.; LUPU, R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 10, p. 763–777, 2007.

MIELLENZ, D.; VETTERMANN, C.; HAMPEL, M.; LANG, C.; AVRAMIDOU, A.; KARAS, M.; JÄCK, H. M. Lipid rafts associate with intracellular B cell receptors and exhibit a B cell stage-specific protein composition. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 6, p. 3508–3517, 2005.

MONTFORT, A.; COLACIOS, C.; LEVADE, T.; ABADIE, N. A.; MEYER, N.; SÉGUI, B. The TNF Paradox in Cancer Progression and Immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1-5, 2019.

MOREIRA, G. A. **Efeito citotóxico e antimetastático da inibição das cinases SRPKS em células de melanoma cutâneo**. 2016. 78p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Aplicada) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2016.

MOROOKA, S.; HOSHINA, M.; KII, I.; OKABE, T.; KOJIMA, H.; INOUE, N.; OKUNO, Y.; DENAWA, M.; YOSHIDA, S.; FUKUHARA, J.; NINOMIYA, K.; IKURA, T.; FURUYA, T.; NAGANO, T.; NODA, K.; ISHIDA, S.; HOSOYA, T.; ITO, N.; YOSHIMURA, N.; HAGIWARA, M. Identification of a Dual Inhibitor of SRPK1 and CK2 That Attenuates Pathological Angiogenesis of Macular Degeneration in Mice. **Molecular Pharmacology**, v. 88, n. 2, p. 316-325, 2015.

MOUNEIMNE, G.; DESMARAIS, V.; SIDANI, M.; SCEMES, E.; WANG, W.; SONG, X.; EDDY, R.; CONDEELIS, J. Spatial and temporal control of cofilin activity is required for directional sensing during chemotaxis. **Current Biology**, v. 16, n. 22, p. 2193–2205, 2006.

NAKAGAWA, O.; ARNOLD, M.; NAKAGAWA, M.; HAMADA, H.; SHELTON, J. M.; KUSANO, H.; HARRIS, T. M.; CHILDS, G.; CAMPBELL, K. P.; RICHARDSON, J. A.; NISHINO, I. N.; OLSON, E. N. Centronuclear myopathy in mice lacking a novel muscle-specific protein kinase transcriptionally regulated by MEF2. **Genes & Development**, v. 19, p. 2066–2077, 2005.

NGO, J. C.; GULLINGSRUD, J.; GIANG, K.; YEH, M. J.; FU, X. D.; ADAMS, J. A.; MCCAMMON, J. A.; GHOSH, G. SR protein kinase 1 is resilient to inactivation. **Structure**, v. 15, p. 123–133, 2007.

NICHOLSON-DYKSTRA, H. N.; HIGGS, E. S. HARRIS, E. S. Actin dynamics: growth from dendritic branches. **Current Biology**, v. 15, p. R346–357, 2005.

NIKOLAKAKI, E.; KOHEN, R.; HARTMANN, A. M.; STAMM, S.; GEORGATSOU, E. GIANNAKOUROS, T. Cloning and characterization of an alternatively spliced form of SR protein kinase 1 that interacts specifically with scaffold attachment factor-B. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 43, p. 40175–40182, 2001.

NISHITA, M.; TOMIZAWA, C.; YAMAMOTO, M.; HORIA, Y.; OHASHI, K.; MIZUNO, K. Spatial and temporal regulation of cofilin activity by LIM kinase and Slingshot is critical for directional cell migration. **The Journal of Cell Biology**, v. 171, n. 2, p. 349–359, 2005.

ODUNSI, K.; MHAWECH-FAUCEGLIA, ANDREWS, C.; BECK, A.; AMUWO, O.; LELE, S.; BLACK, J. D.; HUANG, R. Y. Elevated Expression of the Serine-Arginine Protein Kinase 1 Gene in Ovarian Cancer and Its Role in Cisplatin Cytotoxicity In Vitro. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. 1–10, 2012.

OH, W. J.; WU, C. C.; KIM, S. J.; FACCHINETTI, V.; JULIEN, L. A.; FINLAN, M.; ROUX, P. P.; SU, B.; JACINTO, E. mTORC2 can associate with ribosomes to promote cotranslational phosphorylation and stability of nascent Akt polypeptide. **The EMBO Journal**, v. 29, n. 23, p. 3939–3951, 2010.

OLIVARES, M. J.; GONZALEZ-JAMETT, A. M.; GUERRA, M. J.; BAEZ-MATUS, X.; HARO-ACUNA, V.; MARTINEZ-QUILES, N.; CARDENAS, A. M. Src kinases regulate de novo actin polymerization during exocytosis in neuroendocrine chromaffin cells. **PLoS One**, v. 9, n. 6, e99001, 2014.

PAPAKONSTANTI, E. A.; STOURNARAS, C. Cell responses regulated by early reorganization of actin cytoskeleton. **FEBS Letters**, v. 18; 582(14), p. 2120–7, 2008.

PARK, K. R.; AN, J. Y.; KANG, J. Y.; LEE, J. G.; LEE, Y.; MUN, S. A.; JUN, C. D.; SONG, W. K.; EOM, S. H. Structural mechanism underlying regulation of human EFhd2/EFhd2 actin-bundling activity by Ser183 phosphorylation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 483, n. 1, p. 442–448, 2016b.

PARK, K. R.; KWON, M. S.; AN, J. Y.; LEE, J. G.; YOUN, H. S.; LEE, Y. KANG, J. Y.; KIM, T. G.; LIM, J. J.; PARK, J. S.; LEE, S. H.; SONG, W. K.; CHEONG, H. K.; JUN, C. D.

EOM, S. H. Structural implications of Ca<sup>2+</sup>-dependent actin bundling function of human EFhd2/EFhd2. **Scientific Reports**, v. 6, n. 39095, p. 1-15, 2016a.

PENG, J. M.; BERA, R.; CHIOU, C. Y.; YU, M. C.; CHEN, T. C.; CHEN, C. W.; WANG, T. R.; CHIANG, W. L.; CHAI, S. P.; WEI, Y.; WANG, H.; HUNG, M. C.; HSIEH, S. Y. Actin Cytoskeleton Remodeling Drives Epithelial-Mesenchymal Transition for Hepatoma Invasion and Metastasis in Mice. **Hepatology**, v. 67, n. 6, p. 2223-2246, 2018.

PIRES, B. R. B.; MENCALHA, A. L.; FERREIRA, G. N.; SOUZA, W. F. D.; MORGADO-DÍAZ, J. A.; MAIA, A. M.; CORRÊA, S.; ABDELHAY, E. S. F. W. NF-kappaB Is Involved in the Regulation of EMT Genes in Breast Cancer Cells. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, p. 1-20, 2017.

POLLARD, T. D.; BORISY, G. G. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. **Cell**, v. 112, n. 4, p. 453-465, 2003.

PRASAD, J.; MANLEY, J. L. Regulation and substrate specificity of the SR protein kinase Clk/Sty. **Molecular and Cellular Biology**, v. 23, p. 4139-4149, 2003.

PRATTICHIZZO, F.; GIULIANI, A.; RECCHIONI, R.; BONAFÈ, M.; MARCHESELLI, F.; CAROLIS, S. D.; CAMPANATI, A.; GIULIODORI, K.; RIPPO, M. R.; BRUGÈ, F.; TIANO, L.; MICUCCI, C.; CERIELLO, A.; OFFIDANI, A.; PROCOPIO, A. D.; OLIVIERI, F. Anti-TNF- $\alpha$  treatment modulates SASP and SASP-related microRNAs in endothelial cells and in circulating angiogenic cells. **Oncotarget**, v. 7, n. 11, p. 11945-11958, 2016.

PUCK, T. T.; MARCUS, P. I. Action of x-rays on mammalian cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 103, n. 5, p. 653-666, 1956.

PUCK, T. T.; MARCUS, P. I.; CIECIURA, S. J. Clonal growth of mammalian cells in vitro; growth characteristics of colonies from single HeLa cells with and without a feeder layer. **Journal of Experimental Medicine**, v. 103, p. 273-283, 1956.

PUROHIT, P.; PEREZ-BRANGULI, F.; PROTS, I.; BORGER, E.; GUNN-MOORE, F.; WELZEL, O.; LOY, K.; WENZEL, E. M.; GRÖMER, T. W.; BRACHS, S.; HOLZER, M.; BUSLEI, R.; FRITSCH, K.; REGENSBURGER, M.; BÖHM, K. J.; WINNER, B.; MIELENZ, D. The Ca<sup>2+</sup> sensor protein EFhd2/EFhd2 is present in neurites and involved in kinesin-mediated transport in neurons. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, e103976, 2014.

RADHAKRISHNAN, A.; NANJAPPA, V.; RAJA, R.; SATHE, G.; CHAVAN, S.; NIRUJOGI, S. R.; PATIL, A. H.; SOLANKI, H.; RENUSE, S.; SAHASRABUDDHE, N. A.; MATHUR, P. P.; PRASAD, T. S. K.; KUMAR, P.; CALIFANO, J. A.; SIDRANSKY, D.; PANDEY, A.; GOWDA, H.; CHATTERJEE, A. Dysregulation of splicing proteins in head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Biology & Therapy**, v. 17, n. 2, p. 219-229, 2016.

RAN, F. A.; HSU, P. D.; WRIGHT, J.; AGARWALA, V.; SCOTT, D. A.; ZHANG, F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. **Nature Protocols**, v. 8, n. 11, 2281-308, 2013.

REMEDIOS, C. G.; CHHABRA, D.; KEKIC, M.; DEDOVA, I. V.; TSUBAKIHARA, M.; BERRY, D. A.; NOSWORTHY, N. J. Actin Binding Proteins: Regulation of Cytoskeletal Microfilaments. **Physiological Reviews**, v. 83, n. 2, p. 433–473, 2003.

RIJKEN, P. J.; HAGE, W. J.; HENEGOUWEN, V. B. E.; VERKLEIJ, A. J.; BOONSTRA, J. Epidermal growth factor induces rapid reorganization of the actin microfilament system in human A431 cells. **Journal of Cell Science**, v. 100, p. 491–499, 1991.

RONCA, R.; DI SALLE, E.; GIACOMINI, A.; LEALI, D.; ALESSI, P.; COLTRINI, D.; RAVELLI, C.; MATARAZZO, S.; RIBATTI, D.; VERMI, W.; PRESTA, M. Long pentraxin-3 inhibits epithelial-mesenchymal transition in melanoma cells. **Molecular Cancer Therapies**, v. 12, n. 12, p. 2760–2771, 2013.

ROOSMALEN, W. V.; DÉVÉDEC, S. E. L.; GOLANI, O.; SMID, M.; PULYAKHINA, I.; TIMMERMANS, A. M.; LOOK, M. P.; ZI, D.; PONT, C.; GRAAUW, M.; NAFFAR-ABU-AMARA, S.; KIRSANOVA, C.; RUSTICI, G.; 'T HOEN, P. A. C.; MARTENS, J. W. M.; FOEKENS, J. A.; GEIGER, B.; WATER B. V. Tumor cell migration screen identifies SRPK1 as breast cancer metastasis determinant. **Journal of Clinical Investigation**, v. 125, p. 1648–1664, 2015.

SAHA, A.; LEE, Y. C.; ZHANG, Z.; CHANDRA, G.; SU, S. B.; MUKHERJEE, A. B. Lack of an endogenous anti-inflammatory protein in mice enhances colonization of B16F10 melanoma cells in the lungs. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 14, p. 10822–10831, 2010.

SALMINEN, A.; KAUPPINEN, A.; KAARNIRANTA, K. Emerging role of NF- $\kappa$ B signaling in the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP). **Cellular Signalling**, v. 24, p. 835–845, 2012.

SANDER, J. D.; JOUNG, J. K. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. **Nature Biotechnology**, v. 32, p. 347–355, 2014.

SANJANA, N. E.; SHALEM, O.; ZHANG, F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. **Nature Methods**, n. 11, v. 8, 2014.

SAXTON, R. A.; SABATINI, D. M. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. **Cell**, v. 168, n. 6, p. 960–976, 2017.

SCHARF, I.; BIERBAUMER, L.; HUBER, H.; WITTMANN, P.; HAIDER, C.; PIRKER, C.; BERGER, W.; MIKULITS, W. Dynamics of CRISPR/Cas9-mediated genomic editing of the AXL locus in hepatocellular carcinoma cells. **Oncology Letters**, v. 15, p. 2441–2450, 2018.

SCHNELZER, A.; PRECHTEL, D.; KNAUS, U.; DEHNE, K.; GERHARD, M.; GRAEFF, H.; HARBECK, N.; SCHMITT, M.; LENGYEL, E. Rac1 in human breast cancer: overexpression, mutation analysis, and characterization of a new isoform, Rac1b. **Oncogene**, v. 19, n. 26, p. 3013–3020, 2000.

SEGALL, J. E.; TYERRECH, S.; BOSELLI, L.; MASSELING, S.; HELFT, J.; CHAN, A.; JONES, J.; CONDEELIS, J. EGF stimulates lamellipod extension in metastatic mammary adenocarcinoma cells by an actin-dependent mechanism. **Clinical & Experimental Metastasis**, v. 14, n. 1, p. 61–72, 1994.

SHANKAR, J.; NABI, I. R. Actin Cytoskeleton Regulation of Epithelial Mesenchymal Transition in Metastatic Cancer Cells. **Plos One**, v.10, n. 3, p. 1-12, 2015.

SIBONY-BENYAMINI, H.; GIL-HENN, H. Invadopodia: the leading force. **European Journal of Cell Biology**, v. 91, n. 11-12, p. 896–901, 2012.

SIEBEL, C. W.; FENG, L.; GUTHRIE, C.; FU, X. Conservation in budding yeast of a kinase specific for SR splicing factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, p. 5440–5445, 1999.

SILVA, M. R. **Novas interações para SRPK2 e avaliação funcional do efeito da interação com EFhd2**. 2017. 140p. Tese (Doutorado em Bioquímica Aplicada) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2017.

SIQUEIRA, R. P.; BARBOSA, É. de A.; POLÊTO, M. D.; RIGHETTO, G. L.; SERAPHIM, T. V.; SALGADO, R. L.; FERREIRA, J. G.; BARROS, M. V.; DE OLIVEIRA, L. L.; LARANJEIRA, A. B.; ALMEIDA, M. R.; JÚNIOR, A. S.; FIETTO, J. L. R.; KOBARG, J.; OLIVEIRA, E. B.; TEIXEIRA, R. R.; BORGES, J. C.; YUNES, J. A.; BRESSAN, G. C. Potential Antileukemia Effect and Structural Analyses of SRPK Inhibition by N-(2-(Piperidin-1-yl)-5-(Trifluoromethyl)Phenyl)Isonicotinamide (SRPIN340). **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1-21, 2015.

SRIDHARA, S. C.; CARVALHO, S.; GROSSO, A. R.; GALLEGO-PAEZ, L. M.; FONSECA, M. C.; ALMEIDA, S. F. Transcription Dynamics Prevent RNA-Mediated Genomic Instability through SRPK2-Dependent DDX23 Phosphorylation. **Cell Reports**, v. 18, p. 334–343, 2017.

STEVENSON, R. P.; VELTMAN, D.; MACHESKY, L. M. Actin-bundling proteins in cancer progression at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 125, p. 1073–1079, 2012.

SUN, J.; HUANG, P.; LIANG, J.; LI, J.; SHEN, M.; SHE, X.; FENG, Y.; LUO, X.; LIU, T.; SUN, X. Cooperation of Rel family members in regulating A $\beta$ 1-40-mediated pro-inflammatory cytokine secretion by retinal pigment epithelial cells. **Cell Death and Disease**, v. 8, 2017.

SUN, W. H.; KREISLE, R. A.; PHILLIPS, A. W.; ERSHLER, W. B. In vivo and in vitro characteristics of interleukin 6-transfected B16 melanoma cells. **Cancer Research**, v. 52, n. 19, p. 5412-5515, 1992.

TADDEI, M. L.; GIANNONI, E.; FIASCHI, T.; CHIARUGI, P. Anoikis: an emerging hallmark in health and diseases. **The Journal of Pathology**, v. 226, n. 2, p. 380-393, 2012.

TAN, E. J.; THUAULT, S.; CAJA, L.; CARLETTI, T.; HELDIN, C. H.; MOUSTAKAS, A. Regulation of Transcription Factor Twist Expression by the DNA Architectural Protein High Mobility Group A2 during Epithelial-to-Mesenchymal Transition. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 10, p. 7134 –7145, 2012.

TANG, Z.; YANAGIDA, M.; LIN, R. Fission Yeast Mitotic Regulator Dsk1 Is an SR Protein-specific Kinase. **The journal of biological chemistry**, v. 273, n. 10, p. 5963–5969, 1998.

TESFAMARIAM, B. Involvement of platelets in tumor cell metastasis. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 157, p. 112-119, 2016.

THYLUR, R. P.; GOWDA, R.; MISHRA, S.; JUN, C. D. EFhd2: Its Expression and Diverse Biological Functions. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, p. 150–156, 2018.

THYLUR, R. P.; KIM, Y. D.; KWON, M. S.; JUN, C. D.; KIM, S. W. EFhd2 Regulates Cytokine Expression of Human Mast Cell Line HMC-1 through Actin Remodeling. **Immune Network**, v. 9, n. 6, p. 274-284, 2009.

TOKURAKU, K.; OKAMOTO, S.; KATSUKI, M.; NAKAGAWA, H.; KOTANI, S. The actindepolymerizing factor destrin has an actin stabilizing domain. **Biochemistry and Cell Biology**. v. 79, p. 773-778, 2001.

TU, T. J.; MA, M. W.; MONNI, S.; ROSE, A. E.; YEE, H.; DARVISHIAN, F.; POLSKY, D.; BERMAN, R. S.; SHAPIRO, R. L.; PAVLICK, A. C.; MAZUMDAR, M.; OSMAN, I. A High Proliferative Index of Recurrent Melanoma Is Associated with Worse Survival. **Oncology**, v. 80, p.181–187, 2011.

TU, Y.; ZHANG, L.; TONG, L.; WANG, Y.; ZHANG, S.; WANG, R.; LIA, L.; WANG, Z. EFhd2/EFhd2 regulates LPS-induced macrophage recruitment via enhancing actin polymerization and cell migration. **International Immunopharmacology**, v. 55, p. 263–271, 2018.

VAZQUEZ-ROSA, E.; RODRIGUEZ-CRUZ, E. N.; SERRANO, S.; RODRIGUEZ-LAUREANO, L.; VEGA, I. E. Cdk5 phosphorylation of EFhd2 at S74 affects its calcium binding activity. **Protein Science**, v. 23, p. 1197-1207, 2014.

VEGA, I. E. EFhd2, a Protein Linked to Alzheimer's Disease and Other Neurological Disorders. **Frontiers in Neuroscience**. v. 10, n. 150, p.1-7, 2016.

VEGA, I. E.; TRAVERSO, E. E.; FERRER-ACOSTA, Y.; MATOS, E.; COLON, M.; GONZALEZ, J.; DICKSON, D.; HUTTON, M.; LEWIS, J.; YEN, S. H. A novel calcium-binding protein is associated with tau proteins in tauopathy. **Journal of neurochemistry**, v. 106, p. 96-106, 2008.

VIVARELLI, S.; LENZKEN, S. C.; RUEPP, M. D.; RANZINI, F.; MAFFIOLETTI, A.; ALVAREZ, R.; MUHLEMANN, O.; BARABINO, S. M. L. Paraquat Modulates Alternative Pre-mRNA Splicing by Modifying the Intracellular Distribution of SRPK2. **Plos One**, v. 8, n. 4, p. 1-13, 2013.

VUADENS, F.; RUFER, N.; KRESS, A.; CORTHÉSY, P.; SCHNEIDER, P.; TISSOT, J. D. Identification of swiprosin 1 in human lymphocytes. **Proteomics**, v. 4, n. 8, p. 2216–2220, 2004.

WANG, D.; FENG, J.; WEN, R.; MARINE, J. C.; SANGSTER, M. Y.; PARGANAS, E.; HOFFMEYER, A.; JACKSON, C. W.; CLEVELAND, J. L.; MURRAY, P. J.; IHLE, J. N. Phospholipase Cgamma2 is essential in the functions of B cell and several Fc receptors. **Immunity**, v. 13, p. 25–35, 2000.

WANG, G.; SHENG, W.; SHI, X.; LI, X.; ZHOU, J.; DONG, M. Serine/arginine protein-specific kinase 2 promotes the development and progression of pancreatic cancer by downregulating Numb and p53. **The FEBS Journal**, v. 286, p. 1668–1682, 2019.

WANG, G.; SHENG, W.; TANG, J.; LI, X.; ZHOU, J.; DONG, M. Cooperation of SRPK2, Numb and p53 in the malignant biology and chemosensitivity of colorectal cancer. **Bioscience Reports**, v. 40, n. 1, 2020.

WANG, H. Y.; LIN, W.; DYCK, J. A.; YEAKLEY, J. M.; SONGYANG, Z.; CANTLEY, L. C.; FU, X. D. SRPK2: A Differentially Expressed SR Protein-specific Kinase Involved in Mediating the Interaction and Localization of Pre-mRNA Splicing Factors in Mammalian Cells. **The Journal of Cell Biology**, v. 140, p. 737-750, 1998.

WANG, H.; WANG, C.; TIAN, W.; YAO, Y. The crucial role of SRPK1 in IGF-1-induced EMT of human gastric cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 42, p. 72157-72166, 2017.

WANG, J.; WU, H. F.; SHEN, W.; XUD, D. I.; RUANE, T. Y.; TAO, G.Q.; LU, P. H. SRPK2 promotes the growth and migration of the colon cancer cells. **Gene**, v. 586, p. 41–47, 2016.

WANG, P.; ZHOU, Z.; HU, A.; ALBUQUERQUE, C. P.; ZHOU, Y.; HONG, L.; SIERECKI, E.; AJIRO, M.; KRHLAK, M.; HARRIS, C.; GUAN, K. L.; ZHENG, Z. M.; NEWTON, A. C.; SUN, P.; ZHOU, H.; FU, X. D. Both Decreased and Increased SRPK1 Levels Promote Cancer by Interfering with PHLPP-Mediated Dephosphorylation of Akt. **Molecular Cell**, v. 54, n. 3, p. 378 – 391. 2014.

WANG, R. M.; WANG, Z. B.; WANG, Y.; LIU, W. Y.; LIA, Y.; TONG, L. C.; ZHANG, S.; SU, D. F.; CAO, Y. B.; LI, L.; ZHANG, L. C. EFhd2 Promotes Mitochondria-Dependent Apoptosis of Glomerular Podocytes via P38 MAPK Pathway in Early-Stage Diabetic Nephropathy. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v.45, p. 899-916, 2018.

WEISS, M. B.; ABEL, E. V.; MAYBERRY, M. M.; BASILE, K. J.; BERGER, A. C.; APLIN, A. E. TWIST1 is an ERK1/2 effector that promotes invasion and regulates MMP-1 expression in human melanoma cells. **Cancer Research**, v. 72, p. 6382-6392, 2012.

WOOLARD, J.; WANG, W. Y.; BEVAN, H. S.; QIU, Y.; MORBIDELLI, L.; PRITCHARD-JONES, R. O.; CUI, T. G.; SUGIONO, M.; WAINE, E.; PERRIN, R.; FOSTER, R.; DIGBY-BELL, J.; SHIELDS, J. D.; WHITTLES, C. E.; MUSHENS, R. E.; GILLATT, D. A.; ZICHE, M.; HARPER, S. J.; BATES, D. O. VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. **Cancer Research**, v. 64, p. 7822–7835, 2004.

WU, F.; LI, J.; DU, X.; ZHANG, W.; LEI, P.; ZHANG, Q. Chimeric antibody targeting SRPK-1 in the treatment of non-small cell lung cancer by inhibiting growth, migration and invasion. **Molecular Medicine Reports**, v. 16, n. 2, 2121-2127, 2017.

XIA, Y.; SHEN, S.; VERMA, I. M. NF- $\kappa$ B, an active player in human cancers. **Cancer Immunology Research**, v. 2, n. 9, p. 823–830, 2014.

XIAO, S. H.; MANLEY, J. L. Phosphorylation of the ASF/SF2 RS domain affects both protein–protein and protein–RNA interactions and is necessary for splicing. **Genes & Development**, v. 11, p. 334–344, 1997.

YAMAGUCHI, H.; CONDEELIS, J. Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1773, p. 642–652, 2007.

YANG, J.; MANI, S. A.; DONAHER, J. L.; RAMASWAMY, S.; ITZYKSON, R. A.; COME, C.; SAVAGNER, P.; GITELMAN, I.; RICHARDSON, A.; WEINBERG, R. A. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*, v. 117 p. 927-939, 2004.

YANG, Z.; ZHANG, X.; GANG, H.; LI, X.; LI, Z.; WANG, T.; HAN, J.; LUO, T.; WEN, F.; WU, X. Up-regulation of gastric cancer cell invasion by Twist is accompanied by N-cadherin and fibronectin expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 358, p. 925-930, 2007.

YANG, Z.; ZHU, X.; LIU, H.; WANG, B. Serine/arginine (SR)-rich-specific-protein kinase 2 promotes the epithelial-mesenchymal transition by upregulating Twist-related protein 1 expression in colon cancer cells. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 11, n. 1, p. 262-268, 2018.

YEOH, S.; POPE, B.; MANNHERZ, H. G.; WEEDS, A. Determining the differences in actin binding by human ADF and cofilin. **Journal of Molecular Biology**, v. 315, n. 4, p. 911-925, 2002.

ZANIVAN, S.; GNAD, F.; WICKSTROM, S. A.; GEIGER, T.; MACEK, B.; COX, J.; FASSLER, MANN, M. Solid Tumor Proteome and Phosphoproteome Analysis by High Resolution Mass Spectrometry. **Journal of Proteome Research**, v. 7, p. 5314–5326, 2008.

ZHONG, X. Y.; DING, J. H.; ADAMS, J. A.; GHOSH, G.; FU, X. D. Regulation of SR protein phosphorylation and alternative splicing by modulating kinetic interactions of SRPK1 with molecular chaperones. **Genes & Development**, v. 23, p. 482–495, 2009.

ZHOU, B.; LI, Y.; DENG, Q.; WANG, H.; WANG, Y.; CAI, B.; HAN, Z. G. SRPK1 contributes to malignancy of hepatocellular carcinoma through a possible mechanism involving PI3K/Akt. **Molecular and Cellular Biology**, v. 379, p. 191–199, 2013.

ZHOU, K.; RAO, J.; ZHOU, Z.; YAO, X.; WU, F.; YANG, J.; YANG, L.; ZHANG, X.; CUI, Y.; BIAN, X.; SHI, Y.; PING, Y. RAC1-GTP promotes epithelial-mesenchymal transition and invasion of colorectal cancer by activation of STAT3. **Laboratory Investigation**, v. 98, p. 989–998, 2018.

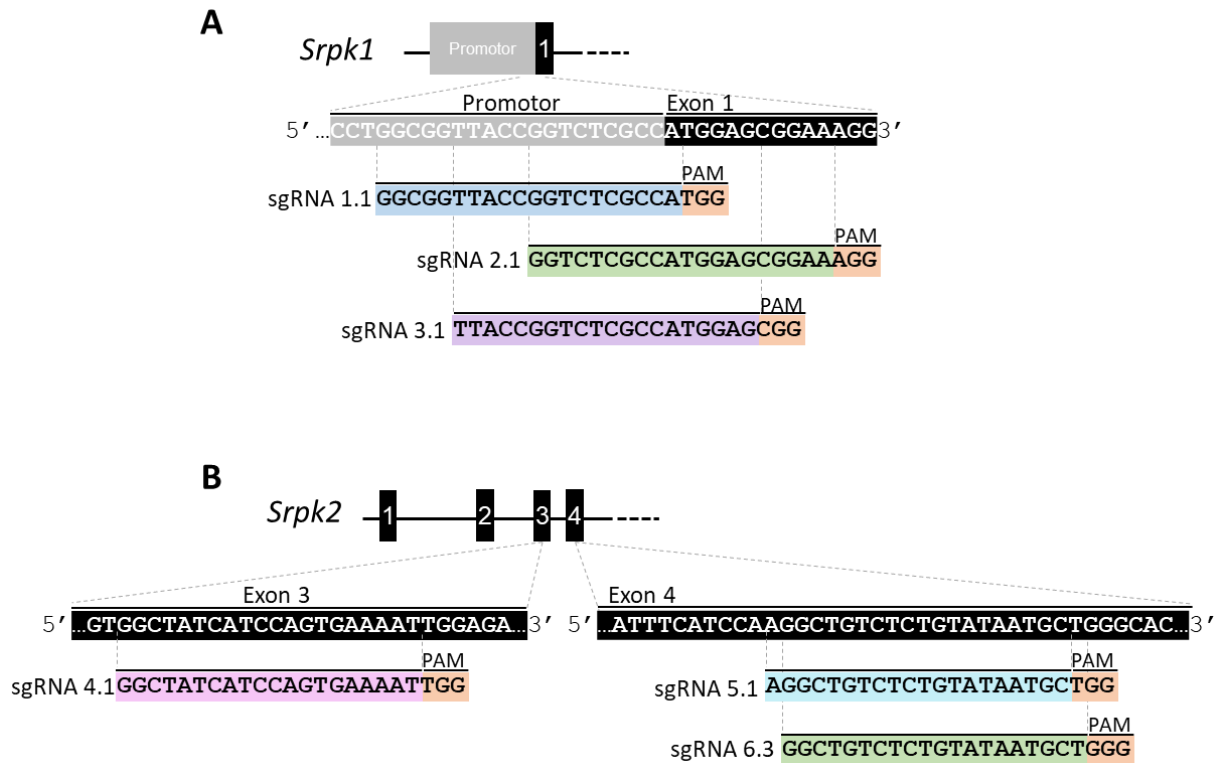
ZHOU, Z.; QIU, J.; LIU, W.; ZHOU, Y.; PLOCINIK, R. M.; LI, H.; HU, Q.; GHOSH, G.; ADAMS, J. A.; ROSENFELD, M. G.; FU, X. D. The Akt-SRPK-SR Axis Constitutes a Major Pathway in Transducing EGF Signaling to Regulate Alternative Splicing in the Nucleus. **Molecular Cell**, v. 47, n. 3, p. 422-433, 2012.

ZHOU, C.; LICCIULLI, S.; AVILA, J. L.; CHO, M.; TROUTMAN, S.; JIANG, P.; KOSENKOV, A. V.; SHOWE, L. C.; LIU, Q.; VACHANI, A.; ALBELDA, S. M.; KISSIL,

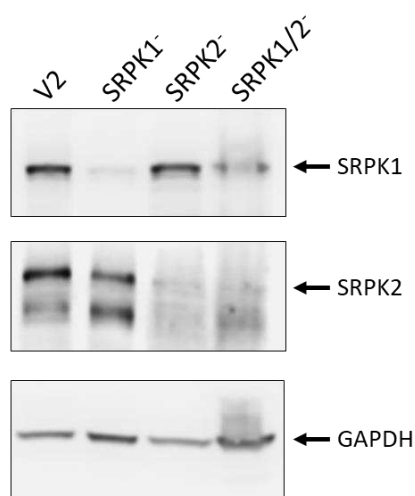
J. L. The Rac1 splice form Rac1b promotes K-ras-induced lung tumorigenesis. **Oncogene**, v. 32, n. 7, p. 903–909, 2013.

ZHUO, Y. J.; LIU, Z. Z.; WAN, S.; CAI, Z. D.; XIE, J. J.; CAI, Z. D.; SONG, S. D.; WAN, Y. P.; HUA, W.; ZHONG, W. D.; WU, C. L. Enhanced expression of SRPK2 contributes to aggressive progression and metastasis in prostate cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 102, p. 531–538, 2018.

## APÊNDICE A – Alinhamento do sgRNA

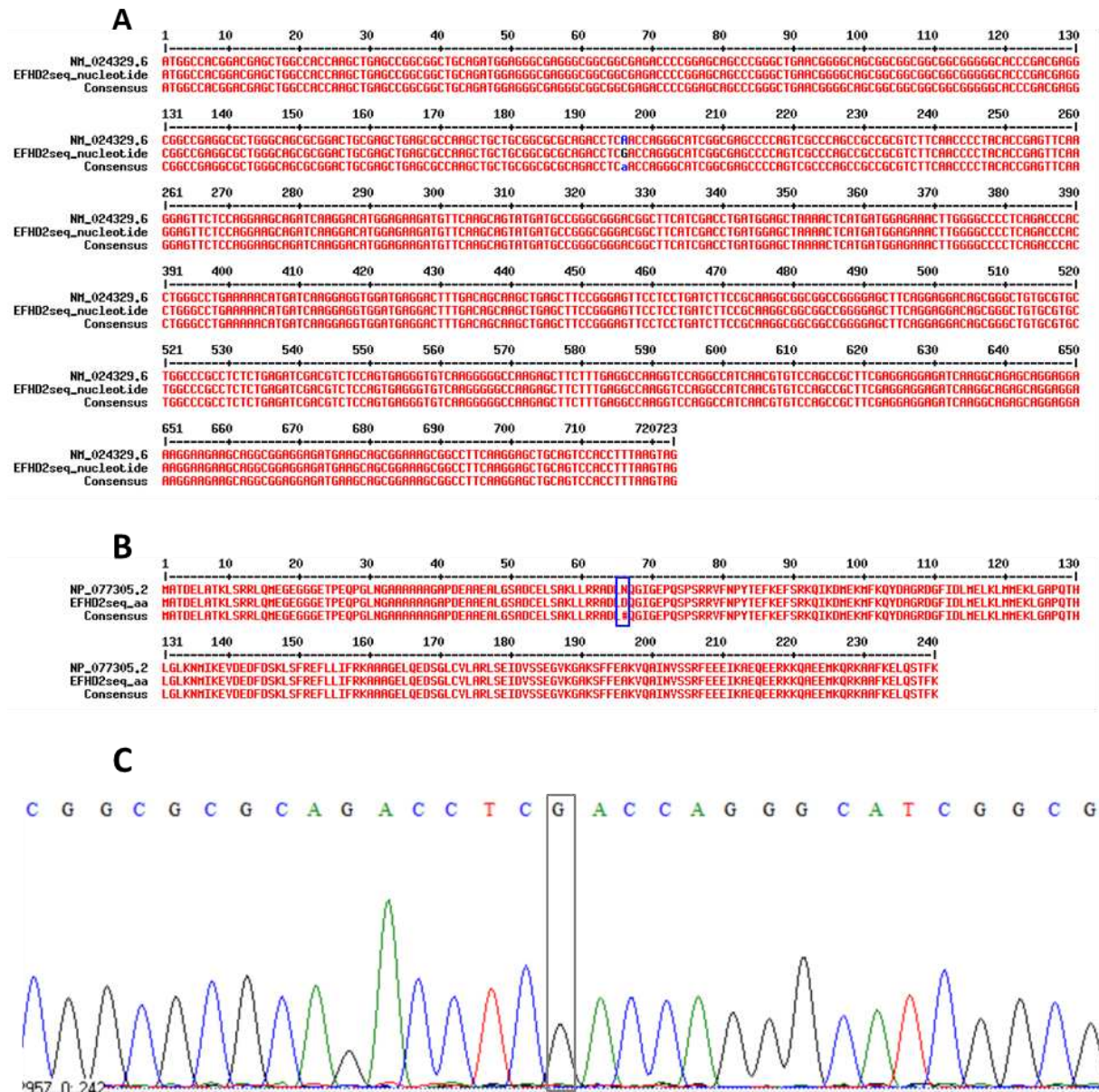


**Figura 36.** Esquema representativo mostrando o alinhamento de cada sgRNA clonado no vetor lentiCRISPRV2 com a sequência dos genes *SRPK1* ou *SRPK2*. (A) Para *SRPK1*, as sequências dos sgRNAs 1.1, 2.1 e 3.1 reconhecem a região promotora do gene e parte do exon 1. (B) Para *SRPK2*, o sgRNA 4.1 reconhece uma região do exon 3, enquanto os sgRNAs 5.1 e 6.3 se anelam em regiões do exon 4.

**APÊNDICE B - Estabilidade do silenciamento de SRPK em B16F10**

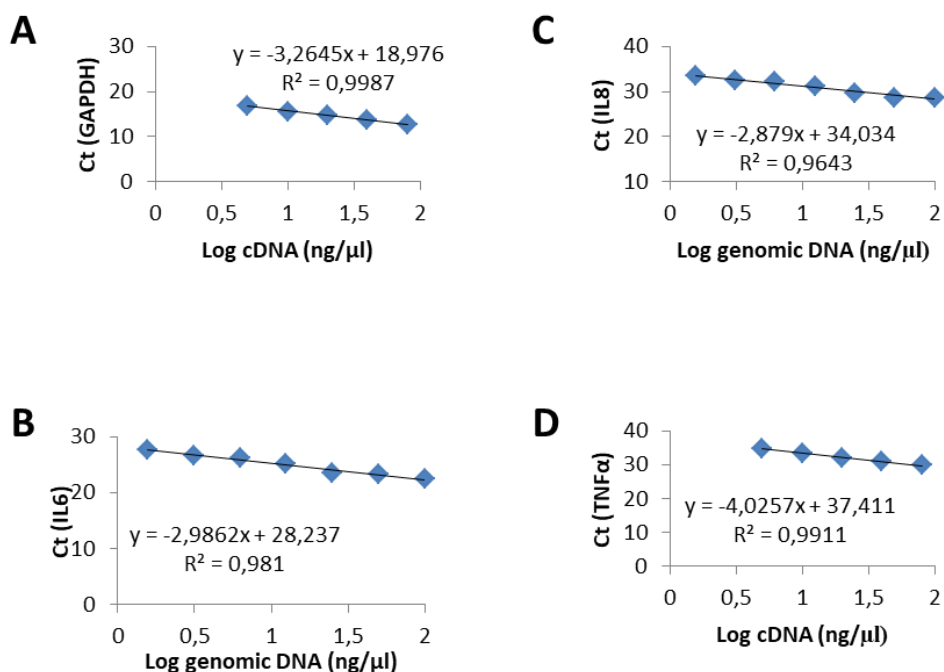
**Figura 37. Análise do silenciamento de SRPK1 (A) ou SRPK2 (B) na linhagem B16F10 ao longo do tempo.** A análise por *western blotting* revelou a expressão de SRPK1 e SRPK2 comparada com as células controle (V2), transduzidas com o vetor lentiCRISPRV2 vazio. GAPDH foi utilizado como controle endógeno. Essa análise, realizada cerca de 7 meses após a obtenção das células B16F10 com SRPK silenciada, mostra que o silenciamento de SRPK1 ou SRPK2 se manteve estável ao longo desse tempo.

## APÊNDICE C – Mutação na sequência de EFhd2 clonada em pEGFPC1



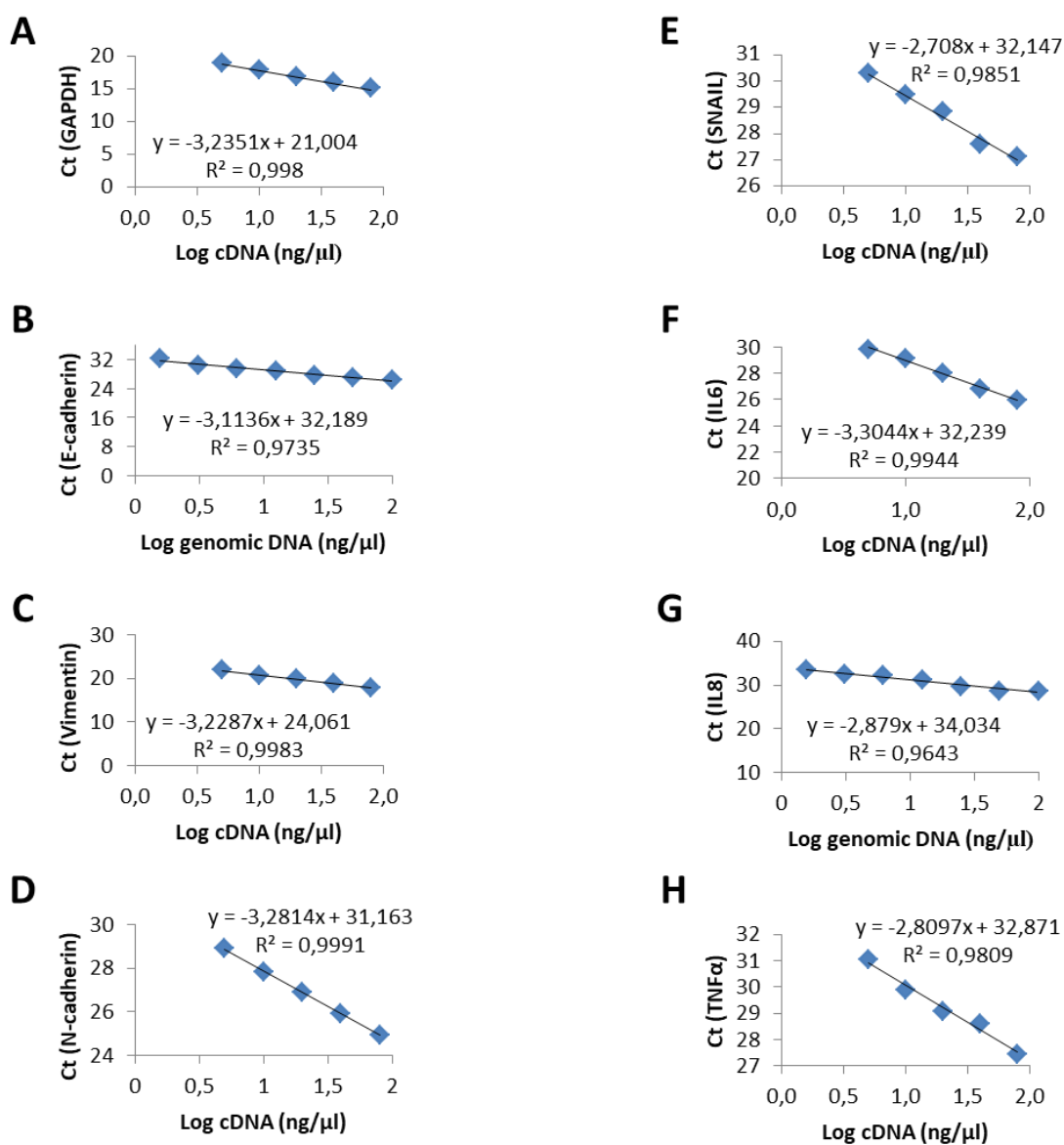
**Figura 38. Análise da mutação encontrada na sequência de EFhd2 clonada no vetor pEGFPC1 por Silva (2017).** (A) O alinhamento das sequências de nucleotídeos de EFhd2 clonada em pEGFPC1 (SILVA, 2017) e a sequência referência do NCBI (NM\_024329.6) identificou uma mutação na posição 196 da sequência clonada no vetor. (B) A mutação tem como consequência a alteração de um resíduo de aminoácido na posição 66 da proteína EFhd2 (Asn para Asp) quando alinhada com a sequência referência do NCBI (NP\_077305.2). (C) Parte do cromatograma obtido após o sequenciamento de EFhd2 clonada no vetor pEGFPC1. A base nucleotídica G, marcada por um retângulo, corresponde à mutação encontrada na sequência de EFhd2.

**APÊNDICE D – Curvas-padrão para RT-qPCR usando amostras de células B16F10 com SRPK silenciada**



**Figura 39.** Curvas padrão utilizadas para análise da expressão dos genes (A) GAPDH, (B) IL6, (C) IL8 e (D) TNFα em amostras de células B16F10 com SRPK silenciada. O cDNA ou o DNA genômico da amostra utilizada como controle, B16F10 V2, foram submetidos a uma série de diluições conhecidas e utilizadas no ensaio de qPCR. Os valores de Ct obtidos foram relacionados com o log da concentração do cDNA (ou DNA genômico) para a construção das curvas-padrão.

## APÊNDICE E - Curvas-padrão para RT-qPCR usando amostras de tumores



**Figura 40.** Curvas padrão utilizadas para análise da expressão dos genes (A) GAPDH, (B) E-cadherin, (C) Vimentin, (D) N-cadherin, (E) SNAIL, (F) IL6, (G) IL8 e (H) TNFα em amostras de tumores gerados a partir da inoculação das células B16F10 com SRPK silenciada em camundongos de forma subcutânea. O cDNA da amostra de tumor considerada controle (V2), ou o DNA genômico extraído das células B16F10 V2 em cultivo, foram submetidos a uma série de diluições e após a realização do qPCR os valores de Ct foram obtidos. Para a construção das curvas, os dados foram plotados relacionando o valor de Ct com o log da concentração de cDNA ou DNA genômico.

**ANEXO A - Certificado de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais****CERTIFICADO**

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 30/2019, intitulado "**Papel das SRPKs no crescimento tumoral e processo metastático em modelo de melanoma *in vivo***", coordenado pelo professor Gustavo Costa Bressan do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 15/08/2019, com validade de 12 meses.

**CERTIFICATE**

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 30/2019, named "**Role of SRPKs in tumor growth and metastatic process in *in vivo* melanoma model**", is in agreement with the actual Brazilian legislation ( Lei Nº 11.794, 2008), Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes and Teaching) and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being approved by the Committee on August 15, 2019 valid for 12 months.

  
Prof.ª Silvia Almeida Cardoso

Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV

## ANEXO B - Publicação: Inibição farmacológica combinada de SRPK e Akt apresenta efeito de sinergismo em células de leucemia

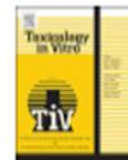
Toxicology in Vitro 65 (2020) 104777



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology in Vitro

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/toxinvit](http://www.elsevier.com/locate/toxinvit)



### Combined SRPK and AKT pharmacological inhibition is synergistic in T-cell acute lymphoblastic leukemia cells



Raoni Pais Siqueira<sup>a,\*</sup>, Mônica Maria Magalhães Caetano<sup>a</sup>, Luciana Ângelo de Souza<sup>b</sup>,  
 Patrícia Maria Siqueira dos Passos<sup>c</sup>, Natália Borges Simaroli<sup>c</sup>,  
 Marcus Vinícius de Andrade Barros<sup>d</sup>, Ana Paula Martins de Souza<sup>d</sup>, Leandro Licursi de Oliveira<sup>b</sup>,  
 Abelardo Silva-Júnior<sup>c</sup>, Juliana Lopes Rangel Fietto<sup>a</sup>, Róbson Ricardo Teixeira<sup>d</sup>,  
 Felipe Roberti Teixeira<sup>c</sup>, Gustavo Costa Bressan<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Viçosa, MG, Brazil

<sup>b</sup> Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Geral, Viçosa, MG, Brazil

<sup>c</sup> Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Genética e Evolução, São Carlos, SP, Brazil

<sup>d</sup> Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Química, Viçosa, MG, Brazil

<sup>e</sup> Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Veterinária, Viçosa, MG, Brazil

#### ARTICLE INFO

##### Keywords:

Lymphoblastic leukemia  
 SRPK inhibitor  
 SRPK340  
 AKT inhibitor  
 GSK-699603  
 Jurkat

#### ABSTRACT

The serine/arginine protein kinases respond to the EGFR-PI3K-AKT signaling module in the context of pre-mRNA alternative splicing regulation. These enzymes (notably SRPK1 and SRPK2) have been found dysregulated in a variety of cancers, which suggests them as promising drug targets in oncology. SRPK2 has been related to leukemia cells proliferation and found preferentially overexpressed in T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). Previously, synergistic combination between vincristine and SRPK inhibitors has been observed in leukemia cells *in vitro*. Herein we sought to evaluate the *in vitro* combinatory effects of inhibiting SRPK and multiple other kinase targets from the EGFR pathway in T-ALL, a hematological malignancy with a still poor prognosis. We found that the combined SRPK and AKT pharmacological inhibition is synergistic in Jurkat, CCRF-GEM, and TALL-1 (all T-ALL) but not in HL60, an acute myelogenous leukemia cell lineage. Combined treatments also impaired SR proteins phosphorylation in accordance with an improved suppression of SRPK activity. Furthermore, the synergism of treatments seemed associated with apoptosis triggering, as revealed by flow cytometry analyses. Taken together, these results suggest the therapeutic potential of the combined SRPK and AKT pharmacological inhibition against T-ALL.

#### 1. Introduction

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a hematological cancer frequently associated with poor prognosis and survival rate in adults (Terwilliger and Abdul-Hay, 2017; Xiao et al., 2018). In children, ALL treatment failure is mostly due to relapse, which occurs in approximately 15% - 20% of patients (Locatelli et al., 2012). Therefore, ALL treatment options remain limited, which justifies the search for novel strategies aiming at an improved cure rate and the prevention of disease relapse.

Abnormal activation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling contributes to the pathogenesis of several cancers, including the development and progression of different leukemia

subtypes (Banerjee et al., 2016; Kern et al., 2015; Wee and Wang, 2017). Signals mediated by EGFR can activate downstream pro-oncogenic signaling pathways, such as RAS-RAF-MEK-ERK and PI3K-AKT-mTOR (Wee and Wang, 2017). Thus, EGFR signaling has proved to be an attractive target for inhibiting leukemia cell spread.

Serine/arginine protein kinases (SRPK) are involved in pre-mRNA alternative splicing regulation in the context of the EGFR-PI3K-AKT signaling pathway (Zhou et al., 2012). Upon AKT activation, SRPK translocate to the nucleus, where they can regulate splicing by phosphorylating SR proteins (Jang et al., 2009; Zhou et al., 2012). SRPK have been frequently found overexpressed in a number of cancers, including leukemia (Hishizawa et al., 2005; Jang et al., 2008; Salessa et al., 2004; Siqueira et al., 2015), suggesting these kinases as emerging

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: [raoni.siqueira1@gmail.com](mailto:raoni.siqueira1@gmail.com) (R.P. Siqueira), [gustavo.bressan@ufv.br](mailto:gustavo.bressan@ufv.br) (G.C. Bressan).

<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104777>

Received 23 October 2019; Received in revised form 13 January 2020; Accepted 17 January 2020

Available online 18 January 2020

0887-2333/ © 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.